

# EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO ESPONTÁNEO SOBRE LA LONGEVIDAD Y LA FRAGILIDAD EN EL RATÓN C57BL/6J



Presentado por:

**Rebeca García Vallés**



Dirigida por:

**Prof. D. José Viña Ribes**

**Prof. Dña. Mari Carmen  
Gómez Cabrera**

Valencia, 2013



VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

EFFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO ESPONTÁNEO  
SOBRE LA LONGEVIDAD Y

LA FRAGILIDAD EN EL

RATÓN C57BL/6J



Presentado por:

**Rebeca García Vallés**

Dirigida por:

**Prof. D. José Viña Ribes**

**Prof. Dña. Mari Carmen Gómez Cabrera**

Valencia, 2013



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida del siguiente proyecto y beca:

- Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan Nacional de I+D+I 2008-2011. Proyectos de Investigación Fundamental (113819516-19516-4-10). Titulado: Modulación de los genes de longevidad y su importancia en la prevención de enfermedades asociadas al envejecimiento.
- Beca de investigación (BI09-022) por la Universidad de Valencia 2009-2013.





**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

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

Prof. **Doña. Mari Carmen Gómez Cabrera**, profesora titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Doña Rebeca García Vallés, Licenciada en Ciencias de la Actividad Física y Deporte por la Universidad Europea de Madrid, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada:

**EFFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO ESPONTÁNEO SOBRE LA  
LONGEVIDAD Y LA FRAGILIDAD EN EL RATÓN C57BL/6J**

Para la obtención del título de Doctora

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

Valencia, 2013

Fdo. Prof. D. José Viña Ribes

Fdo. Prof. Doña M. Carmen Gómez Cabrera





A MI FAMILIA  
A ANTONIO J. CANO



# AGRADECIMIENTOS

*Esta puede ser una de las partes más difíciles e importantes de una tesis. Es en donde pones de manifiesto que sin el apoyo, comprensión, ayuda y esfuerzo por parte de otras personas, hoy no estaría donde estoy. Por ello, espero no cometer el error de dejarme a nadie importante.*

*A mis directores:*

***José Viña**, por darme la oportunidad de formar parte de su pequeña familia científica. Porque sin conocerme de nada, me abrió las puertas de su laboratorio e hizo de mí una pequeña investigadora. Nunca olvidaré los viernes de reunión y los e-mails mañaneros donde te cuestionabas la razón de tu proyecto, el siguiente paso a seguir y los planes a corto-largo plazo. Su forma de enseñar y vivir la ciencia es admirable. GRACIAS.*

***M<sup>a</sup> Carmen**, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Desde el primer día que te conocí, me demostraste que en esta vida todo se consigue con esfuerzo, dedicación y honestidad. Gracias por las horas invertidas en mí, en esta tesis y en los cuatro años que he pasado bajo tu supervisión. Me has enseñado que nuestra carrera tiene un gran abanico de posibilidades y que no es una excusa para el no saber. Durante esta etapa de mi vida, siempre has tenido la puerta abierta, me has escuchado y me has aconsejado. Por ello, siempre te estaré agradecida. GRACIAS DE CORAZÓN.*

*Viña's Laboratory*

***Chelo, Juan y Ana**, por las risas y cariño que habéis tenido hacia mí en todo momento. Juan gracias por hacerme un sitio dentro de tu gran desorden, por escucharme y hacer del error un conocimiento; Chelo, siempre con una sonrisa y una frase de apoyo, sincera y humilde en todo momento; y Ana, siempre cerca y amable. Gracias a los tres.*

***Vladimir y Fabián**, sois los seniors del grupo de ejercicio. Sois todo un ejemplo de dedicación y esfuerzo. Vladimir, hemos pasado muchos ratos juntos, me has enseñado a no quedarme con lo básico e ir en busca de más conocimiento. Tú fuiste el primero en decirme que una estancia fuera es fundamental y que iba a cambiar mi perspectiva de la investigación. Estabas en lo cierto. Fabián, siempre me has escuchado y me has ayudado incluso sin pedírtelo, siempre apoyando al grupo, mirando lo mejor para éste y buscando financiación hasta debajo de las piedras, trabajador como pocos y sincero en todo momento. Gracias a los dos.*

*Gloria*, me sorprendiste gratamente en Toledo; allí descubrí a una persona increíble. Fueron unos días inolvidables, llenos de buenos momentos. Eficaz como pocas personas, siempre al pie del cañón, solucionando y resolviendo dudas y problemas. Compañera y amiga, me has ayudado con esta tesis y con el día a día en el laboratorio, Gracias.

El grupo de ejercicio está formado por personas brillantes que destacarán allá donde vayan y lograrán todo lo que se propongan. **Beatriz**, entramos prácticamente al mismo tiempo y siempre nos han confundido. Grandes y duros momentos hemos pasado y todos nos hicieron aprender y crecer como personas. **Helios y Thomas**, amigos inseparables, trabajadores e inteligentes. Y respecto a los que ya no estáis; **Consuelo**, compañera de bancada, amable como pocas, siempre preocupada por los demás y mirando por el bien del grupo y el laboratorio. **Sandra**, trabajadora innata. Día tras día trabajando codo con codo han forjado entre nosotras una gran amistad. Eres buena persona y una buena amiga, para mí ha sido todo un placer trabajar contigo, te deseo lo mejor en esta nueva etapa. **Carlos, Helena y Andrea**, las nuevas incorporaciones, sois el futuro y os garantizo que no habéis podido caer en mejor grupo. Aprender de los mejores es tarea vuestra.

Con el grupo de envejecimiento he trabajado, nunca me sentí una extraña, vosotros sois un gran equipo. Distintos entre vosotros, de nacionalidades distintas y objetivos diferentes, hacéis que el trabajo, el compañerismo y la buena energía estén presentes en el día a día. **Maryia** y cultivos, **Vicent** y el valencià, **Kfira** y su centimillo, **Mar** y su HPLC, **Eva** y su micro-array y aunque ya no estén con nosotros **Rubén** y los ratones, **Raúl** y su PET, todos gente maravillosa con la que he tenido el placer de trabajar a lo largo de estos cuatro años; ya sea con células, mis primeros días con los ratones, actividades, westerns, etc. Todos me han aportado algo a mí y a esta tesis. A la reciente incorporada **Cristina**, sólo te reitero lo comentado, tienes la oportunidad de aprender de los mejores, no la malgastes. **Marta**, ¿qué te voy a decir que no sepas?, me has apoyado en los momentos más duros, me has escuchado y siempre has creído en mí. Aconsejándome y quitándole leña al fuego. Para mí, más que una compañera eres una gran amiga. Esas proteínas oxidadas a las 7am hicieron que descubriera a una gran persona, con un gran corazón y una profesional. Siempre me tendrás como amiga. Gracias a todos.

El grupo de Alzheimer, **Esther y Tania**, un pequeño grupo formado por grandes personas, gracias por las risas y los buenos momentos juntas.

A toda la gente que ha pasado por el laboratorio y ya no está. Gracias por los buenos momentos y "hazañas" juntos. **Ana** "Sevilla", **Sara** "Madrid", **Analisa** "Italia", **Frederic** "Francia", **Mika** "Japón" **Ernesto y Enrique** "República Dominicana", **Nuno y Graça**

*“Portugual”. Todos vosotros habéis contribuido de una manera u otra en la elaboración de la presente tesis. Gracias.*

#### *Animalarios*

*Esta tesis no hubiera sido posible sin el respaldo de los dos grupos de profesionales que trabajan en el animalario de Farmacia y en el animalario de Medicina. **Inma**, toda una curva de longevidad hemos llevado juntas. Pruebas, extracciones, cremitas, cuidados,... formaron parte de mis dos primeros años. Sólo tengo palabras de agradecimiento por todo lo que hiciste para que mi proyecto, y hoy en día mi tesis, sea una realidad. Detrás de ti tienes a personas maravillosas: **Jesús, Yura y Asun**, siempre dispuestos a ayudarte, siempre con una sonrisa y amables en todo momento. Gracias a los cuatro por hacer del día a día en el animalario un camino de rosas.*

*El trabajo en el animalario de Medicina llegó más tarde, pero no por ello ha sido menos importante. **Pili, Ana, Rafa y Eli**, las risas, el buen ambiente, los almuerzos, son cosas que quedaran grabadas en mi memoria. Nunca una mala cara, ni un mal gesto, no os podéis imaginar todo lo que me habéis ayudado en el día a día y en la elaboración de esta tesis. Trabajar con vosotros ha sido un placer. **Anita**, jefa, veterinaria, compañera y lo más importante, amiga. No hay palabras de agradecimiento por todo lo que has hecho por mí. Me has escuchado en los momentos más duros, apoyo y confianza me has manifestado. Por ello y porque he ganado a una amiga dentro y fuera del departamento, considero que ha merecido la pena esta hazaña. Siempre me tendrás como amiga. Gracias a todos.*

#### *Maret T's laboratory*

***Dr. Maret**, it was a pleasure for me to have the opportunity to work in your laboratory. Since the first day, I have been part of the group and everybody was really friendly. You have an incredible group: **Sherry, Scott, Hannah, Isidora, Emily, Mathew and Alan**. Thank you for everything that you did for me. Sherry, I know that you were busy because your thesis defense was close. However, you always found time for me, explaining and showing me where things were and time to explain those chemical reactions that I think I will never understand. Scott IS the boss in vitamin E and I think that few people are so humble and have worked more than you. Emily and Isidora, the new incorporations, well so I was, thanks for making the day to day so enjoyable. Mathew, brilliant, with only 16 years old and you have left a big “footprint” (as we say in Spain), I am sure you will get anywhere you want to. Alan, thanks for being so friendly and forthcoming with me. Hannah, thanks to you I met wonderful people. My*

*experience these three months would not have been the same without you. Thanks very much to all.*

*Metabólica*

*Daniel, José Manuel y Vanina gracias por ayudarme con el procesamiento de las muestras y por vuestra cercanía en todo momento. Vanina, a ti te conocí en farmacia y hoy estás en medicina, gracias por los buenos momentos que hemos pasado juntas, las risas y charlas inolvidables. Gracias a los tres.*

*Departamento de Fisiología*

### *Facultad de Medicina*

*Ya sea por charlas, seminarios, clases o por los pasillos, todas las personas del departamento de fisiología han tenido siempre una palabra amable, una sonrisa o incluso se han preocupado por mi evolución. Por ello, y espero no dejarme a nadie, os agradezco de corazón el que me hayáis acogido y hecho formar parte del gran grupo de profesionales e investigadores que sois todos. Dr. Pallardó, Dr. Hermenegildo, Dr. Such, Dr. Alberola, Dr. Iradi, Dra. Vallés, Dr. Vila, Dr. Estrela y por supuesto todas las personas que trabajan o han trabajado con vosotros: José Luis, Ana, Carme, Amparo, Gema, Isa, Marta, Santi, Eduardo, Sergio, Quique, Macarena, Carlos, Ana, Xavi, Dani, Susana, Luis, Germán, Laia, Natalia, Gloria, Pascual, Patricio, Diana y Javier (nuestro nuevo técnico). Y a los demás miembros del departamento GRACIAS a todos.*

### *Facultad de Farmacia*

*La ventaja de trabajar en dos sitios es que en ellos siempre conoces a gente extraordinaria. Javier Miranda, no tengo palabras de agradecimiento hacia ti. Tú eres el responsable de que hoy esté aquí, tú me pusiste en contacto con el grupo de ejercicio, el grupo que durante cuatro años ha hecho de mí una pequeña investigadora. Javier, siempre has estado atento a mi evolución, funcionamiento, resultado y siempre has tenido un hueco para escucharme y aconsejarme. Gracias por abrirme las puertas de un mundo nuevo. En el departamento de fisiología de la facultad de Farmacia he tenido el placer de conocer y coincidir con muchas personas y todas forman parte de este manuscrito. Juan S., Ángel O., Javier E., Javier P., Dolores R. (Pein), Alexandro y Mari Luz. Gracias a todos.*

## Secretarias

¿Qué haría sin vosotras? La burocracia, el papeleo, las firmas imposibles, envíos a última hora, plazos, etc. hubiera sido imposible sin vuestra ayuda. Pocas personas son tan eficientes como vosotras. **Mari, Eva, Elena y Pilar** muchas gracias. **Marilyn** gracias por tu ayuda con el Inglés y tus consejos.

No puedo dejarme a **Inma Cerisuelo** quien, a horas bien tempranas, me ha abierto tantas veces la puerta del laboratorio, gracias por el día a día, por esas conversaciones y por hacerme esas mañanas mucho más atractivas.

No puedo pasar sin agradecer al **Dr. Leo Rodríguez Mañas**, al **Dr. Franjo García García** y al **Dr. Ignacio Torres Alemán** por todas las ideas, consejos y ayuda que ustedes me han brindado a lo largo de esta tesis. Gracias.

## Familia

Sin vuestro apoyo y confianza esto no hubiera sido posible. Agradecer a los dos pilares de mi vida ¡MIS PADRES! todo lo que han hecho por mí, es quedarse cortos. Desde bien pequeña me enseñasteis que la constancia, el esfuerzo y la lucha eran imprescindibles para lograr lo que uno quería. Hoy he terminado otra etapa de mi vida y no hubiera sido posible sin vosotros. Sé que muchas veces me escuchábais sin saber y sin entender una palabra de lo que decía, pero habéis confiado en mí y eso es lo mejor que una hija puede esperar de sus padres. Mis padres, son esas personas que me trajeron al mundo, que me ven crecer, evolucionar y progresar como persona sin esperar nada a cambio. Son personas que no dejan que me rinda, que dan todo lo que tienen y que darían la vida por mí. OS QUIERO MUCHÍSIMO, NO LO OLVIDEIS NUNCA. Gracias.

Yaya, en el dos caballos íbamos al cole y momentos inolvidables hemos pasado juntas. Me enseñaste que en esta vida las personas se caracterizan por como son en su interior y no por lo que tienen. Has estado siempre a mi lado y consejos y refranes tienes para todo, ya que como tú dices “el diablo sabe más por viejo, que por diablo” y aunque el yayo ya no esté con nosotros, sé que no debe de andar muy lejos, ya que su forma de ser, su paciencia y maña han dejado huella en mí. Momentos inolvidables a sus nietos nos ha proporcionado y espero no olvidarlos nunca. Abuelo esta tesis es para ti. Gracias a los dos. Os quiero.

*Carmelo y Angelines, sé que no sabéis muy bien lo que hago, que os preguntáis cuando terminaré de estudiar, viajar y ya os digo que NUNCA. Si algo me han transmitido los genes García es trabajo y dedicación a lo que a uno más le gusta. Las horas son minutos cuando disfrutas trabajando, cuando piensas que el saber no ocupa lugar y cuando piensas que cualquier persona puede enseñarte algo. Por eso Gracias. Os quiero.*

*Antonio J., nos conocemos desde hace muchos años y eres la persona que mejor me conoce. Tú con sólo una mirada sabes como estoy, lo que necesito o si me preocupa algo. Has estado a mi lado durante toda esta etapa, etapa que llega hoy a su fin. Apoyo, comprensión, paciencia, ayuda, sinceridad, confianza y amor me has brindado durante estos cuatro años, sin pedir nada a cambio. Tú eres otro pilar importante de mi vida y sin ti esto no tendría sentido. Gracias por estar ahí en los momentos más duros de mi vida, tanto profesionales como personales, por creer en mí y no dejar que abandone. Gracias ¿Sabes qué?..... ¡¡Ya lo sabes!!*

*Familia Cano Marquina desde el principio me acogisteis como un miembro más de la familia y siempre me he sentido así. Esos tupperware de los domingos, esas charlas de ciencia o esas siestas en "mi" sofá, son cosas que jamás olvidaré. Vosotros hacéis que Valencia sea un hogar para mí. Por todo lo que hacéis y habéis hecho por mí, GRACIAS. Os quiero*

*No puedo cerrar este apartado sin agradecerles a mis amigas por su comprensión y apoyo durante esta etapa. Rocío y Ángela, aunque las distancias formen parte de nosotras, no olvidéis que aquí tenéis una amiga que OS QUIERE y os da las gracias por la paciencia y cariño que siempre os ha caracterizado. Y no por ser los últimos son menos importantes, a Jorge F., Carlos C., Nacho M., Isabel B., Sergio S., Pilar C., Primos, Tíos, tod@s los amig@s y familia que forman parte de mi vida, por esas cervezas de desconexión en "The News" y porque siempre habéis estado ahí, en la retaguardia, para cuando más os he necesitado. Gracias a tod@s.*

***A TODOS, ¡MUCHAS GRACIAS!***



# *ÍNDICE GENERAL*



|  |          |
|--|----------|
| <b>1. ABSTRACT/ RESUMEN .....</b>                              | <b>1</b> |
| 1.1 Abstract .....   | 3        |
| 1.2 Resumen.....   | 6        |
| <b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>                                   | <b>9</b> |
| 2.1 Ejercicio físico .....                                     | 11       |
| 2.1.1 Ejercicio físico espontáneo y forzado en animales .....  | 12       |
| 2.1.2 Efectos beneficiosos del ejercicio físico .....          | 12       |
| 2.2 Envejecimiento.....  | 18       |
| 2.2.1 Concepto .....   | 18       |
| 2.2.2 Consecuencias del envejecimiento .....                   | 19       |
| 2.2.3 Longevidad .....   | 20       |
| 2.2.3.1 Esperanza de vida media y máxima .....                 | 20       |
| 2.2.4 Teorías del envejecimiento .....                         | 22       |
| 2.2.4.1 Teorías Orgánicas .....                                | 23       |
| 2.2.4.1.1 Inmunológica.....                                    | 23       |
| 2.2.4.1.2 Neuroendocrina .....                                 | 24       |
| 2.2.4.2 Teorías Celulares .....                                | 25       |
| 2.2.4.2.1 Límite de la duplicación celular.....                | 25       |
| 2.2.4.3 Teorías del envejecimiento programado .....            | 26       |
| 2.2.4.3.1 Programa genético de envejecimiento .....            | 26       |
| 2.2.4.3.2 Teoría evolutiva.....                                | 26       |
| 2.2.4.4 Teorías moleculares .....                              | 28       |
| 2.2.4.4.1 Acumulación de productos de desecho .....            | 28       |
| 2.2.4.4.2 Entrecruzamientos (Cross-linking). .....             | 28       |
| 2.2.4.4.3 Mutaciones somáticas y “Errores Catastróficos” ..... | 29       |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 2.2.4.4.4 | Teoría de los Radicales libres .....               | 29 |
| 2.3       | Radical libre .....                                | 33 |
| 2.3.1     | Concepto de radical libre .....                    | 33 |
| 2.3.2     | Clases de radicales libres.....                    | 34 |
| 2.3.3     | Génesis de ROS.....                                | 34 |
| 2.3.4     | Fuentes exógenas.....                              | 35 |
| 2.3.5     | Fuentes endógenas .....                            | 36 |
| 2.3.5.1   | Cadena de transporte electrónico mitocondrial..... | 36 |
| 2.3.5.2   | Reacción de Fenton-Haber-Weiss .....               | 40 |
| 2.4       | Estrés oxidativo .....                             | 42 |
| 2.4.1     | Concepto .....                                     | 42 |
| 2.4.1.1   | Estrés oxidativo y daño a biomoléculas .....       | 42 |
| 2.4.1.1.1 | Daño oxidativo a lípidos .....                     | 42 |
| 2.4.1.1.2 | Daño oxidativo a proteínas .....                   | 44 |
| 2.4.1.1.3 | Daño oxidativo al DNA .....                        | 45 |
| 2.4.1.1.4 | Daño a glúcidos .....                              | 45 |
| 2.4.2     | Indicadores de estrés oxidativo.....               | 46 |
| 2.4.2.1   | Cociente GSSG/GSH.....                             | 47 |
| 2.4.2.2   | Grupos carbonilo.....                              | 48 |
| 2.4.2.3   | Malondialdehído (MDA).....                         | 48 |
| 2.5       | Antioxidantes .....                                | 50 |
| 2.5.1     | Concepto .....                                     | 50 |
| 2.5.2     | Antioxidantes enzimáticos .....                    | 51 |
| 2.5.2.1   | Superóxido dismutasa (SOD).....                    | 51 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.5.2.2 | Glutación peroxidasa (GPx) .....  | 51 |
| 2.5.2.3 | Catalasa .....  | 52 |
| 2.5.3   | Antioxidantes no enzimáticos .....  | 52 |
| 2.5.3.1 | Glutación.....  | 53 |
| 2.6     | Fragilidad.....   | 54 |
| 2.6.1   | Concepto de fragilidad. ....  | 56 |
| 2.6.2   | Comorbilidad, discapacidad y fragilidad. ....                             | 61 |
| 2.6.3   | Marcadores clínicos del paciente.....                                     | 63 |
| 2.6.3.1 | Valoración o esfera clínica.....  | 63 |
| 2.6.3.2 | Valoración o esfera funcional.....  | 64 |
| 2.6.3.3 | Valoración mental (esfera mental). ....                                   | 65 |
| 2.6.3.4 | Valoración Social (esfera social). ....                                   | 67 |
| 2.6.4   | Valoración geriátrica integral. ....                                      | 68 |
| 2.6.5   | Implicación de la fragilidad en los distintos sistemas. ....              | 70 |
| 2.6.6   | Fragilidad en animales de experimentación. ....                           | 78 |
| 2.6.6.1 | Instrumentos utilizados en la valoración de la fragilidad en ratones..... | 80 |
| 2.6.7   | Estrategias de retraso o prevención de la fragilidad.....                 | 84 |
| 2.7     | Marcadores de Fragilidad.....   | 87 |
| 2.7.1   | Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). ....                     | 87 |
| 2.7.1.1 | Concepto. ....  | 87 |
| 2.7.1.2 | BDNF y ejercicio físico. ....   | 89 |
| 2.7.1.3 | BDNF y fragilidad.....  | 90 |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 2.8        | Regulación de la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético.....                                       | 92         |
| 2.8.1      | Cambios en el envejecimiento muscular.....  | 93         |
| 2.9        | Metabólica.....   | 96         |
| 2.9.1      | Espectroscopia NMR. Los principios básicos.....   | 98         |
| <b>3.</b>  | <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>99</b>  |
| 3.1        | OBJETIVO:.....  | 101        |
| 3.1.1      | Objetivos específicos:.....   | 101        |
| <b>4.</b>  | <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>103</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Materiales.....</b>  | <b>105</b> |
| 4.1.1      | Comité de ética.....  | 105        |
| 4.1.2      | Animales de experimentación.....  | 105        |
| 4.1.2.1    | Estandarización genética.....   | 105        |
| 4.1.2.2    | Estado sanitario.....   | 106        |
| 4.1.2.3    | Estado ambiental.....   | 106        |
| 4.1.2.4    | Tipo de instalaciones.....  | 107        |
| 4.1.3      | Planificación anual.....  | 107        |
| 4.1.3.1    | Diseño experimental.....  | 107        |
| 4.1.3.2    | Control y seguimiento de la ingesta y peso de los ratones.....  | 108        |
| 4.1.3.3    | Control y seguimiento del ejercicio espontáneo realizado por los animales pertenecientes al grupo activo..... | 109        |
| 4.1.4      | Aparatos.....   | 110        |
| 4.1.5      | Reactivos.....  | 113        |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| <b>4.2</b> | <b>Métodos.</b>  | 115 |
| 4.2.1      | Curva de longevidad.   | 115 |
| 4.2.1.1    | Características.   | 115 |
| 4.2.2      | Valencia test.   | 116 |
| 4.2.2.1    | Test incremental en tapiz rodante.   | 116 |
| 4.2.2.2    | Fuerza de agarre (Grip strength).  | 118 |
| 4.2.2.3    | Coordinación motora (Tightrope test).  | 119 |
| 4.2.2.4    | Determinación del peso.  | 119 |
| 4.2.3      | Tests adicionales para la determinación de la respuesta al estrés de los animales. | 120 |
| 4.2.3.1    | Función hepática (zoxazolamina).   | 120 |
| 4.2.3.2    | Crecimiento de pelo.   | 120 |
| 4.2.3.3    | Tolerancia a la glucosa.   | 121 |
| 4.2.3.4    | Campo abierto.   | 121 |
| 4.2.4      | Extracción de sangre.  | 121 |
| 4.2.5      | Sacrificio de los animales. Extracción y conservación de muestras.                 | 122 |
| 4.2.6      | Extracción de proteínas a partir de tejido muscular.                               | 123 |
| 4.2.6.1    | Fundamento.  | 123 |
| 4.2.6.2    | Protocolo.   | 123 |
| 4.2.6.3    | Cuantificación.  | 124 |
| 4.2.7      | Extracción de proteínas a partir de hígado.  | 124 |
| 4.2.7.1    | Protocolo.   | 124 |
| 4.2.7.2    | Cuantificación.  | 125 |

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| 4.2.8    | Extracción de proteínas a partir de corteza cerebral.....                                    | 126 |
| 4.2.8.1  | Protocolo.....   | 126 |
| 4.2.8.2  | Cuantificación.....  | 126 |
| 4.2.9    | Método para determinar la concentración de proteínas:<br>Lowry.....                          | 127 |
| 4.2.9.1  | Fundamento.....  | 127 |
| 4.2.9.2  | Preparación de los reactivos.....  | 127 |
| 4.2.9.3  | Protocolo.....   | 128 |
| 4.2.9.4  | Cálculos.....  | 129 |
| 4.2.10   | Método para determinar la concentración de proteínas:<br>Bradford.....                       | 130 |
| 4.2.10.1 | Fundamento.....  | 130 |
| 4.2.10.2 | Reactivos.....   | 130 |
| 4.2.10.3 | Protocolo.....   | 130 |
| 4.2.10.4 | Cálculos.....  | 131 |
| 4.2.11   | Electroforesis en geles de poliacilamida-SDS (PAGE-SDS) y<br>posterior Western Blotting..... | 132 |
| 4.2.11.1 | Fundamento.....  | 132 |
| 4.2.11.2 | Condiciones del gel y transferencia.....   | 133 |
| 4.2.11.3 | Protocolo.....   | 134 |
| 4.2.11.4 | Visualización.....   | 134 |
| 4.2.11.5 | Cuantificación de los resultados.....  | 134 |
| 4.2.11.6 | Relación de anticuerpos empleados.....   | 135 |



|            |   |     |
|------------|---|-----|
| 4.2.12     | Estudio de la oxidación de proteínas (Proteínas Carboniladas).  | 136 |
| 4.2.12.1   | Fundamento.   | 136 |
| 4.2.12.2   | Derivatización de la muestra.   | 136 |
| 4.2.12.3   | Condiciones del gel y transferencia.  | 137 |
| 4.2.12.4   | Procedimiento.  | 137 |
| 4.2.12.5   | Visualización.  | 138 |
| 4.2.12.6   | Cuantificación de los resultados.   | 138 |
| 4.2.13     | Determinación de los niveles de peroxidación lipídica (Malondialdehído) por cromatografía líquida de alta eficacia. | 139 |
| 4.2.13.1   | Fundamento  | 139 |
| 4.2.13.2   | Protocolo.  | 139 |
| 4.2.13.2.1 | Recogida de muestras.   | 139 |
| 4.2.13.2.2 | Reactivos   | 140 |
| 4.2.13.2.3 | Preparación de los patrones:  | 140 |
| 4.2.13.2.4 | Procedimiento de Derivatización.  | 141 |
| 4.2.13.2.5 | Preparación de las fases móviles para el HPLC.  | 142 |
| 4.2.13.2.6 | Condiciones cromatográficas   | 143 |
| 4.2.13.2.7 | Método cromatográfico.  | 143 |
| 4.2.14     | Determinación de los niveles de actividad glutatión peroxidasa (GPx).   | 144 |
| 4.2.14.1   | Fundamento  | 144 |
| 4.2.14.2   | Reactivos   | 145 |
| 4.2.14.2.1 | Reactivos preparados con anterioridad   | 145 |
| 4.2.14.2.2 | Reactivos preparados en el día  | 145 |
| 4.2.14.3   | Procedimiento   | 146 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| 4.2.14.4   | Cálculos .....   | 147 |
| 4.2.15     | Determinación de los niveles de actividad de manganeso superóxido dismutasa (MnSOD)..... | 149 |
| 4.2.15.1   | Fundamento .....   | 149 |
| 4.2.15.2   | Reactivos .....  | 150 |
| 4.2.15.3   | Protocolo .....  | 151 |
| 4.2.15.4   | Cálculos .....   | 152 |
| 4.2.16     | Aislamiento de RNA a partir de tejido.....   | 153 |
| 4.2.16.1   | Fundamento.....  | 153 |
| 4.2.16.2   | Reactivos .....  | 154 |
| 4.2.16.3   | Protocolo.....   | 154 |
| 4.2.16.3.1 | Trabajo previo .....   | 154 |
| 4.2.16.3.2 | Homogenados .....  | 155 |
| 4.2.16.3.3 | Separación de fases.....   | 155 |
| 4.2.16.3.4 | Precipitación del RNA.....   | 156 |
| 4.2.16.3.5 | Lavado .....   | 157 |
| 4.2.16.3.6 | Dilución y medición de la pureza e integridad del RNA total.....                         | 157 |
| 4.2.17     | Retrotranscripción del una copia de DNA (cDNA).....                                      | 158 |
| 4.2.17.1   | Fundamento .....   | 158 |
| 4.2.17.2   | Reactivos .....  | 158 |
| 4.2.17.3   | Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT) .....  | 159 |
| 4.2.17.3.1 | Protocolo.....   | 159 |
| 4.2.17.3.2 | Condiciones de amplificación.....  | 160 |
| 4.2.18     | Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa de RNA (RT-PCR en tiempo real).....        | 161 |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 4.2.18.1   | Fundamento.....  | 161        |
| 4.2.18.2   | Protocolo.....   | 162        |
| 4.2.18.3   | Primers.....   | 164        |
| 4.2.18.4   | Condiciones de amplificación.....  | 165        |
| 4.2.18.5   | Cálculos.....  | 165        |
| 4.2.19     | Determinación de los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).....    | 166        |
| 4.2.19.1   | Fundamento.....  | 166        |
| 4.2.19.2   | Reactivos o componentes del kit.....   | 166        |
| 4.2.19.3   | Protocolo.....   | 167        |
| 4.2.19.3.1 | Primer día.....  | 167        |
| 4.2.19.3.2 | Segundo día.....   | 168        |
| 4.2.19.4   | Cálculos.....  | 169        |
| 4.2.20     | Determinación del perfil metabólico en plasma mediante resonancia magnética nuclear..... | 170        |
| 4.2.20.1   | Fundamento.....  | 170        |
| 4.2.20.2   | Procedimiento.....   | 171        |
| 4.2.20.3   | Análisis de datos y cálculos.....  | 172        |
| 4.2.21     | Análisis estadístico de los resultados.....  | 173        |
| <b>5.</b>  | <b>RESULTS.....</b>  | <b>175</b> |
| 5.1        | Effect of spontaneous wheel - running on longevity.....                                  | 177        |
| 5.2        | Effect of aging and spontaneous Wheel - running on frailty. The Valencia test.....       | 179        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 5.3       | Effects of spontaneous exercise on mitochondrial biogenesis in gastrocnemius muscle.....                                       | 189        |
| 5.4       | Effects of aging and spontaneous wheel-running on cortical BDNF protein levels.....  | 193        |
| 5.5       | Effect of aging and spontaneous wheel –running on plasma oxidative stress parameters .....                                     | 195        |
| 5.6       | Effect of aging and spontaneous wheel-running on liver expression of longevity genes. ....                                     | 200        |
| 5.7       | Effect of spontaneous wheel-running in the plasma metabolic profile using nuclear magnetic resonance in 20 month-old mice..... | 207        |
| <b>6.</b> | <b>DISCUSSION</b> .....  | <b>213</b> |
| <b>7.</b> | <b>CONCLUSIONS / CONCLUSIONES</b> .....  | <b>233</b> |
| 7.1       | Conclusions .....  | 235        |
| 7.2       | Conclusiones.....  | 237        |
| <b>8.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | <b>239</b> |
| <b>9.</b> | <b>ANEXOS</b> .....  | <b>269</b> |
| 9.1       | Acrónimos y Abreviaturas .....   | 271        |
| 9.2       | Especies Químicas .....  | 276        |
| 9.3       | Magnitudes Físicas y Unidades de medida .....  | 277        |

# *ÍNDICE DE TABLAS*



## **1. ABSTRACT/ RESUMEN**

## **2. INTRODUCCIÓN**

Tabla 2.1 Principales especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno..... 34

Tabla 2.2 Enfoques terapéuticos para la prevención de la debilidad músculo-esquelética (Gielen, Verschueren et al. 2012). ..... 95

## **3. OBJETIVOS**

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

Tabla 4.1 Anticuerpos..... 135

Tabla 4.2 Anticuerpos (Control de carga). ..... 135

Tabla 4.3 Programa de duración, durante un cromatograma de análisis de MDA..... 143

Tabla 4.4 Recta estándar de la SOD. .... 151

Tabla 4.5 Reactivos y volumen para la RT ..... 159

Tabla 4.6 Condiciones de los ciclos térmicos ..... 160

Tabla 4.7 Secuencia de oligos utilizados para la RT-PCR..... 164

## **5. RESULTS**

Table 5.1 Frailty components in mice vs humans ..... 180

Table 5.2 Score metabolic changes induced by long term spontaneous exercise vs sedentary mice. .... 208

## **6. DISCUSSION**

## **7. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES**

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

## **9. ANEXOS**





# *ÍNDICE DE FIGURAS*



## **1. ABSTRACT**

## **2. INTRODUCCIÓN**

|  |    |
|--|----|
| Figura 2.1 Ratio estandarizado de muerte.....  | 22 |
| Figura 2.2 Cadena de transporte electrónico. Libro Lehninger “Principios de Bioquímica” edición: 2000 .....              | 38 |
| Figura 2.3 Personas con discapacidad (Tasa por mil habitantes). Datos obtenidos del INE.....                             | 55 |
| Figura 2.4 Círculo de la fragilidad. Hipótesis de Fried (Baztán Cortés 2006). 60   |    |
| Figura 2.5 Diagrama que muestra el alcance de la superposición de la fragilidad con la discapacidad y comorbilidad ..... | 62 |
| Figura 2.6 Servicios socio-sanitarios recibidos en los últimos 14 días previa a la encuesta (EDAD) en el 2008. ....      | 68 |
| Figura 2.7 Imagen por resonancia magnética de la pérdida muscular esquelética. ....                                      | 73 |
| Figura 2.8 Mecanismos moleculares implicados en la sarcopenia. ....  | 77 |

## **3. OBJETIVOS**

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

|  |     |
|--|-----|
| Figura 4.1 Ratón C57BL/6.....  | 105 |
| Figura 4.2 Tapiz rodante.....  | 117 |
| Figura 4.3 Fuerza de agarre.....   | 118 |
| Figura 4.4 Coordinación motora .....                                     | 119 |
| Figura 4.5 Gráfico de absorbancia.....                                   | 129 |
| Figura 4.6 Material del Western Blotting.....                            | 132 |
| Figura 4.7 Esquema electroforesis SDS-PAGE. ....                         | 133 |
| Figura 4.8 Equipo de HPLC para la determinación de los niveles de MDA .. | 143 |
| Figura 4.9 Esquema del análisis de la GPx.....                           | 144 |
| Figura 4.10 Esquema del ensayo Superóxido Dismutasa.....                 | 150 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 4.11 Esquema visual de la separación en dos fases tras la centrifugación. .... | 156 |
| Figura 4.12 Nanodrop .....  | 158 |
| Figura 4.13 Elaboración de la recta patrón mediante diluciones seriadas. .            | 167 |
| Figura 4.14 Placa de Elisa .....  | 169 |

## 5. RESULTS

|   |     |
|---|-----|
| Figure 5.1 Survival curve in sedentary and wheel-running mice. ....   | 177 |
| Figure 5.2 Running wheel activity in mice along the longevity curve. ....   | 178 |
| Figure 5.3 Frailty components: unintentional weight loss. ....  | 181 |
| Figure 5.4 Frailty components: weakness quantified by using grip strength .....   | 182 |
| Figure 5.5.1 Endurance test.....  | 184 |
| Figure 5.5.2 Slowness test.....   | 185 |
| Figure 5.6 Frailty components: low physical activity (motor coordination) quantified by using the tightrope test. ....                                    | 187 |
| Figure 5.7 Frailty test in sedentary and wheel-running mice.....  | 188 |
| Figure 5.8 Western blotting analysis of PGC-1 $\alpha$ protein levels in gastrocnemius muscle of sedentary and wheel-running mice at different ages. .... | 191 |
| Figure 5.9 Western blotting analysis of cytochrome C in gastrocnemius muscle of sedentary and wheel-running mice at different ages. ....                  | 192 |
| Figure 5.10 Cortex BDNF levels in sedentary and wheel-running mice at different ages. ....  | 194 |
| Figure 5.11 Western blotting analysis of plasma carbonyl groups in sedentary and wheel-running mice at different ages. ....                               | 196 |
| Figure 5.12 Plasma levels of MDA in sedentary and wheel-running mice at different ages. ....  | 197 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 5.12.1 Plasma levels of MDA in the Sedentary group of mice at different ages.....                         | 198 |
| Figure 5.12.2 Plasma levels of MDA in the Wheel-running group of mice at different ages.....                     | 199 |
| Figure 5.13 MnSOD RT-PCR in the liver of sedentary and wheel-running mice at different ages. ....                | 201 |
| Figure 5.14 MnSOD enzymatic activity in the liver of sedentary and wheel-running mice at different ages. ....    | 202 |
| Figure 4.14.1 MnSOD enzymatic activity in the liver of sedentary mice at different ages .....                    | 203 |
| Figure 4.14.2 MnSOD enzymatic activity in the liver of the wheel-runners mice at different ages.....             | 204 |
| Figure 5.15 GPx RT-PCR in the liver of sedentary and wheel-running mice at different ages. ....                  | 205 |
| Figure 5.16 GPx enzymatic activity in the liver of sedentary and wheel-running mice at different ages. ....      | 206 |
| Figure 5.17 Histograms for the levels of the most significant metabolites modified by spontaneous exercise. .... | 209 |
| Figure 5.18. Score plot of PCA in sedentary and wheel-running mice.....  | 210 |
| Figure 5.19. Lipoprotein spectrum by NMR in sedentary and wheel-running mice.....                                | 211 |

## **6. DISCUSSION**

## **7. CONCLUSIONS /CONCLUSIONES**

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

## **9. ANEXOS**



# *1. ABSTRACT/RESUMEN*





## 1.1 Abstract

The increase in life expectancy has resulted in an increase in age-related diseases and a larger number of dependent people. The major aim of our study was to determine whether life-long spontaneous exercise affects lifespan and the retardation of frailty in mice. Our major problem was the lack of a frailty test in experimental animals. Thus, we had to develop a new test to determine frailty in mice that we have termed the "Valencia Test".

Male C57BL/6J mice, individually caged, were randomly assigned to one of two groups, sedentary (n=72) or spontaneous wheel-runners (n=72). We compared the sedentary vs active lifestyle in terms of longevity and developed the "Valencia Test" to quantify frailty by evaluating unintentional weight loss, exhaustion and slowness, weakness, and low physical activity.

Sedentary animals became frail as they aged. Although life-long spontaneous exercise did not prolong longevity, it prevented frailty. This improvement was accompanied by a significant increase in the mitochondrial biogenesis cell signaling pathway in skeletal muscle and the levels of the Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in the brain.

Free radicals have a role in causing aging. In our study, aging was associated with a significant increase in plasma lipid peroxidation

determined as malondialdehyde (MDA). Spontaneous wheel-running did not prevent the aging-associated increase in oxidative stress.

The antioxidant status of an individual can be important in determining the frequency of age-dependent diseases and the duration of general health maintenance. Thus, we also aimed to study the induction of two well-known longevity genes, the antioxidant enzymes manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase. For this purpose we used two different approaches: RT-PCR and the determination of their enzymatic activities. We found an increase in the activity of the antioxidant enzymes as mice grew older in both experimental groups. Those mice that had free access to the running-wheels showed a significant increase in the Mn-SOD activity during the last period of time studied (28 month-old).

Finally, we studied the effect of spontaneous wheel-running on plasma metabolic profile in 20 month-old mice using nuclear magnetic resonance. Life-long spontaneous exercise was associated with significant differences in the circulating metabolome. Lactate, alanine, and glucose were lower in those mice that had free access to the running wheels than in the sedentary mice. On the contrary, plasma glycerol, citrate and fatty acids were higher in the plasma of the active mice when compared to the inactive ones. These differences indicate a better metabolic health in the physically active than in inactive mice.

A concern of health providers is whether increasing longevity will increase disability and health costs. Thus, maximizing health span and

preventing dysfunction are at least as important, as extending lifespan. Our results show that spontaneous exercise is a very promising intervention for the modulation of healthspan.

## 1.2 Resumen

El incremento de la esperanza de vida ha dado lugar a un aumento de las enfermedades relacionadas con la edad y un mayor número de personas dependientes. El objetivo principal de nuestro estudio fue determinar si el ejercicio físico espontáneo realizado durante toda la vida afecta a la longevidad y al retraso de la fragilidad en un modelo murino. Nuestro principal problema ha sido la falta de una prueba de fragilidad en animales de experimentación. Por lo tanto, hemos desarrollado una prueba para determinar la fragilidad en ratones, que hemos denominado el “Valencia Test”.

Utilizamos ratones C57BL/6J machos, estabulados de manera individual y asignados de manera aleatoria a uno de los siguientes grupos: Sedentario (n=72) y Ejercicio espontáneo (n=72). Se comparó una vida sedentaria frente a una vida activa en términos de longevidad y aplicamos el “Valencia Test” para cuantificar la fragilidad mediante la evaluación de la pérdida no intencional de peso, la fatiga y la lentitud de la marcha, la debilidad y la baja actividad física.

Los animales sedentarios se convertían en frágiles a medida que envejecían. A pesar de que realizar ejercicio espontáneo durante toda la vida no prolonga la longevidad, sí que observamos una significativa prevención de la fragilidad. Esta mejora se acompañó de un aumento significativo en la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético y en los niveles del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) en el cerebro de los ratones.

Los radicales libres juegan un importante papel en el envejecimiento. En nuestro estudio el envejecimiento se asoció a un aumento en la peroxidación lipídica en plasma determinada mediante la cuantificación de los niveles de malondialdehído (MDA). El ejercicio espontáneo no previno el aumento, asociado al envejecimiento, en el estrés oxidativo.

El estado antioxidante de un individuo puede ser importante en la determinación de la aparición de enfermedades dependientes de la edad y en el mantenimiento de la salud. Por lo tanto, también no planteamos estudiar la inducción de dos genes de longevidad, la enzima antioxidante Manganese Superóxido Dismutasa (Mn-SOD) y la Glutación Peroxidasa (GPx). Para este fin utilizamos dos técnicas diferentes: la RT-PCR y la determinación de sus actividades enzimáticas. Encontramos un aumento en la actividad de las dos enzimas antioxidantes a medida que los ratones envejecían, en ambos grupos experimentales. Los ratones corredores mostraron un aumento significativo en la actividad de la Mn-SOD en el último periodo estudiado (28 meses).

Finalmente se estudió el perfil metabólico en plasma en ratones de 20 meses de edad mediante la Resonancia Magnética Nuclear. El ejercicio espontáneo se asoció con diferencias significativas en el metaboloma circulante. El lactato, la alanina y la glucosa en plasma fueron menores en los ratones que tenían libre acceso a la rueda de correr con respecto a los ratones sedentarios. Por el contrario, el glicerol, el citrato y los ácidos grasos fueron más altos en el plasma de los ratones activos en comparación con los ratones inactivos. Estas diferencias

indican una mejor salud metabólica en el grupo activo que en los roedores inactivos.

Una de las preocupaciones actuales entre los profesionales de la salud es si el aumento de la longevidad aumentará excesivamente la discapacidad y el gasto sanitario. Por tanto, las mejoras en la salud y en la prevención de la disfunción son tan importantes como los aumentos en la longevidad. Nuestros resultados muestran que el ejercicio físico espontáneo durante toda la vida es una intervención muy prometedora para la modulación de la calidad de vida.

## *2. INTRODUCCIÓN*





## 2.1 Ejercicio físico

Los conceptos de “ejercicio físico”, “actividad física” y “deporte” se suelen emplear como sinónimos, pero hay diferencias importantes entre ellos. Con el término “Actividad física”, englobamos a cualquier acción fisiológica y voluntaria del aparato locomotor. La actividad física implica un gasto energético mayor que el gasto metabólico basal.

“Ejercicio físico” se considera la actividad física, generalmente no competitiva ni reglada, que se realiza con objeto de obtener desarrollo físico y/o psíquico armónico, como actividad educativa, como juego, para mantener la salud o con fines terapéuticos. Algunos elementos de la forma física son; la capacidad cardiorespiratoria, la fuerza y resistencia muscular, la flexibilidad y el equilibrio. Consideramos deporte a cualquier actividad física competitiva, reglamentada por normas institucionales, realizada en público, profesionalizada, y que tiene como objetivo principal ganar al adversario y obtener una recompensa (Ortega, E., et al. 1999).

En la actualidad, hay un aumento en la vida sedentaria; el avance tecnológico hace que trabajemos menos de forma física que nuestros antepasados (Lakka, T. A., et al. 2003). Este nuevo modelo inactivo de comportamiento ha producido, a su vez, un incremento exponencial de las enfermedades denominadas hipocinéticas; afectando directamente a la calidad de vida y poniendo en entredicho las ventajas y virtudes de este supuesto bienestar (Sorensen, T. I. 2000) (Marcus, B. H., et al. 2000).

Además, se percibe una clara relación inversamente proporcional entre actividad y riesgo de muerte. Por lo tanto, el perfil de riesgo que presenta

dicha asociación indica que cualquier tipo de ejercicio es mejor que no hacer nada (Cotman, C. W., et al. 2002) (Holloszy, J. O. 1997).

### **2.1.1 Ejercicio físico espontáneo y forzado en animales**

Los roedores son animales activos y sociables. La práctica de ejercicio en una rueda adherida a su jaula es considerado ejercicio voluntario o espontáneo. Hay que tener en cuenta que la mayor actividad por parte de estos, se efectúa por la noche; por lo que un registro continuo de esta actividad podría favorecer la realización de estudios en donde el animal decide cuando realiza ejercicio. Por otro lado, si un animal es puesto en una cinta o tapiz en donde se manipula la velocidad del ejercicio, durante un tiempo y con una motivación específica, se considera ejercicio forzado.

Es imprescindible la definición precisa y correcta de los objetivos para la elección del mejor tipo de ejercicio físico a realizar por parte de los ratones. Ya sea espontáneo, forzado o la combinación de ambos.

### **2.1.2 Efectos beneficiosos del ejercicio físico**

Los efectos beneficiosos del ejercicio físico regular (no agotador) se conocen desde hace mucho tiempo. En las últimas décadas, el ejercicio físico se ha utilizado en el tratamiento de diversas patologías (Pedersen, B. K., et al. 2006). Alguno de estos ejemplos podrían ser el tratamiento del síndrome metabólico, patología pulmonar y cardiovascular, patología

muscular y ósea, cáncer, depresión, asma o diabetes tipo II (Oldridge, N. 2003, Roberts, C. K., et al. 2005).

Desde la publicación de Morris y colaboradores en los años 50 (Morris, J. N., et al. 1953) y el excelente trabajo de Paffenbarger y colaboradores en los años 70 (Paffenbarger, R. S., et al. 1975, Paffenbarger, R. S., Jr., et al. 1978), se han desarrollado una gran cantidad de estudios prospectivos a largo plazo, que han evaluado el riesgo relativo de muerte por cualquier causa en relación con distintas patologías asociadas con la inactividad física (Powell, K. E., et al. 1987, Berlin, J. A., et al. 1990, Lee, I. M., et al. 1995, Wannamethee, S. G., et al. 1998, Blair, S. N., et al. 2001, Kohl, H. W., 3rd 2001).

Diversos trabajos han demostrado que llevar una vida activa se ha asociado a una disminución del riesgo de muerte superior al 50% (Myers, J., et al. 2002, Myers, J., et al. 2004). Un aumento en la cantidad de actividad física semanal de 1000 kcal o un aumento de 1 MET (Un MET equivale a un consumo de oxígeno, en un adulto, de aproximadamente 3,5 mL por kg de peso y por minuto o 1 kcal por kg y por hora) en la capacidad aeróbica, supone un beneficio que se traduce en una disminución de la mortalidad del 20%. Este nivel de actividad es equivalente a una caminata de una hora, a una intensidad moderada, 5 días a la semana (Myers, J., et al. 2004). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que una actividad física que suponga un menor consumo energético también puede provocar efectos beneficiosos, especialmente en personas con una muy baja condición física y mayores (Warburton, D. E., et al. 2006). De hecho, el American College of Sports Medicine (ACSM) ha determinado que los efectos beneficiosos sobre

la salud aparecen con actividades físicas que suponen gastos energéticos inferiores a 700 kcal a la semana, obteniendo beneficios adicionales cuando se trabaja a intensidades mayores (Warburton, D. E., et al. 2006).

Existen dudas acerca ya no de la cantidad óptima (frecuencia, duración) sino de la intensidad (moderada o agotadora) del ejercicio físico para obtener efectos beneficiosos sobre la salud. A grandes rasgos se considera que, si se realiza ejercicio físico de baja intensidad tales como la jardinería o las “caminatas” (2-4 METs), estos deben ser mantenidos durante periodos de tiempo largos (60 minutos al día) la mayoría de los días de la semana; mientras que en el caso de ejercicios de alta intensidad, tales como la carrera o natación (6-8 METs) es suficiente con mantenerlos 30 minutos al día durante, al menos, 3 días a la semana (Warburton, D. E., et al. 2006). Las características individuales de los sujetos que inician un programa de entrenamiento también son un factor relevante.

Se sabe que las personas con una condición física pobre pueden conseguir mejoras en su capacidad aeróbica con intensidades de entrenamiento bajas (4-6 METs); mientras que aquellas que presentan una condición física mayor, necesitan una intensidad de ejercicio superior para conseguir mejoras en su capacidad aeróbica (Shephard, R. J. 2001).

Existen estudios que muestran que la intensidad del ejercicio se correlaciona de forma inversa y lineal con la mortalidad (Lee, I. M., et al. 2001). Sin embargo, también se sabe que algunos de los efectos beneficiosos del ejercicio físico moderado se pierden con el agotamiento (Gomez-Cabrera, M. C., et al. 2008). Mientras que el riesgo de muerte disminuye con la realización de ejercicio físico de forma creciente hasta alcanzar las 3.500

kcal por semana, este riesgo empieza a aumentar si se alcanzan valores superiores a 3.500 kcal por semana (Paffenbarger, R. S., Jr., et al. 1986). Por otra parte, se ha demostrado que la prevalencia de hipertensión y enfermedad cardiovascular es alta, tanto en sectores de población que no realizan ningún tipo de actividad física aeróbica (0 kcal/semana) como en aquellos que superan las 2.500 kcal/semana (Quinn, T. J., et al. 1990). En este mismo sentido, se han publicado incrementos en el riesgo de enfermedad cardiovascular y aumentos en la mortalidad en deportistas de élite (Knez, W. L., et al. 2006), así como niveles elevados de colesterol LDL oxidado en este sector poblacional (Sanchez-Quesada, J. L., et al. 1995). Estos datos sugieren un aumento moderado de la actividad aeróbica como recomendación de ejercicio saludable.

Por otra parte, se sabe que el ejercicio físico que se realiza hasta el agotamiento (especialmente de forma esporádica y en sujetos desentrenados) provoca daños estructurales en la célula muscular, reacciones inflamatorias (incrementos en la actividad de enzimas citosólicas en plasma), así como desestructuración de líneas Z (Armstrong, R. B., et al. 1983). Parte de este daño se produce por un aumento en la generación de radicales libres durante el proceso de contracción muscular, y se puede prevenir optimizando la dieta y, más concretamente, suplementando con nutrientes antioxidantes (Jackson, M. J. 1987, Vina, J., et al. 2000). Además, los radicales libres están relacionados con importantes procesos fisiológicos como el envejecimiento; así como con la patogénesis de diversas enfermedades tales como diabetes, patología cardiovascular, inflamación y enfermedad pulmonar (Gomez-Cabrera, M. C., et al. 2008).

La práctica de ejercicio modifica de forma muy significativa el aparato respiratorio, el sistema músculo-esquelético, así como el sistema cardiovascular. Evidencias recientes demuestran que la práctica usual de ejercicio físico retrasa la aparición de enfermedades neurológicas y mejora las capacidades cognitivas (van Praag, H., et al. 1998) (Pate, R. R., et al. 1995). Se ha visto que mediante ejercicio físico aumenta la neurogénesis, además de la capacidad de aprender y conservar las habilidades cognitivas (Cotman, C. W., et al. 2002). Uno de los primeros factores a tener en cuenta, es que el ejercicio físico aumenta la plasticidad del cerebro (Cotman, C. W., et al. 2002), mejora la capacidad de aprendizaje y la memoria (van Praag, H., et al. 1998). Además de esto, previene o retrasa la pérdida de funciones cognitivas. A todo ello hay que añadir que mejora el pronóstico y reduce la incidencia de Ictus (Accidentes cerebro-vasculares), destacando también su papel como antidepresivo (Colcombe, S. J., et al. 2004).

Diversos autores han demostrado que el ejercicio físico moderado en roedores puede aumentar la vida media en un 9% aproximadamente. Sin embargo, los efectos de este tipo de ejercicio sobre la vida máxima son, actualmente, objeto de debate (Holloszy, J. O. 1998, Navarro, A., et al. 2004). Por otro lado, estudios realizados en ratas han demostrado que la combinación de ejercicio voluntario y restricción calórica tiene un mayor efecto sobre la esperanza de vida máxima que el ejercicio físico como única variable (Holloszy, J. O. 1992).

Hay que tener en cuenta que estudios realizados en seres humanos utilizando una dieta equilibrada, mejora de hábitos de vida y la práctica de ejercicio físico, presenta efectos favorables en el ser humano (Herder, R., et al. 2004). En este sentido, un reciente trabajo realizado por cinco

especialistas de universidades y centros de investigación médica de Noruega, Reino Unido, Australia y Estados Unidos, han analizado el valor combinado de cuatro parámetros de conducta sobre la longevidad. Estos parámetros son: tabaquismo, consumo de alcohol (más de 112 gramos de alcohol semanales), ejercicio físico (menos de 2 horas semanales) y consumo de frutas y hortalizas (menos de 3 piezas diarias). Los investigadores han llegado a la conclusión de que no respetar ninguno de estos principios saludables equivale a una pérdida de 12 años de vida de promedio (Kvaavik, E., et al.2010).

## 2.2 Envejecimiento

### 2.2.1 Concepto

Actualmente, no disponemos de una definición aceptada de manera universal sobre envejecimiento. Por un lado, Denham Harman (Harman, D. 1998) define el envejecimiento como la acumulación de cambios en el organismo con el tiempo. Este deterioro lleva a modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen como consecuencia de éste. Esto supone una disminución de la capacidad adaptativa en cada uno de los órganos, aparatos y sistemas del individuo; además de causar un aumento en la probabilidad de sufrir una enfermedad o muerte secundaria al deterioro de las estructuras y sus funciones.

Otro investigador, Bernard Strehler, conocido por sus teorías del envejecimiento desde 1944 y que refleja en el libro "Time, Cells, and Aging", define el envejecimiento a través de cuatro premisas:

- Universal: El envejecimiento está asociado en mayor o menor medida a todos los individuos de una especie.
- Intrínseco: Las causas del envejecimiento son de origen endógeno; por lo que no dependen de factores externos o ambientales.
- Progresivo: Se da desde el nacimiento de manera paulatina.
- Deletéreo: Se considera un proceso del envejecimiento a todo fenómeno que provoque un daño.



## 2.2.2 Consecuencias del envejecimiento

El envejecimiento afecta prácticamente a todas las funciones fisiológicas mediante una pérdida de su funcionalidad. Es un proceso post-madurativo que conduce a una disminución de la eficacia de la homeostasis y un incremento en la vulnerabilidad del organismo. Diversos autores consideran que el envejecimiento no es el resultado de un mecanismo aislado, sino que comprende un conjunto de fenómenos que actúan en consonancia, es decir, tiene carácter multifactorial. Durante el envejecimiento, se observa una pérdida de la capacidad de mantener estable el medio interno del individuo frente a perturbaciones ambientales como pueda ser el estrés, cambios ambientales, infecciones, etc.

El ejercicio físico regular parece retardar la acumulación de daño celular y la disfunción fisiológica que es característica del proceso de envejecimiento. Existe una amplia evidencia de la reducción de la masa muscular esquelética asociada al envejecimiento; a lo que hay que añadir los efectos beneficiosos del ejercicio regular en el aumento de masa y fuerza muscular en personas de edad avanzada (Davidson, S. R., et al. 2006, Figueiredo, P. A., et al. 2009).

El ejercicio atenúa los cambios de expresión génica que ocurren normalmente en el corazón envejecido (Whitfield, C. W., et al. 2003). Los resultados de experimentación animal sugieren que los mecanismos fisiológicos de adaptación inducidos por el ejercicio físico, pueden retrasar significativamente el efecto del envejecimiento en el músculo cardíaco (Whitfield, C. W., et al. 2003).

El envejecimiento no puede ser considerado una enfermedad; pero sí las alteraciones en el organismo como consecuencia de este, pues pueden

predisponer al individuo a alteraciones, patologías o incluso la muerte (Troen, B. R. 2003).

Estudios recientes realizados en humanos demuestran que la actividad física se asocia a un menor riesgo de enfermedades y de muerte prematura en personas mayores de 70 años (Sun, Q., et al. 2010).

### **2.2.3 Longevidad**

#### **2.2.3.1 Esperanza de vida media y máxima**

Dentro del término “longevidad” se incluyen dos conceptos diferentes como indicadores de esperanza de vida que hay que distinguir: La vida máxima (que es la que nos marca la edad máxima que un individuo puede alcanzar en una determinada especie) y, por otro lado, la vida media (se define como la esperanza media de vida al nacer de un individuo de una determinada especie) (Lopez-Torres, M., et al. 1991).

Desde mediados del s.XIX hasta el momento actual, la esperanza de vida media de las mujeres ha pasado en un mundo desarrollado desde los 45 años hasta más de 80 años; lo que corresponde a un incremento de 2,3 años por década. En el caso de los varones, este incremento de la esperanza de vida también se ha observado, aunque más paulatinamente y apareciendo mayores diferencias entre sexos desde el 2006. El Instituto Nacional de Estadística (INE) declara que la esperanza de vida de las mujeres españolas alcanza los 83.78 años, mientras que la de los varones se sitúa en 77.33 años.

La mejora de las condiciones sanitarias, el desarrollo de las tecnologías y avances médicos provocan un constante crecimiento de la esperanza de vida en la especie humana y un descenso de la mortalidad. Esto ha conllevado un aumento considerable de enfermedades asociadas a la edad. Por ello, cobran gran importancia enfermedades neurodegenerativas (como la Enfermedad de Alzheimer), el cáncer, la aterosclerosis, accidentes cerebrovasculares, isquemias y, en general, todas aquellas que afectan con más probabilidad a partir de una edad avanzada (Ver figura 2.1). A esto hay que añadir que la natalidad en España desciende un 1,7% cada año, habiendo un aumento de personas de edad avanzada.

Aunque los avances en la tecnología y en la investigación dan sus frutos, es decir, han conseguido aumentar la esperanza de vida media en distintas especies mediante múltiples estrategias (antioxidantes, ejercicio,...) (Sohal, R. S., et al. 1996, Holloszy, J. O. 1998), la esperanza de vida máxima sólo se ha visto modificada mediante una restricción calórica (Swan, P. B. 1997).

Esto se conoce desde 1934 gracias a McCay y posteriormente a que otros investigadores corroboraron su teoría (Walford, R. L., et al. 1995, Swan, P. B. 1997).

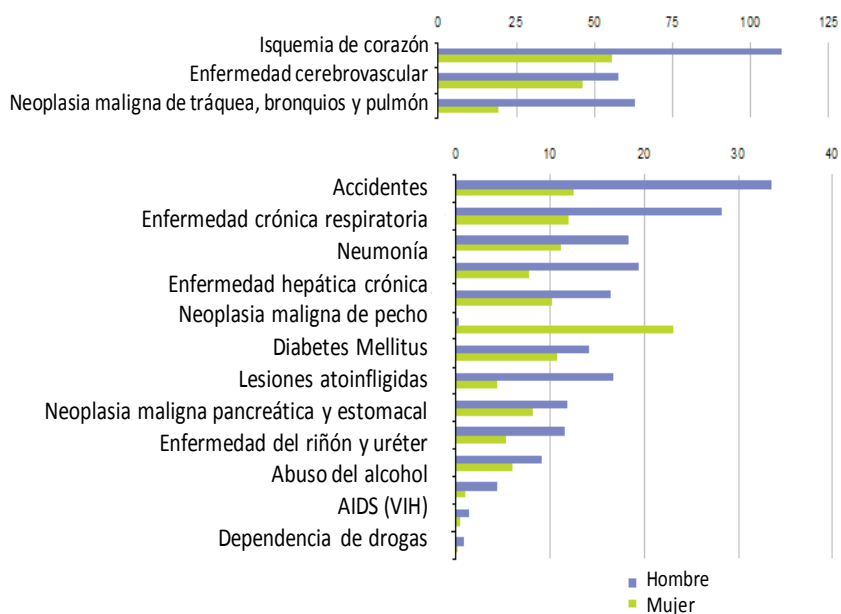


Figura 2.1 Ratio estandarizado de muerte

En relación a lo mencionado y tras la observación de la importancia del concepto de envejecimiento y el aumento de la esperanza de vida, diversos autores han destacado la importancia de crear un modelo animal que reproduzca el envejecimiento humano, los síntomas y que se considere un buen modelo de estudio (Walston, J., et al. 2006).

### 2.2.4 Teorías del envejecimiento

A lo largo del tiempo, han existido diversas teorías para dar cabida al fenómeno del envejecimiento y, a día de hoy, se continúa sin saber a ciencia cierta cuáles son las causas que provocan dichos cambios como consecuencia del tiempo. Hay que destacar que el envejecimiento ocurre a todos los niveles: a nivel molecular, a nivel celular y a nivel orgánico. Su

dificultad y complejidad para desarrollar una definición, ha postulado diversas teorías; pero ninguna de ellas es capaz de explicarlo por sí sola. Dentro de las diferentes teorías podemos encontrar las siguientes:

### **2.2.4.1 Teorías Orgánicas**

#### **2.2.4.1.1 Inmunológica**

Esta teoría postula que en el proceso de envejecimiento hay una alteración del sistema inmune; se atrofia el timo, hay una menor capacidad de los linfocitos para producir anticuerpos, un aumento de enfermedades autoinmunes y de cáncer y una menor capacidad de las células T para producir factores de crecimiento (Stankiewicz, W., et al. 2011). La respuesta inflamatoria es parte de la inmunidad innata y se presenta cuando los tejidos son lesionados por bacterias, traumas, toxinas, calor o cualquier otra causa; siendo iniciada por citoquinas y quimioquinas que actúan sobre los leucocitos para activarlos y atraerlos al foco de infección (Abbas, A. K., et al. 2004).

Harman afirma que el descenso de las capacidades del sistema inmune, que está ligado a la edad, es consecuencia del incremento de las reacciones de autoinmunidad. La disminución de la capacidad de las células T provoca un aumento de la autoinmunidad (Harman, D. 1981). Por lo que se deduce que cambios post-traduccionales mutagénicos en las proteínas inducirían un reconocimiento apropiado del sistema inmune como extraño. Pero al estar disminuida la capacidad en el envejecimiento del sistema inmune, esta proteína podría no ser reconocida y desarrollar funciones dañinas.

A día de hoy, destacan algunas de las patologías más frecuentes en el envejecimiento, como son: diabetes, la obesidad (Fresno, M., et al. 2011), hipertensión arterial (Peeters, A. C., et al. 2001), arterioesclerosis (Libby, P. 2003), etc. pues son enfermedades muy relacionadas con factores inflamatorios.

En relación a esto, se observó que con el aumento de la edad se daba un aumento de moléculas pro-inflamatorias como las citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ), prostaglandinas, enzimas (iNOS, COX-2), y factores de transcripción (NRF-1) (Chung, H. Y., et al. 2001). La regulación de la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias ha suscitado mucho interés en los últimos años. El equilibrio entre ambas está siendo muy estudiado en enfermedades infecciosas, autoinmunes, inflamatorias y alérgicas (Schlecht, S., et al. 1996, Verbrugghe, E., et al. 2011).

Chung postula una hipótesis inflamatoria del envejecimiento en la que defiende que con este se produce un desequilibrio entre los factores anti y pro- inflamatorios a favor de estos últimos, dando lugar a un estado continuo pro-inflamatorio que conlleva daño tisular (Chung, H. Y., et al. 2001).

### **2.2.4.1.2 Neuroendocrina**

Esta teoría se basa en que la causa del envejecimiento es la disminución de la capacidad funcional del sistema nervioso y endocrino esencial para la homeostasis. Es decir, la homeostasis mantiene estable el medio interno frente a cambios o perturbaciones externas. Por causa de la degradación

del sistema nervioso, también se ven afectados todos los órganos sujetos a su control. Manipulaciones dietéticas como la restricción calórica apoyan esta teoría y, como hemos comentado antes, la restricción calórica retrasa el envejecimiento, disminuye los niveles de insulina y de glucosa en sangre. Además esta estrategia de intervención aumentando a su vez los glucocorticoides de forma moderada, la secreción de adrenalina y de otras catecolaminas procedentes de las glándulas adrenales, así como también activa el sistema nervioso simpático (Kemnitz, J. W., et al. 1994).

## **2.2.4.2 Teorías Celulares**

### **2.2.4.2.1 Límite de la duplicación celular**

Durante muchos años, se pensó que la célula humana era capaz de proliferar de forma indefinida en medio de cultivo; pero esto fue rebatido por Hayflick (Hayflick, L. 1980) que, tras el cultivo de fibroblastos humanos, descubrió que estos tenían un número limitado de divisiones (50 veces). Este número de divisiones han sido aumentadas o reducidas por los avances en los medios de cultivo y el desarrollo de las técnicas de cultivo celular.

Posteriormente, también se confirmó otro hallazgo de Hayflick: que el envejecimiento se asocia a una disminución de la capacidad proliferativa de las células (Hayflick, L. 1980). Las células se adaptan a las condiciones de cultivo y proliferan hasta alcanzar un punto en el que, sin remedio, empiezan a modificar tamaño, forma y aspecto hasta que cesan en su división.

Ya más actual, tenemos la teoría que defiende que son los telómeros los que marcarán el mantenimiento de la molécula de DNA. Lo que se ha visto es

que en la división celular se van perdiendo fragmentos de DNA de forma paulatina en los extremos (telómeros). Por tanto, se ha visto que según avanza la edad, los telómeros van acortándose produciendo una activación crónica del p53, que tiene como resultado una disminución de la proliferación y un aumento de la apoptosis celular (Kelly, D. P. 2011).

### **2.2.4.3 Teorías del envejecimiento programado**

#### **2.2.4.3.1 Programa genético de envejecimiento**

La teoría genética del envejecimiento propone que el genoma nuclear, actuando como un “reloj celular”, es el responsable de programar los cambios que irán presentándose en el desarrollo de un organismo a lo largo de su vida, desde la concepción hasta el envejecimiento, pasando por la madurez sexual (Flodin, N. W. 1984).

Así, el ciclo vital de las distintas especies estaría determinado por un control genético del mismo. No obstante, existen también los que opinan que, dado que la selección natural disminuye marcadamente tras la edad reproductiva (momento en el que aparece el envejecimiento), difícilmente podría haber evolucionado un programa genético de envejecimiento activo.

#### **2.2.4.3.2 Teoría evolutiva**

Esta teoría complementa a las anteriores dando su visión sobre por qué cada especie animal tiene una determinada longevidad máxima o velocidad



de envejecimiento, en vez de abordar el tema desde un punto de vista de decadencia y plantearse cómo envejecemos.

Una de estas teorías evolutivas con más interés es la que nos habla de la distribución de la energía entre el esfuerzo reproductivo y el mantenimiento de los órganos corporales; se basa en una relación inversa entre potencial reproductor y longevidad. Esto pone de manifiesto que los animales que más se reproducen viven menos y viceversa (los animales que tienen una menor capacidad reproductiva tienen una mayor longevidad).

Otra hipótesis de esta teoría es la “Presión de predación” desarrollada por Austad (Austad, S. N. 1997), que hace referencia a la relación inversa que existe entre los ataques de predadores a una especie y su longevidad. Si una especie es poco atacada, la selección natural actúa haciendo que la longevidad de dicha especie sea mayor.

La probabilidad de reproducción es igual a cero desde el cigoto hasta la madurez reproductiva. Más tarde, poco después de la madurez, alcanza un valor máximo. Luego disminuye debido a la probabilidad acumulativa de muerte.

El valor selectivo de un gen depende de cómo afecta a la probabilidad de reproducción total. La selección de un gen que confiere una ventaja en una edad y una desventaja en otra dependerá, no sólo en las magnitudes de los mismos efectos, sino también en los tiempos de los efectos. Por lo que dicha teoría es difícil de explicar si nos planteamos cómo puede transmitirse un gen para aumentar la longevidad entre las generaciones, si los individuos

más viejos tienen un menor grado de reproducción que los jóvenes (Williams, G. C. 1957).

#### **2.2.4.4 Teorías moleculares**

El paso del tiempo produce cambios en las moléculas y en los elementos estructurales de las células, que darán lugar a la alteración de sus funciones.

##### **2.2.4.4.1 Acumulación de productos de desecho**

Esta teoría se basa en la hipótesis de que con el paso del tiempo se produce una acumulación de productos de desecho en el interior de la célula, especialmente en las células postmitóticas. Uno de estos productos de desecho son los granulos de lipofucsina. Estos producen a la larga afectación en las funciones celulares. Estos compuestos insolubles parecen provenir en gran medida de los lisosomas, siendo esto perjudicial para la reproducción. Aunque con respecto a la lipofucsina, no está claro si son perjudiciales o, si en cambio, podrían ser utilizadas como un marcador de envejecimiento.

##### **2.2.4.4.2 Entrecruzamientos (*Cross-linking*).**

Esta teoría postula que la edad conlleva un aumento de formación de enlaces moleculares entre proteínas o cadenas de ácidos nucleicos en el interior de la célula. Esta teoría fue descrita por Johan Björksen (Bjorksten, J. 1976). Este aumento de sustancias que favorecen la unión de macromoléculas, como el DNA o las proteínas, hacen que aumente la

resistencia de estas a su degradación, pudiendo producir en el DNA mutaciones, disminuyendo la permeabilidad y la solubilidad de las macromoléculas. Ésto disminuye la elasticidad de las membranas, al tiempo que aumenta la viscosidad de los tejidos.

Se llevaron a cabo estudios más detallados en colágeno (moléculas presentes en la matriz extracelular de prácticamente todos los tejidos), y se observó que el número de puentes cruzados en el colágeno aumentaba con la edad (Wess, L., et al. 1996).

#### **2.2.4.4.3 Mutaciones somáticas y “Errores Catastróficos”**

Esta teoría propone que con el paso de los años se produce una acumulación de errores en la síntesis de las proteínas. Estos errores se producen en la enzima encargada de la transferencia de la información del DNA. Esto facilitaría la formación de nuevas enzimas degeneradas produciendo un daño celular creciente. Esta teoría fue descrita por Orgel (Orgel, L. E. 1965).

#### **2.2.4.4.4 Teoría de los Radicales libres**

La teoría de los radicales libres se puede considerar la teoría más relevante para explicar el envejecimiento y, por ello, se hará mayor hincapié en ella.

Ya en 1954, Rebeca Gerschman proporciona las primeras pinceladas sobre las variaciones del metabolismo en el envejecimiento. Habla de la formación de radicales libres a partir de un incremento de la concentración

de oxígeno (Gerschman, R., et al. 1954). Poco después, Harman enuncia la teoría de los radicales libres, postulando que es un fenómeno universal que se produce en todos los seres vivos y que consiste en la acumulación del daño oxidativo con la edad donde los radicales libres derivados del oxígeno son los responsables (Harman, D. 1956).

Esto implica que se produzca un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y los sistemas antioxidantes, que no son capaces de hacer frente a todas las especies reactivas de oxígeno que se generan a lo largo de la vida de la célula; lo que conlleva un daño en estas y, por ende, a los tejidos.

La célula posee mecanismos de defensa contra los ROS (siglas en inglés para especies reactivas de oxígeno). Parte de estos escapan a su control y reaccionan con los componentes celulares, proporcionando una desestructuración y disfunción de la célula.

Hay numerosos artículos que avalan esta teoría. Se ha demostrado una relación inversamente proporcional entre la tasa de producción de radicales libres y daño oxidativo con respecto a la esperanza de vida máxima. Los animales viejos poseen mayores niveles de oxidación que los animales jóvenes. (Stadtman, E. R. 1992, Sohal, R. S., et al. 1993).

Otra evidencia a favor de esta teoría como posible causa del envejecimiento, son todos aquellos artículos que muestran que mediante la administración de antioxidantes han logrado un aumento de la esperanza de vida media en una especie (Miquel, J., et al. 1980, Vina, J., et al. 1992, Sohal, R. S., et al. 1996).

Por otro lado, Orr en 1994 demostró que la expresión simultánea de la superóxido dismutasa cobre/zinc y de la catalasa en moscas transgénicas (*Drosophila melanogaster*) aumentaba su vida máxima respecto a las moscas control (Orr, W. C., et al. 1994).

Es bien conocido que los radicales libres de oxígeno y los peróxidos son generados de manera continua en la cadena de transporte mitocondrial (Boveris, A., et al. 1973, Chance, B., et al. 1979). Además, cerca del 1-2% del oxígeno usado por la mitocondria de mamíferos en estado 4 no da lugar a agua, sino a especies activadas del oxígeno. A raíz de lo mencionado, Miquel y colaboradores en 1980 presentan la *“Teoría Mitocondrial del Envejecimiento Celular”* (Miquel, J., et al. 1980).

Esta teoría sugiere que la senescencia es un producto derivado del ataque de los radicales de oxígeno al genoma mitocondrial en células postmitóticas fijadas. Las mitocondrias de las células postmitóticas consumen O<sub>2</sub> a velocidades altas, liberando entonces radicales de oxígeno que exceden la capacidad de las defensas antioxidantes celulares.

El hecho de que las mitocondrias de animales viejos produzcan más radicales libres que las mitocondrias de los animales jóvenes ha sido verificado científicamente por diversos autores (Sohal, R. S., et al. 1990, de la Asuncion, J. G., et al. 1996)

Estas dos últimas teorías resultan ser las más interesantes, ya que explican de forma más racional el proceso del envejecimiento; además, permite la intervención por medio de antioxidantes para retardar el proceso de envejecimiento. Las teorías de los radicales libres y de la mitocondria

podrían englobar las teorías mencionadas con anterioridad (perdida de la capacidad del sistema inmunitario, el límite de la duplicación, las mutaciones,...).

Esta gran dificultad y variedad en las teorías del envejecimiento esta principalmente ocasionada por las múltiples causas y factores que influyen en el proceso del envejecimiento y el gran desconocimiento que a día de hoy todavía existe sobre la vejez.

La teoría de los radicales libres y la teoría inmunológica tienen mucha relación entre sí, ya que ambas están involucradas en los procesos inflamatorios. Además, ambas teorías son muy estudiadas y, a día de hoy, permiten una intervención racional, por ejemplo, la administración de antioxidantes o antiinflamatorios para el retraso de los procesos de envejecimiento.

## 2.3 Radical libre

### 2.3.1 Concepto de radical libre

Un radical libre es una molécula o fragmento, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. La presencia de este electrón desapareado hace que estas especies presenten una gran reactividad. La vida media de estas especies químicas es reducida, alrededor de milisegundos, aunque esto varía en función del tipo de radical libre.

Estos átomos o moléculas tan reactivos, se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de diversas enfermedades (Cutler, R. G. 1991). Esto ha dado lugar a numerosas vías de investigación con el fin de desarrollar captadores, marcadores, inhibidores enzimáticos o moduladores de los mismos. Existen gran cantidad de radicales libres, tanto derivados del oxígeno como del nitrógeno, o incluso radicales libres del azufre. A los radicales libres compuestos por oxígeno se les llama: especies reactivas de oxígeno (ROS), mientras que las especies derivadas del nitrógeno se les llama especies reactivas del nitrógeno (RNS).

Debido a que los organismos existen y se desarrollan en presencia de oxígeno, están asociados con la generación de estas ROS, que son tóxicas y se consideran responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas (Sies, H. 1993, Halliwell, B. 1996). Se han visto implicadas en muchos procesos patológicos como el cáncer, la diabetes, patologías cardiovasculares (Byers, J. F. 1993), afecciones broncopulmonares (Slade, R., et al. 1993) así como en procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Cross, A. J., et al.

1987). También están implicados en procesos fisiológicos como en el envejecimiento (Pacifci, R. E., et al. 1991, Bondy, S. C. 1992), el daño causado por el ejercicio físico agotador(Sastre, J., et al. 1992), y otros.

### 2.3.2 Clases de radicales libres

Existe una gran variedad de radicales libres tanto de ROS como de RNS. En la siguiente tabla vienen algunos de los radicales libres más importantes y su simbología.

| ESPECIE               | SÍMBOLO        |
|-----------------------|----------------|
| Radical superóxido    | $O_2^{\cdot-}$ |
| Radical hidroperóxido | $HO_2^{\cdot}$ |
| Peróxido de hidrógeno | $H_2O_2$       |
| Radical hidroxilo     | $HO^{\cdot}$   |
| Radical alcóxilo      | $RO^{\cdot}$   |
| Radical peróxido      | $ROO^{\cdot}$  |
| Óxido nítrico         | $NO^{\cdot}$   |
| Dióxido de nitrógeno  | $NO_2^{\cdot}$ |

*Tabla 2.1 Principales especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.*

### 2.3.3 Génesis de ROS

Todos los radicales libres expuestos en la tabla anterior corresponden a especies cuya formación es endógena (en el interior del organismo), pero el



organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas, como puede ser la dieta (compuestos de naturaleza prooxidante), el humo del tabaco, la contaminación, el ozono, etc. (Ames, B. N. 1983, Pryor, W. A., et al. 1995, Rock, C. L., et al. 1996). Las especies reactivas de oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman, B. A., et al. 1982, Frei, B. 1994) como veremos a continuación.

### **2.3.4 Fuentes exógenas**

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies activadas de oxígeno son:

- Agentes antineoplásicos, tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshov, J. H., et al. 1983) que dependen de grupos quinoídeos o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
  
- La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas  $\alpha$  y  $\beta$ ) (von Sonntag, C. 1994).
  
- Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e

hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Trush, M. A., et al. 1982).

## **2.3.5 Fuentes endógenas**

### **2.3.5.1 Cadena de transporte electrónico mitocondrial**

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de la principales fuentes de radicales libres en la célula. Son muchas las patologías en las que se ha descrito que la mitocondria genera radicales libres, siendo esta la causa de estrés oxidativo que sufre la célula (Vina, J., et al. 2003).

- La producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales:

En los sistemas biológicos, la actividad metabólica celular tiene como producto unos compuestos altamente reactivos conocidos como radicales libres. Clásicamente, se ha considerado a la cadena mitocondrial como el origen de los ROS. Desde 1966 Jensen describió que la mitocondria producía peróxido de hidrógeno. La composición es a base de proteínas con capacidad redox que reducen el oxígeno a H<sub>2</sub>O que, junto con la fosforilación oxidativa, producen ATP (fuente de energía).

No obstante, a la formación de moléculas de agua hay que añadir que entre el 2 y el 5% de las moléculas de O<sub>2</sub> se activan a causa de la incorporación de un electrón en forma de O<sub>2</sub><sup>-•</sup>. Esta activación se produce proporcionalmente

a la actividad de la cadena de transporte de electrones, que no implica que esta vaya en relación con el consumo de oxígeno del ser humano (Tiidus, P. M., et al. 1996). Los complejos I, II y III (centros redox) agregan electrones a las moléculas de oxígeno formando así fuentes principales de  $O_2^{\cdot-}$ .

Una vez obtenido el  $O_2^{\cdot-}$ , este puede tomar dos caminos; o bien reducir el citocromo C en el espacio intermembrana, o bien ser convertido en  $H_2O_2$  y  $O_2$  en la matriz del mismo espacio intermembrana.

En el caso en el que se produjese un aumento constante en la actividad de la mitocondria, se daría una generación continua de  $O_2^{\cdot-}$ , pudiendo reducir metales de transición y así dar  $OH^{\cdot}$  o interaccionar con el NO formando  $ONOO^{\cdot}$  (Turrens, J. F. 2003).

Existen diferentes estudios que defienden que la liberación de ROS se da cuando se alcanza el complejo IV de la membrana mitocondrial (Han, D., et al. 2003).

En la actualidad, se ha desarrollado una teoría que incluye otros fenómenos como la isquemia-reperfusión o la producción de ácido láctico, como otras fuentes de ROS. Así mismo, también defiende que las condiciones ambientales podrían modular el grado de síntesis de ROS a partir de estas fuentes y condicionar una insuficiencia en la compensación traduciendo daño molecular y estrés oxidativo.

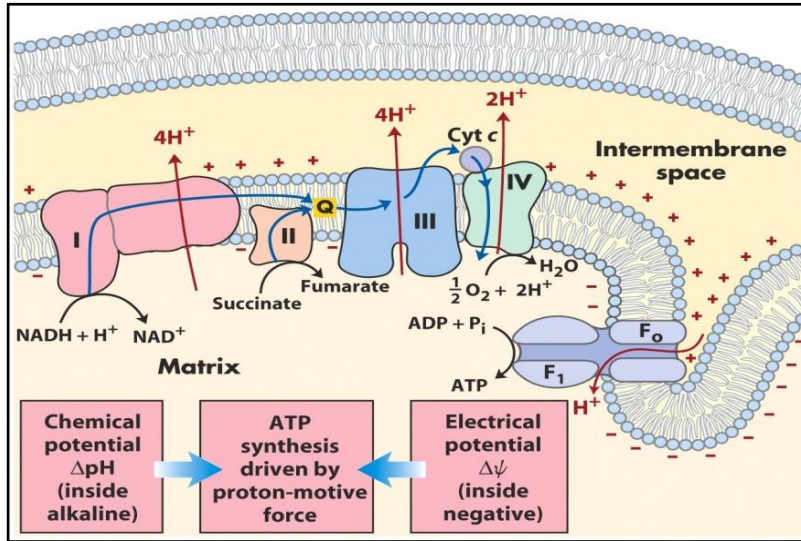


Figura 2.2 Cadena de transporte electrónico. Libro Lehninger “Principios de Bioquímica” edición: 2000.

Como se muestra en la figura 2.2, el complejo I es el paso de NADH a ubiquinona. Esto se obtiene mediante la catalización de dos procesos acoplados, la transferencia de un ion hidruro del NADH y un protón de la matriz hacia la ubiquinona y la transferencia de cuatro protones de la matriz al espacio intermembrana. Por lo tanto, el complejo I es una bomba de protones que funciona a través de la transferencia electrónica.

El complejo II: se trata de un enzima que participa en el ciclo de Krebs, es un complejo más pequeño y sencillo que el complejo I. Presenta un FAD y un centro Fe-S, haciendo que los electrones pasen desde el succinato al FAD, y desde este a la ubiquinona a través de los centros FE-S. Por tanto, el resultado final es la reducción de la ubiquinona, que será reoxidada en el siguiente complejo.

El complejo III es también conocido como complejo citocromo  $bc_1$  o ubiquinona-citocromo oxidoreductasa. En este paso se lleva a cabo la transferencia de electrones desde la ubiquinona reducida hasta el citocromo C. Esto tiene como resultado la translocación de cuatro protones por cada par de electrones que llegan al citocromo C. Una vez el citocromo C recibe el electron, se desplaza hacia el complejo IV para cederlo.

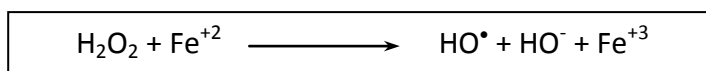
El complejo IV es el último paso de la cadena respiratoria, que también se conoce como citocromo oxidasa y transporta electrones desde el citocromo C al oxígeno. El enzima consume cuatro protones de la matriz y convierte el oxígeno en agua, bombeando otro protón hacia el espacio transmembrana. Esta reducción del oxígeno tiene como consecuencia una liberación de elementos intermedios reducidos incompletamente, dando como resultado peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo libre.

El mantenimiento del control respiratorio depende de la integridad de la membrana mitocondrial, si esta recibe algún daño, se desacopla el transporte de electrones y la síntesis de ATP. La mitocondria que consume la misma cantidad de oxígeno en estado III que en estado IV esta desacoplada.

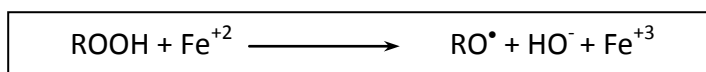
La producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ERO) aumenta cuando el aporte de sustrato a la cadena de transporte electrónico mitocondrial excede la demanda energética, es decir, en condiciones cercanas al estado del estado IV, en las cuales el cociente ATP/ADP es elevado. En estas condiciones, aumenta la presión parcial de oxígeno y como hemos dicho antes, las condiciones ambientales pueden incrementar la producción de ERO (Skulachev, V. P. 1996).

### 2.3.5.2 Reacción de Fenton-Haber-Weiss

Consiste en la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por iones de metales de transición. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Sin embargo, en presencia de iones de metales de transición (sobre todo ion ferroso,  $\text{Fe}^{+2}$ , y, en menor medida, el cuproso,  $\text{Cu}^+$ , y otros iones). Fenton descubrió a finales del siglo XIX (Fenton 1894), que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezcla de peróxido de hidrógeno y  $\text{Fe}^{2+}$  (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss quienes dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el peróxido de hidrógeno se reduce formando radical hidroxilo y ion hidroxilo, y el metal correspondiente se oxida por cesión de un electrón a la especie que se reduce (Haber F., a. W. J. 1934). La representación de la reacción es la siguiente:

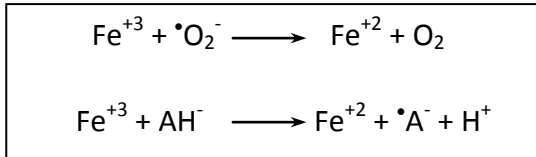


Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El  $\text{Fe}^{+2}$  se oxida a  $\text{Fe}^{+3}$  con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell, B., et al. 1986). No obstante, el ion férrico puede a su vez, ser reducido por el ascorbato ( $^{\bullet}\text{A}^-$ ) y por el radical Superóxido (Frei, B.

1994) con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



La reducción del agua oxigenada catalizada por los metales puede entenderse con las reacciones presentadas con anterioridad. Sin embargo, no está del todo claro cómo los iones metálicos son capaces de actuar como catalizadores redox en sistemas biológicos mediante la reacción de Fenton y Haber-Weiss. Los procesos de captación y distribución del hierro, y de los iones metálicos en general, están muy finamente regulados en los mamíferos. Contienen un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina...) que actúan como reserva de iones metálicos y que, además, impiden que estos iones participen en reacciones redox (Halliwell, B. 1991, Rouault, T. A., et al. 1996).

## **2.4 Estrés oxidativo**

### **2.4.1 Concepto**

Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células del cuerpo y son necesarias para la salud. Pero el proceso debe ser controlado, ya que pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas. Para ello, el organismo necesita una protección antioxidante (Halliwell, B. 1996). Como ya hemos visto anteriormente, la producción de radicales libres es imprescindible para la vida celular y en condiciones normales no causan daño.

El problema para nuestra salud y bienestar se establece cuando se produce un desequilibrio entre la ERO (las especies prooxidantes) y los antioxidantes. Por lo que el estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes a favor de la primeras (Sies, H. 1985, Halliwell, B. 2007). A través de esto, puede ocasionarse daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, daño en el DNA, etc.

#### **2.4.1.1 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas**

##### **2.4.1.1.1 Daño oxidativo a lípidos**

Los lípidos y más concretamente los ácidos grasos insaturados son las biomoléculas más vulnerables al ataque de los radicales libres (Sies, H. 1986, Cheeseman, K. H., et al. 1993). Los radicales libres que pueden iniciar esta



reacción son: el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ), el peróxido ( $\text{ROO}^\cdot$ ), el alcóxilo ( $\text{RO}^\cdot$ ) y el alquílico ( $\text{R}^\cdot$ ).

Este ataque por parte de los radicales libres a los lípidos se denomina peroxidación lipídica. Esta es, generalmente, inducida por el ataque de un radical libre a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, desprendiendo un átomo de hidrógeno y formando un radical alquílico (Frei, B. 1994, Halliwell, B. 1994). Esta reacción se produce significativamente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se estabilizan por resonancia con el doble enlace. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el  $\text{O}_2$  y forma un radical peróxido,  $\text{R-COO}^\cdot$  (ver Figura I. 10b). Los radicales peróxido pueden reaccionar a su vez con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes (ver Figura I. 10c), se forma un radical alquílico ( $\text{R}'\text{-CH}^\cdot$ ) y un peróxido lipídico ( $\text{R-COOH}$ ), con lo que se propaga la reacción en cadena de los radicales (Halliwell, B. 1994).

El ataque de un radical libre da como resultado un gran número de especies reactivas. La peroxidación lipídica se considera un factor importante en el envejecimiento de las células aeróbicas (Lippman, R. D. 1985) y, además, el daño causado por esta oxidación hace que disminuya la fluidez de la membrana (Shigenaga, M. K., et al. 1994).

Existen varias mediciones que pueden determinar la peroxidación lipídica: etanol y pentano exhalados, el malondialdehído (MDA) y el ácido tiobarbitúrico. El MDA es un parámetro estable en el plasma de animales, y ha sido utilizado como un marcador en estudios de ejercicio físico (Higuchi, M., et al. 1985, Satchek, J. M., et al. 2003).

#### **2.4.1.1.2 Daño oxidativo a proteínas**

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo a nivel del grupo carbonilo y, principalmente, por el radical hidroxilo (Stadtman, E. R. 1992). Entre los aminoácidos, hay algunos que presentan una mayor predisposición de ser oxidados como: la cisteína, la metionina, la histadina, el triptófano, la fenilalanina y la tirosina (Davies, K. J. 1987). Este fenómeno oxidativo puede dar como resultado cambios estructurales y, por lo tanto, cambios funcionales de las proteínas.

Los radicales libres están condicionados por el medio que les rodea, es decir, en función de la concentración de oxígeno presente, promueven o provocan aspectos distintos (Stadtman, E. R. 1992):

- En condiciones anaeróbicas, promueven el entrecruzamiento entre proteínas.
  
- En presencia de oxígeno, los radicales provocan la fragmentación de la cadena peptídica.

El envejecimiento provoca una acumulación de proteínas dañadas. Esto se debe a que con la edad, la velocidad de la oxidación es mayor y/o se produce una disminución de la capacidad de degradación de las mismas (Stadtman, E. R. 1992).

#### **2.4.1.1.3 Daño oxidativo al DNA**

Los radicales libres tienen la capacidad de producir lesiones a nivel de las distintas estructuras que componen el DNA. De hecho, el oxígeno tiene el recurso de formar radicales peróxido al unirse a las bases o al azúcar estructural del DNA. A todo esto hay que añadir la formación de puentes cruzados DNA-proteína.

Es en estos momentos en los que se favorece la mutación del DNA, mediante la replicación previa a la reparación o tras un reparo defectuoso (Halliwell, B., et al. 1991, Breen, A. P., et al. 1995). Por ello, parece ser que las lesiones oxidativas del DNA son secundarias, no sólo al envejecimiento celular, sino que también a las enfermedades asociadas al mismo. Hay que tener en cuenta, que las enzimas reparadoras no tienen la capacidad de corregir las lesiones que se producen a lo largo del tiempo, por lo que traducen un aumento de mutaciones presentes con la edad (Ames, B. N., et al. 1993) teniendo como consecuencia el aumento del riesgo de padecer cáncer entre otras patologías.

Una vez visto el mecanismo de lesión del DNA por parte de los radicales libres, convendría especificar las dos dianas de los mismos: La desoxirribosa y las bases del DNA.

#### **2.4.1.1.4 Daño a glúcidos**

En el caso de los glúcidos, hay que tener en cuenta que interactúan con facilidad con los radicales hidroxilo, tanto positiva como negativamente para la molécula en función del glúcido que tengamos presente. Los

monosacáridos y los disacáridos presentan una resistencia al efecto de los radicales libres. El caso de la glucosa, por ejemplo, es el de un captador que impide que el radical libre del oxígeno actúe en otras moléculas. Así mismo, existen otros polisacáridos que tienen una acción protectora de la célula frente a estas agresiones (Albertini, R., et al. 1996).

La lesión oxidativa a los glúcidos adquiere importancia cuando se produce una despolimerización de los polisacáridos estructurales (Borel, P., et al. 1998) dando así lugar a procesos degenerativos.

### **2.4.2 Indicadores de estrés oxidativo**

Como ya hemos podido observar, el estrés oxidativo es de gran importancia para las células y el organismo por el daño que este puede causar. Debido a esto, se han intentado encontrar indicadores que determinen el daño que este estrés oxidativo puede causar a nivel general (citosol) o en particular a nivel de lípidos, DNA o proteínas. Los principales indicadores son: el cociente GSSG/GSH para determinar el daño en el citosol, MDA como indicador de daño a los lípidos, el 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina como índice de daño oxidativo al DNA y los grupos carbonilos como un indicador de daño oxidativo a proteínas (Hageman, J. J., et al. 1992). En la presente tesis se detallará con mayor hincapié tres de estos indicadores de daño oxidativo, dos de los cuales son valorados en la curva de longevidad.

### 2.4.2.1 Cociente GSSG/GSH

El glutatión ( $\gamma$ -glutamil cisteinil glicina) es indicador de daño oxidativo en el citosol. El glutatión es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, principalmente relacionadas con la protección antioxidante de las células (Viña, J. 1990).

Su acción antioxidante se debe al grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión es capaz de ejercer su papel protector sólo cuando se presenta en su forma reducida (GSH). La forma oxidada del glutatión se presenta cuando dos moléculas de GSH se oxidan (por presencia de agentes oxidantes o por autooxidación) cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí, dando lugar a la forma disulfuro (GSSG).

Un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, aumentando el cociente GSSG/GSH (Sies, H. 1986). Sin embargo, existen problemas metodológicos importantes en la determinación correcta del GSSG. En condiciones fisiológicas, los niveles de GSH son de dos a tres órdenes de magnitud mayores que los de GSSG (Kosower, N. S., et al. 1978). Además, el GSH se autooxida con facilidad a GSSG, sobre todo a pH neutro (Vina, J., et al. 1978, Asensi, M., et al. 1994). Esto hace que una pequeña oxidación del GSH suponga un aumento muy importante del GSSG, con el consiguiente error al determinar el índice GSSG/GSH. El modo de evitar la autooxidación del GSH es bloqueando el grupo tiol del GSH con N-etilmaleimida inmediatamente después de la extracción. Ello permite evitar las oxidaciones producidas por la

manipulación de la muestra previa al análisis del GSSG por High-performance liquid chromatography (H.P.L.C.) (Asensi, M., et al. 1994).

#### **2.4.2.2 Grupos carbonilo**

Las proteínas carboniladas son indicadores de daño oxidativo a las proteínas. Durante el proceso de daño, algunos aminoácidos como la lisina, prolina y arginina se oxidan dando lugar a grupos carbonilo; así, dan pie a ser utilizados como un indicador de daño oxidativo de las mismas (Stadtman, E. R. 1992). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Dean, R. T., et al. 1993).

Tras el ataque de los radicales libres a las proteínas, estas forman los grupos carbonilo que, como se ha comentado, sirven como indicador de daño. Este daño se puede determinar mediante dos métodos: marcaje con borohidruro de sodio tritiado o mediante la reacción con fenilhidrazinas. El método más empleado se basa en la reactividad de la 2,4-dinitrofenilhidrazina con los grupos carbonilo para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona, que se cuantifica mediante espectrofotometría (Oliver, C. N., et al. 1987, Lewisch, S. A., et al. 1995); o también se puede realizar un western blotting de proteínas carboniladas, una vez derivatizadas con 2,4-dinitrofenilhidrazina.

#### **2.4.2.3 Malondialdehído (MDA)**

El malondialdehído es un indicador de daño oxidativo a lípidos. Es el utilizado en la presente tesis. Se han descrito varios métodos de detección

(Bird, R. P., et al. 1984, Esterbauer, H., et al. 1991) pero la mayoría son poco específicos ya que detectan todos los aldehídos de la muestra al utilizar el ácido triobarbitúrico. Gracias al desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución, se consigue la separación del aducto malondialdehído-ácido triobarbitúrico de otras sustancias que pueden interferir en la determinación (Knight, J. A., et al. 1988).

## 2.5 Antioxidantes

### 2.5.1 Concepto

Las células de nuestro organismo están agredidas por el estrés oxidativo. Por este motivo, el organismo ha desarrollado unos mecanismos de defensa para protegerse de esta agresión efectuada por los radicales libres. Halliwell en 1995 definió antioxidante como *“cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato”* (Halliwell, B., et al. 1995, Halliwell, B. 1996). Por lo que un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres. Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de ROS.
- Interceptando el ataque de ROS.
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS.
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Los antioxidantes pueden clasificarse en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

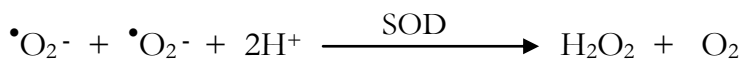


## 2.5.2 Antioxidantes enzimáticos

Son antioxidantes primarios que previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Su función es detoxificar los radicales libres haciendo que se conviertan en moléculas menos dañinas. Dentro de este grupo se incluye a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa.

### 2.5.2.1 Superóxido dismutasa (SOD)

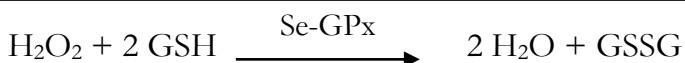
Superóxido dismutasa está presente en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno (Hassan, H. M., et al. 1977). Su actividad fue descrita por McCord y Friedovich en 1969 (McCord, J. M., et al. 1969). No hay que olvidar que la actividad superóxido dismutasa cumple un papel fundamental en la defensa antioxidante debido a que es una de las primeras líneas de defensa del organismo frente a estas agresiones. La SOD cataliza la reacción que transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno; constituye el primer medio natural de defensa (McCord, J. M., et al. 1971, Fridovich, I. 1978).



### 2.5.2.2 Glutatión peroxidasa (GPx)

GPx juega un papel importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y los lipoperóxidos que se generan en las células (Chance, B., et al. 1979). Como ya se ha mencionado, esta enzima forma parte de los denominados antioxidantes primarios, de modo que convierte los radicales

libres en moléculas menos dañinas, o impide su formación. La mayor parte de la actividad glutatión peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, B. 1986). Hay dos tipos de GPx, una dependiente del selenio y la otra no. Ambas necesitan del glutatión reducido (GSH) para efectuar las siguientes reacciones:



### 2.5.2.3 Catalasa

La catalasa participa en la detoxificación del peróxido de hidrógeno a través de una reacción que da lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance, B., et al. 1979). Su localización se centra principalmente en los peroxisomas (Tolbert, N. E., et al. 1981), aunque ya en el 2000 se demostró cierta actividad de esta enzima, en las mitocondrias y en el citosol (Rodríguez, A. M., et al. 2000).



### 2.5.3 Antioxidantes no enzimáticos

Son los antioxidantes secundarios. Son protectores no enzimáticos que actúan cuando hay una superproducción de radicales libres. En este grupo

se encuentran: la vitamina E, la vitamina C, el glutatión, el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina (Halliwell, B., et al. 1990, Niki, E., et al. 2012).

### **2.5.3.1 Glutatión**

El glutatión es el tiol no proteico más abundante en las células de los mamíferos. Fue descubierto por Hopkins en 1921 y está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere ciertas características que le otorgan una funcionalidad amplia e importante en la célula.

Puede encontrarse en dos formas según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado. Éste último es la combinación de dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro.

El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas: entre ellas, se encarga de proteger a la célula frente al ataque oxidativo; ya sea por radicales libres, peróxidos u otros agentes nocivos como las radiaciones

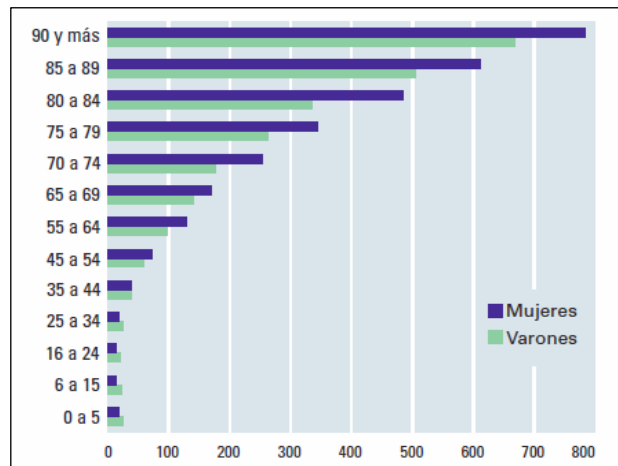
Por último, todos los sistemas proteolíticos intracelulares que actúan degradando las proteínas dañadas evitando su acumulación y las enzimas encargadas de reparar el DNA, se consideran los antioxidantes terciarios; que ejercen su defensa mediante la reparación de biomoléculas dañadas por los radicales libres (Davies, K. J., et al. 1986, Giulivi, C., et al. 1990).

## 2.6 Fragilidad.

El envejecimiento de la población, como ya hemos visto anteriormente, ha ido creciendo en los últimos años. Esto puede considerarse como un éxito de la política de salud pública y el desarrollo socioeconómico del país. Contribuye a que la sociedad deba adaptarse y asistir a la mejora de la salud y la capacidad funcional de las personas mayores, así como su seguridad, su calidad de vida y su integración social (Abizanda, P., et al. 2011). Por ello, la importancia y necesidad de desarrollar planes de intervención y propuestas de estudios en el área de geriatría y gerontología.

A lo largo de las últimas décadas se han llevado a cabo tres grandes estudios sobre discapacidad en nuestro país. La primera encuesta se llevó a cabo en 1986 que fue “la Encuesta sobre Discapacidad, Deficiencias y Minusvalías” (EDDM). La segunda tuvo lugar en 1999 con alguna variación sobre la anterior, llamada “Encuesta sobre Discapacidad, Deficiencias y Estado de Salud” (EDDS). El estudio específico de esta población más actual registrado por el Instituto Nacional de Estadística es el llamado, en el año 2008, “Encuesta de Discapacidad, Autonomía personal y situaciones de Dependencia” (EDAD). Tras dicha encuesta, había 3.85 millones de personas discapacitadas residentes en hogares; a las que si se le suman las personas que residen en centros especializados (en las anteriores encuestas no se cuantificaban), la cifra aumentaba hasta llegar a 4.12 millones de personas, es decir, un 9% de la población española total.

Como puede apreciarse en la figura 1.3 la incidencia de la discapacidad es más acusada a medida que aumenta la edad y más notable en las mujeres.



*Figura 2.3 Personas con discapacidad (Tasa por mil habitantes). Datos obtenidos del INE.*

De los datos expuestos, cabe destacar que el aumento de la población, de la discapacidad y, por lo tanto, de la dependencia conlleva un gasto notable de los recursos sociales, sanitarios y económicos (Otero, A., et al. 2011). Esto implica un ajuste significativo, a día de hoy, secundario a estas alteraciones en las características poblacionales.

Por ello, las características específicas y el entendimiento del paciente geriátrico son fundamentales. En éste, convergen múltiples áreas científicas para una correcta valoración geriátrica, ya que en este tipo de pacientes influyen aspectos intrínsecos del envejecimiento fisiológico, aspectos cognitivos, sociales, emocionales, funcionales y la gran incidencia de diversas enfermedades asociadas a la edad que se presentan de formas distintas.

Es necesario continuar investigando conjuntamente desde todos los ámbitos implicados en la fragilidad para obtener una definición de ésta, y en la

implantación de medidas (previamente demostradas) respecto al retraso en la evolución hacia los estados de fragilidad (Otero, A., et al. 2011).

### **2.6.1 Concepto de fragilidad.**

Es importante iniciar este apartado con una visión de la procedencia de la palabra “FRAGILIDAD”. Etimológicamente hablando, el término frágil proviene del francés “*frêle*” que significa poco resistente, y por otro lado, “*fragilis*” derivado del latín que significa que se rompe con facilidad (Afilalo, J. 2011).

En el intento de encontrar una definición de fragilidad, basándonos en la bibliografía, llegamos a darnos cuenta de que no hay una definición clara, universal y aceptada. En primer lugar, con el Canadian Study of Health and Aging (CSHA) surgen las primeras pinceladas del concepto de fragilidad, que se entiende como una acumulación de déficit y que Rockwood y Mitnitski quisieron hacer operativo mediante 80 déficits (Bortz, W. M., 2nd 2002, García-García, F. J., et al. 2011, Rockwood, K., et al. 2011). En la década de los 90 existían múltiples estudios que hacían hincapié en dicho término, pero no es hasta finales de esta década cuando Fried y Walston plantean un nuevo fenotipo de fragilidad; con una afectación a múltiples sistemas y la pérdida de plasticidad frente a la respuesta al estrés (Fried, L. P., et al. 2001). A partir de este momento, con la determinación de un fenotipo de fragilidad, es cuando empieza a ser posible la identificación clínica de este estado. No obstante un reciente artículo publicado en el año 2011 por García-García y colaboradores, se aporta una nueva escala de fragilidad que denominan “*Rasgo de fragilidad*”. Dicha escala se basa en el artículo de

Fried, se realiza en un población española con los datos del estudio Toledo para un Envejecimiento Saludable (ETES) (Garcia-Garcia, F. J., et al. 2011).

El interés por este síndrome ha aumentado durante la última década debido a que la fragilidad ha llegado a ser el principal factor de riesgo para la discapacidad en la personas mayores y predice otros resultados adversos (Ensrud, K. E., et al. 2009).

Aunque cada vez hay más evidencias de que la fragilidad es una realidad que tiene una entidad propia y en donde los ancianos no frágiles son una diana de intervención para todo el área de geriatría, no es menos cierto que tanto su definición como su evaluación siguen en fase de revisión. No obstante, a día de hoy, los cinco criterios establecidos por L. Fried en el 2001 son los más aceptados (Fried, L. P., et al. 2001). Según este artículo, se define la fragilidad como *“un estado fisiológico caracterizado por un aumento de la vulnerabilidad a las agresiones externas, como resultado de una disminución de las reservas fisiológicas de múltiples sistemas, lo cual origina dificultades para mantener la homeostasis”* (Fried, L. P., et al. 2001).

La fragilidad continúa en la actualidad siendo motivo de discusión, permaneciendo la discrepancia en el término, pero con ideas en las que la mayoría de autores coinciden. Una de ellas condicionaría que la fragilidad sería un estado previo a la dependencia (Rodriguez Mañas L, et al. 2009, Robles Agudo, F., et al. 2012), otra que la fragilidad está ligada al proceso de envejecimiento y que se genera en ausencia de enfermedad (fragilidad primaria) y, finalmente que guarda relación con la presencia de enfermedades (fragilidad secundaria) (Strandberg, T. E., et al. 2007, Van Kan G.A., et al. 2008).

Diversos autores consideran la fragilidad como un síndrome geriátrico frecuente en personas ancianas, el cual aumenta su prevalencia de manera exponencial a medida que envejecemos (Abizanda, P., et al. 2011). El diagnóstico temprano de la fragilidad y el empleo adecuado de técnicas, tanto terapéuticas como de programas de ejercicio físico, diseñadas para el desarrollo de las habilidades físicas, pueden modificar o proporcionar una reacción positiva al retraso de la aparición de la discapacidad, del declive funcional en el anciano y pueden proporcionar mejoras en la calidad de vida (Gill, T. M., et al. 2002, Rockwood, K. 2005, Garcia-Garcia, F. J., et al. 2010).

A día de hoy, se han hecho diversos estudios poblacionales que relacionan la fragilidad con enfermedades cardiovasculares subclínicas (Rodríguez Mañas L, et al. 2009), con el riesgo de mortalidad, dependencia y hospitalización (Rockwood, K., et al. 2005, Abizanda, P., et al. 2011), con la obesidad (Rockwood, K. 2005), con la edad, el sexo femenino, el nivel educativo (Abizanda, P., et al. 2011), hipertensión arterial y diabetes tipo 2; que, en conjunto, predicen multitud de situaciones cardiovasculares y pueden jugar un papel diferenciador en el caso de la fragilidad (Abizanda, P., et al. 2005). También existen otros artículos en los que se relaciona la fragilidad con aspectos sociodemográficos, hábitos de vida y alimenticios (Bortz, W. M., 2nd 2002, Rockwood, K., et al. 2005).

Estudios recientes han visto una correlación lineal entre la pérdida de masa muscular en las personas mayores. Esta relación negativa también se ha observado con la sarcopenia; en donde la fuerza muscular puede ser una buena herramienta para evaluar la fragilidad y de riesgo de sufrir, de manera acelerada, una disminución funcional (Taekema, D. G., et al. 2010).



La mayoría de las definiciones de fragilidad destacan el deterioro de múltiples sistemas y un aumento de la vulnerabilidad. Además, no se trata de un fenómeno de “todo o nada” sino que incluyen un gradiente (Rockwood, K., et al. 2005). La fragilidad es un síndrome geriátrico dinámico que no afecta a todos los ancianos por igual, además de ser un proceso susceptible a intervenciones activas como “vida activa”, programas de ejercicio, etc. (Bortz, W. M., 2nd 2002).

En las últimas décadas, ha surgido un cambio fenotípico de los ancianos españoles que hacen que una persona de 65 años se considere “joven” aumentando exponencialmente el riesgo de discapacidad a partir de los 70 años de edad (Abizanda, P., et al. 2011).

El aumento de la longevidad no está siempre relacionado con el incremento en la calidad de vida (Marin, R. V., et al. 2010). Una de las preocupaciones de los principales precursores de la salud es si la creciente longevidad aumentará la discapacidad y los costes de salud (Fries, J. F. 1980). Por lo tanto, la maximización de la salud y el intento de prevenir la disfunción son, al menos, tan importantes como la ampliación de la vida útil (Kirkland, J. L., et al. 2009).

Ante la ausencia de marcadores biológicos sensibles y específicos aplicables en la práctica, las líneas de trabajo actual intentan delimitar las manifestaciones clínicas que marquen el perfil de los ancianos vulnerables con mayor riesgo de desarrollar episodios adversos relevantes, entre los que se incluyen: la dependencia, la hospitalización, la institucionalización y la muerte (Baztán Cortés, J. J. 2006). En la última década, se ha intentado encontrar cuáles son las bases fisiológicas de la fragilidad. Walston y Fried

en 1999 desarrollaron el esquema que relacionaba las manifestaciones clínicas de la fragilidad entre sí.

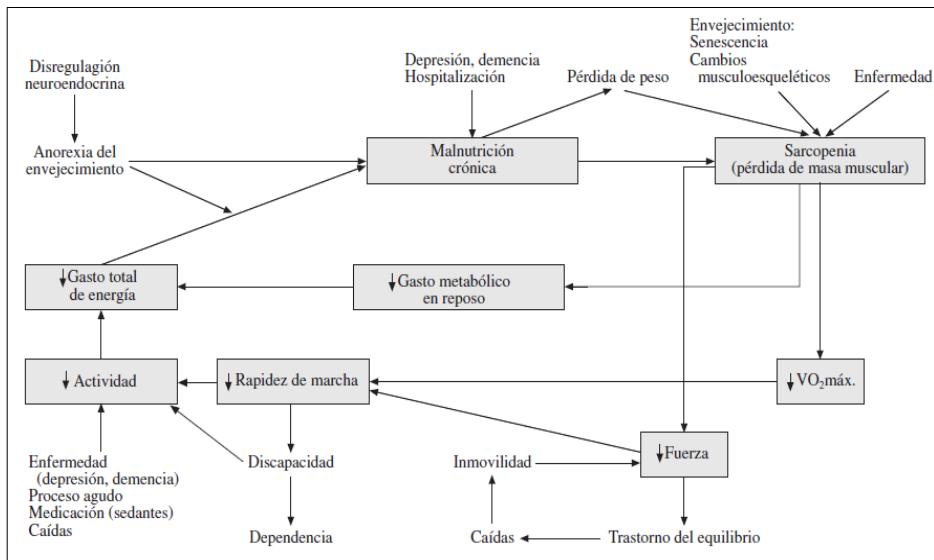


Figura 2.4 Círculo de la fragilidad. Hipótesis de Fried (Baztán Cortés 2006).

La evolución terminológica ha hecho que se denominara inicialmente al paciente de edad avanzada como “anciano de riesgo”, posteriormente derivó a “anciano frágil”, para ahora estar dejando paso al de “anciano vulnerable” como consecuencia de una mayor especificidad clínica del término “fragilidad” (Baztán Cortés, J. J. 2006).

Comparar definiciones de fragilidad e intentar llegar a otra mejor, no es tarea sencilla (Rockwood, K. 2005). Un consenso de múltiples expertos de distintas áreas, intentaron llegar a una definición o resaltar y aclarar aspectos importantes en los que todos estuvieran de acuerdo a fin de encontrar un concepto emergente con importantes consecuencias clínicas

(De Lepeleire, J., et al. 2008). Un grupo de investigadores, de una variedad de campos relacionados con la fragilidad, fueron invitados a participar en un proyecto de colaboración con el objetivo de desarrollar la definición más completa y concreta de fragilidad posible (De Lepeleire, J., et al. 2009, Rodriguez-Manas, L., et al. 2012). En dicho estudio, los expertos coincidieron en la importancia de llegar a una definición amplia que englobara diferentes áreas implicadas en la fragilidad. Además, debe incluir en la evaluación el rendimiento físico, la velocidad de la marcha, la movilidad, el estado nutricional, salud mental y cognición. También coincidieron en que no hay un solo biomarcador que por sí solo explicara o determinara la fragilidad, sino la necesidad de múltiples biomarcadores.

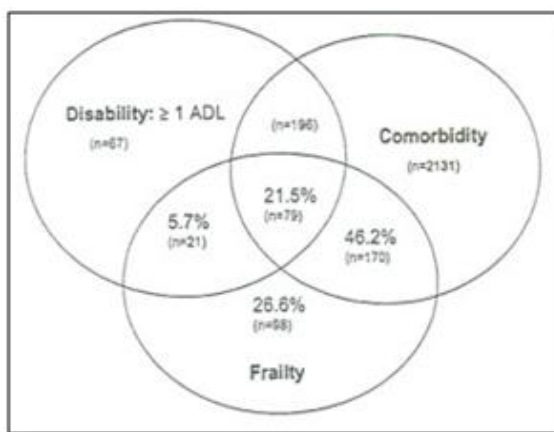
Aunque todo sujeto es potencialmente vulnerable, la fragilidad representa un estado de extrema vulnerabilidad, donde un mínimo de estrés puede desencadenar un deterioro funcional.

Sin dejar de reconocer la naturaleza multifactorial de la fragilidad, es importante desarrollar una "definición operacional" de la misma, que sea lo suficientemente simple para ser utilizada en la clínica y para guiar la prevención y atención al anciano (Rodriguez-Manas, L., et al. 2012).

### **2.6.2 Comorbilidad, discapacidad y fragilidad.**

En ocasiones, estos tres conceptos pueden confundirse o solaparse, pero hay que entender que no todas las personas mayores muestran la superposición entre estas tres características (Fried, L. P., et al. 2001). Una persona puede cumplir uno o más de estas particularidades como muestra

la figura 1.5, por lo que es importante saber el significado exacto de cada uno de estos términos en los que podemos observar diferencias claras (Rodríguez-Manas, L., et al. 2012). Comorbilidad implica padecer varias enfermedades; discapacidad, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es la restricción o pérdida de la capacidad para realizar las actividades básicas de la vida diaria; y, por último, fragilidad supone el aumento de la vulnerabilidad y alteración de la homeostasis por una disminución de la reserva funcional. Fragilidad y comorbilidad serían, por tanto, predictores de discapacidad; y esta podría exacerbar la comorbilidad y la fragilidad (Abizanda, P., et al. 2005).



*Figura 2.5 Diagrama que muestra el alcance de la superposición de la fragilidad con la discapacidad y comorbilidad*

Hasta el momento, la mayor parte de las investigaciones en fragilidad se han centrado en estudios poblacionales, aunque hacen falta estudios diana que proporcionen información acerca del impacto de la fragilidad en la evolución

natural de las distintas enfermedades y su relación con la hospitalización (Rodríguez Mañas L, et al. 2009). Por esto, la distinción conceptual es importante, ya que sólo la correcta definición de estos términos permite una atención, formación e investigación adecuada (Baztán Cortés, J. J. 2006).

### **2.6.3 Marcadores clínicos del paciente.**

Una correcta valoración incluye anamnesis, exploración física y una serie de instrumentos específicos de valoración denominados “escalas de valoración”, que por un lado facilitan la detección y seguimiento del problema, y por otro también la comunicación entre los diferentes profesionales que atienden al mayor. Incluyen cuatro esferas importantes (clínica, funcional, social y mental) que como si de piezas de puzle se trataran, configuran una vez enlazadas la imagen real del anciano.

#### **2.6.3.1 Valoración o esfera clínica.**

Esta parte de la evaluación del anciano es la más complicada de cuantificar, debido a la peculiaridad, la heterogeneidad y la atípica e inespecífica expresión de la enfermedad por parte de éste. La valoración clínica debe incluir: una entrevista clínica clásica añadiendo un cuestionario directo sobre la presencia de algunos grandes síntomas geriátricos (malnutrición, disminución auditiva o de agudeza visual, etc.), además de una historia farmacológica, historia nutricional, exploración física, solicitud de exploraciones complementarias y elaboración de un listado de problemas.

### **2.6.3.2 Valoración o esfera funcional.**

La valoración funcional es el proceso dirigido a recoger información sobre la capacidad del anciano para realizar su actividad habitual y mantener su independencia en el medio en el que se encuentra. Dentro de este apartado destaca el artículo de L. Fried. del 2001 en que validaron cinco criterios de evaluación de la fragilidad (Fried, L. P., et al. 2001). De este modo, definieron la fragilidad de acuerdo a la presencia de al menos 3 de los 5 criterios descritos a continuación:

- Pérdida de peso involuntaria en el último año (mínimo 4,5kg o >5%).
- Sentirse exhausto y agotamiento general. Información proporcionada por el paciente.
- Disminución de la fuerza de prensión (medida con un dinamómetro).
- Lentitud de la marcha (basándose en una distancia de 4,6metros).
- Bajo nivel de actividad física.

Los individuos que cumplan 1 ó 2 de estos criterios, son considerados pre-frágiles y los que no cumplen ninguno de estos, son considerados robustos o no frágiles (vigorosos).

Por otro lado, y como ya se ha dicho anteriormente, la gran variedad de protocolos, criterios y modos de evaluar la fragilidad, hacen que aparezcan otros como los que evalúan las Actividades Básicas de la Vida Diaria (ABVD), instrumentales (AIVD) y avanzadas (AAVD).

Las ABVD incluyen aquellas tareas que la persona debe realizar diariamente para su autocuidado (aseo, vestirse, alimentación, etc.). Las AIVD hacen

referencia a aquellas tareas en las que la persona interacciona con el medio para mantener su independencia (cocinar, comprar, usar el teléfono, etc.) y por último, las AAVD incluyen aquellas que permiten al individuo su colaboración en actividades sociales, actividades recreativas, trabajo, viajes, etc.

Dentro de la valoración funcional hay que destacar: Índice de Lawton y Brody (Lawton, M. P., et al. 1969), Índice de Barthel (Mahoney, F. I., et al. 1965), Índice de Katz (Katz, S., et al. 1963), Escala de Plutchik (Plutchik, R., et al. 1970), Escala de la Cruz Roja para valorar la incapacidad.

Las ventajas que establece la valoración funcional siguiendo los criterios establecidos por L. Fried son: pueden ser evaluados con facilidad en la consulta, tienen una gran simplicidad y su traslado a la práctica no conlleva un gasto económico importante; pero también se han establecido algunas desventajas como pueda ser que se centre sólo y exclusivamente en una valoración funcional y que los puntos de corte que establece, no valen para todas las poblaciones (García-García, F. J., et al. 2010); la definición estricta que determinó L. Fried tiene una elevada especificidad y alto valor predictivo pero a costa de perder sensibilidad (Baztán Cortés, J. J. 2006).

### **2.6.3.3 Valoración mental (esfera mental).**

En la valoración del estado mental es importante atender al estudio tanto de la esfera cognitiva como afectiva, y tener en cuenta las variables implicadas en la fragilidad de ambas áreas.

La prevalencia del deterioro cognitivo en el anciano es alta (20% en los mayores de 80 años). Esta varía en función de la población a estudiar y de la metodología empleada, es decir, que los ancianos que viven en residencias asistidas tienen un mayor deterioro cognitivo que los que viven en sus domicilios. La importancia del deterioro cognitivo viene dada no sólo por su prevalencia en los ancianos, sino también por la relación que existe con los trastornos conductuales, una mayor utilización de los recursos socio-sanitarios y por su implicación directa con la esfera funcional y social.

Conocer el grado de deterioro cognitivo permite saber la calidad de la información que aporta el paciente o la que es capaz de asumir sobre sí mismo y sobre su enfermedad. Normalmente, el inicio del diagnóstico viene por la demanda del paciente al quejarse por la pérdida de memoria o por los familiares más cercanos que detectan un cambio en su conducta (depresión, apatía, etc.). La depresión en la vejez se asocia a mayor incapacidad para realizar las ABVD y un peor índice de calidad de vida, mayor uso de medicamentos y peor percepción de uno mismo (Nascimento Ordoneza, T., et al. 2011).

La entrevista clínica comienza desde el momento en que el paciente entra por la puerta de la consulta. Su forma de caminar, inestabilidad al sentarse, su atuendo, su aseo personal, el tono de voz, con quien viene acompañado, o la temperatura y fuerza con la que estrecha la mano al saludar, nos proporciona una información muy valiosa sobre la situación mental y afectiva del paciente (Perlado, F. 2001). Los objetivos de la entrevista son saber lo máximo del paciente desde su nivel de escolarización hasta si tiene problemas de sueño. Esta entrevista es necesaria complementarla con tests breves y objetivos. Dentro de la valoración cognitiva, contamos con



múltiples tests de los cuales por su aplicación, por su difusión y sencillez, se utilizan en la práctica clínica: Escala de Pfeiffer (CSEM/SPMSQ) (Pfeiffer, E. 1975), Mini-mental (MMSE) (Folstein, M. F., et al. 1975), Mini examen cognitivo de Lobo (MEC), Test del reloj (Sunderland, T., et al. 1989), Set-Test (Isaacs, B., et al. 1972) y Test de siete minutos (Solomon, P. R., et al. 1998).

La valoración afectiva tiene importantes repercusiones en la calidad de vida, en la situación funcional y cognitiva. Este trastorno puede alargar o aumentar las estancias hospitalarias, ingresos, tratamientos, y disminuir la calidad de vida (Nascimento Ordoneza, T., et al. 2011).

#### **2.6.3.4 Valoración Social (esfera social).**

Aunque la valoración social exhaustiva es función del trabajador social, el médico debe conocer y hacer constar en su historia todos aquellos datos que puedan ser de interés y tengan repercusión presente o futura sobre el anciano. Esto permite conocer la relación entre el anciano y su entorno, aspectos relacionados con el hogar, apoyo familiar y social. Son cuestionarios esenciales para planificar los cuidados de un anciano. Para ello, contamos con unos instrumentos de medida que son: Salud familiar (Family Apgar) (Smilkstein, G. 1978, Smilkstein, G., et al. 1982), Recursos Sociales (OARS) (Grau Fibla, G., et al. 1996), Escala de valoración socio-familiar (Gijón) (García González J.V, et al. 1999) Escala Filadelfia (Lawton, M. P. 1975).

### 2.6.4 Valoración geriátrica integral.

No es de extrañar que la costosa hospitalización de las personas mayores esté cada vez más en entredicho y que se busquen alternativas para poder evitarla, contribuyendo a un equilibrio sostenido del sistema sanitario. Mientras que algunos individuos llegan a edades avanzadas de la vida en plenas facultades, otros, en cambio, padecen en estos años enfermedades y déficits que erosionan gravemente la calidad de vida de las personas (García-García, F. J., et al. 2011).

No hay que olvidar que, a día de hoy, continúan existiendo limitaciones para llevar a cabo una correcta evaluación geriátrica integral. La valoración del anciano en todas las áreas parece imposible por la limitación de tiempo y la gran presión que sufren los servicios de urgencia hospitalarios (Ruiperez Cantera, I. 2011).

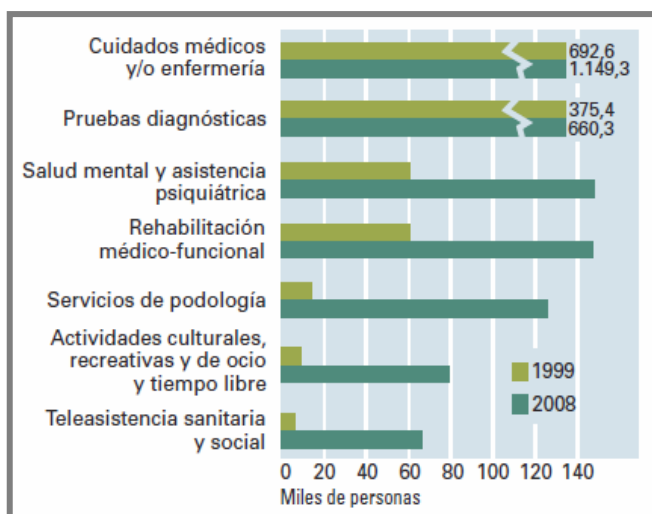


Figura 2.6 Servicios socio-sanitarios recibidos en los últimos 14 días previa a la encuesta (EDAD) en el 2008.

Una valoración integral es un proceso de diagnóstico y evaluación estructurado que permite obtener una visión completa del anciano;

cuantificando sus problemas, necesidades, capacidades, función cognitiva, habilidad y situación social, tratamientos, etc. con el objetivo de optimizar los recursos, los costes y lograr un buen análisis que nos permita saber el grado de dependencia y la calidad de vida del paciente (Rubenstein, L. Z. 1987). Dado que los mayores costes de atención sanitaria es en los ancianos (mayor frecuencia hospitalaria, mayor consumo de fármacos, etc.), es lógico que las medidas de prevención se centren en la prevención de la discapacidad, enfermedad y dependencia (Fries, J. F. 2002).

Esta forma de valoración incluye los cuatro apartados que anteriormente se han descrito (la esfera clínica, la mental, la social y la funcional), las cuales proporcionan una valoración real y completa del anciano.

Para todo esto, debemos contar con personas cualificadas, con implicación y gran profesionalidad a la hora de atender a las personas mayores; ya que los ancianos son una población con gran necesidad de atención y, por lo tanto, tiene mayor probabilidad de beneficiarse de las habilidades geriátricas (De Lepeleire, J., et al. 2008).

El concepto de fragilidad ha crecido en importancia debido a la necesidad de una mejor comprensión de la situación sanitaria y funcional de las personas mayores y la necesidad de prevenir o, al menos, retrasar la aparición en el final de la vida de la discapacidad y sus consecuencias adversas (Seeman, T. E., et al. 2010).

Es importante destaca la escala de valoración llamada “Rasgo de fragilidad” principalmente porque se ha llevado a cabo en población española y con una evaluación sencilla de 12 ítems evalúan ocho dimensiones de la fragilidad que son:

- Balance energético
- Estado nutritivo
- Pérdida de energía
- Actividad
- Fuerza
- Lentitud
- Sistema nervioso central
- Sistema vascular

Es sus resultados observaron una clara relación de la fragilidad con la edad, con la carga de comorbilidad y con la discapacidad; además de ser un buen estimador de la edad biológica de los sujetos (Garcia-Garcia, F. J., et al. 2011).

### **2.6.5 Implicación de la fragilidad en los distintos sistemas.**

Múltiples alteraciones asociadas a la genética, el envejecimiento y las comorbilidades están implicadas en la fisiopatología del síndrome de fragilidad. En este sentido, diversos estudios han intentado establecer las bases fisiológicas de la fragilidad para intentar establecer posibles biomarcadores (Rodriguez-Manas, L., et al. 2012). Aunque a día de hoy, no tenemos un consenso ni un acuerdo de cuáles son los biomarcadores que determinan la fragilidad, si atendemos a la definición de fragilidad, caracterizada por una pérdida de la homeostasis, podemos deducir que dicha pérdida se origina por la alteración de múltiples sistemas interrelacionados.

Se ha relacionado la fragilidad con alteraciones en los diferentes sistemas del organismo. En el sistema neuroendocrino, la fragilidad se caracteriza por un descenso de la testosterona (Hyde, Z., et al. 2010), un descenso de deshidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S), prohormona precursora de andrógenos y estrógenos (Baylis, D., et al. 2012), y por un aumento del cortisol (Holanda, C. M., et al. 2012).

Las alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal favorecen la sarcopenia en el anciano por un descenso de las hormonas sexuales, la hormona de crecimiento y un aumento del cociente cortisol / DHEA (Robles Agudo, F., et al. 2012), que conlleva efectos negativos en el anciano. Produce alteraciones en el metabolismo, la densidad ósea, la fuerza muscular, la tolerancia al ejercicio, el sistema vascular y la cognición. Estas son consecuencias clave en la pérdida progresiva de sus capacidades y, por lo tanto, condicionan la discapacidad física, mala calidad de vida y muerte (Taekema, D. G., et al. 2010, Vianna, D., et al. 2012).

La fragilidad provoca alteración en la composición corporal, fundamentalmente en la disminución de la masa muscular, tanto en delgados como en obesos. Esto predispone a la disminución de la actividad física que, a su vez, acentúa la pérdida de masa muscular, por lo que se considera un elemento clave en la fragilidad (Ferrucci, L., et al. 2002, Puts, M. T., et al. 2005).

Con el envejecimiento se incrementan algunos marcadores inflamatorios, como por ejemplo IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Coelho, F. M., et al. 2011). Para contrarrestar este estado inflamatorio se activan interleuquinas antiinflamatorias como IL-4. La inflamación y la sarcopenia

son dos pilares de la fragilidad, ya que los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  se asocian a una menor masa muscular y fuerza muscular. (Puts, M. T., et al. 2005, Garcia-Garcia, F. J., et al. 2011).

Por todo ello, las alteraciones en el sistema músculo-esquelético se consideran uno de los componentes clave en la fragilidad (Roubenoff, R. 2000), caracterizada por una pérdida de fuerza y masa muscular.

La fisiopatología de la sarcopenia supone una denervación de las unidades motoras, la conversión de fibras musculares rápidas (tipo II) en fibras musculares lentas (tipo I) y el depósito de lípidos en el tejido muscular (Lang, T., et al. 2010). El Consenso Europeo sobre la definición y diagnóstico de la sarcopenia sugiere que el diagnóstico de sarcopenia puede establecerse midiendo los siguientes puntos (Cruz-Jentoft, A. J., et al. 2010):

- Masa muscular → Para la medición de la masa muscular, la absorbiometría de rayos X de energía Dual (*dual-energy x-ray absorptiometry* [DEXA]) es considerado el método estándar. Otros métodos para cuantificar la masa muscular incluyen la impedancia bioeléctrica, la tomografía computerizada, la resonancia magnética, la excreción urinaria de creatinina o mediciones antropométricas.

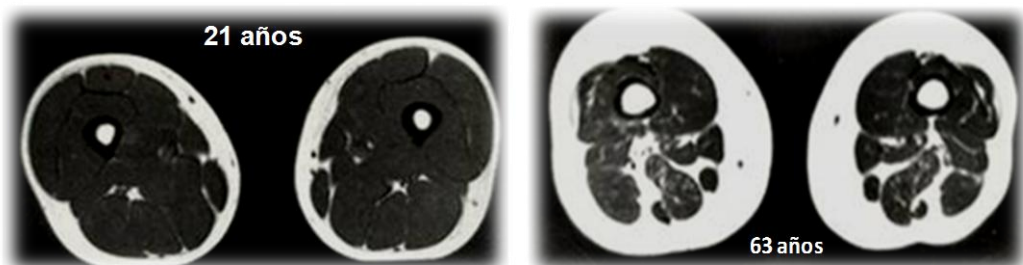
- Fuerza muscular: Para su determinación, se mide la fuerza de agarre mediante un dinamómetro, o la valoración de la flexo-extensión de la rodilla. Niveles bajos de fuerza de agarre predicen mejor el riesgo de padecer complicaciones clínicas que niveles bajos de masa muscular (Lauretani, F., et al. 2003). Además, existe una clara relación lineal entre niveles bajos de fuerza de agarre y la incidencia de dificultades para la

realización de las ABVD (Al Snih, S., et al. 2004). El mismo consenso europeo establece que la medición de la fuerza de agarre es más simple y precisa que la complicada medición de la fuerza muscular de miembros inferiores.

- Rendimiento físico: Medido con el “Short Physical Performance Battery” (que incluye la prueba de caminar 8 pies), velocidad de la marcha normal, test de 6 minutos marcha, el test “timed get up and go” y el “stair climb power test”.

El envejecimiento contribuye a un descenso de la masa corporal magra, sobre todo en el músculo esquelético; y de forma paralela un incremento de la masa grasa. En el joven, el 30% del peso corporal corresponde a músculo, el 20% a tejido adiposo y el 10% al hueso; mientras que a los mayores de 75 años, el 15% del peso corporal corresponde al músculo, el 40% al tejido adiposo y el 8% al hueso.

En la figura 1.7 podemos apreciar el proceso de atrofia en el músculo esquelético durante el envejecimiento mediante resonancia magnética. La atrofia muscular (sarcopenia), debilidad y deterioro funcional se asocian a un resultado deletéreo en personas mayores (Taekema, D. G., et al. 2010, Forbes, S. C., et al. 2012).



*Figura 2.7 Imagen por resonancia magnética de la pérdida muscular esquelética.*

La pérdida de densidad ósea empieza en la tercera década de la vida (Marin, R. V., et al. 2010) y la sarcopenia en la cuarta década. La sarcopenia debilitante funcional afecta aproximadamente al 7% de los adultos mayores de 70 años y hasta un 20% de los mayores de 80 años. El “American College of Sports Medicine” recomienda la práctica de actividad física como una estrategia o elemento fundamental para la prevención de la osteoporosis, proporcionando un mantenimiento del hueso a lo largo de la vida. Además, un estudio publicado en la revista “Journal of Clinical Densitometry” demuestra una correlación estadísticamente significativa entre la fuerza de agarre y el análisis óseo por densitometría lumbar y femoral, donde confirmaron que la fuerza muscular es un buen predictor de densidad ósea (Marin, R. V., et al. 2010).

Otros sistemas altamente afectados son el sistema inmune y el cardiovascular. Walston y colaboradores demostraron una relación positiva entre el estado de fragilidad, marcadores de inflamación y activación de la cascada de coagulación (Walston, J., et al. 2002). La fragilidad también se ha relacionado con la patología cardiovascular. La arterioesclerosis puede contribuir a la fragilidad mediante la disminución del riego sanguíneo y la consiguiente disminución de la oxigenación del músculo, pudiendo desencadenar sarcopenia. Esto contribuye indirectamente al deterioro cognitivo y a una disminución de la actividad física (si se produce un derrame cerebral, insuficiencia cardíaca congestiva o infarto de miocardio) (Hamerman, D. 1999).

Marcadores bioquímicos como la insulina, la glicemia, los lípidos y las proteínas han sido estudiados también. Con respecto a la glicemia y la



insulina, los individuos frágiles no diabéticos muestran valores significativamente superiores a los no frágiles en ayunas y 2 horas después de la ingestión oral de 75g de glucosa (Walston, J., et al. 2002). Además, en estudios transversales y longitudinales (Woods, N. F., et al. 2005, Alvarado, B. E., et al. 2008, Hubbard, R. E., et al. 2010) se ha observado que la obesidad se asocia a fragilidad, especialmente la obesidad abdominal (Hubbard, R. E., et al. 2010). Así mismo, una situación relacionada con la obesidad, la resistencia a la insulina, se considera como un determinante de sarcopenia y por lo tanto al considerar la sarcopenia un factor determinante de la fragilidad, este puede considerarse un factor de riesgo (Barzilay, J. I., et al. 2007). Con respecto a los lípidos y proteínas, se ha postulado la relación entre la fragilidad y una disminución en los niveles de albúmina y colesterol total (Schalk, B. W., et al. 2004), así como niveles inferiores de lipoproteínas de baja densidad (Walston, J., et al. 2002). Estos y otros autores (Ranieri, P., et al. 1998), plantean que la disminución del riesgo de fragilidad está asociado al incremento de los niveles de colesterol de las lipoproteínas de baja y alta densidad y la del colesterol total. Por otro lado, ya en el 2006 se observó una correlación positiva entre bajos niveles de vitamina E en plasma con el síndrome de fragilidad, en personas mayores de 65 años (Ble, A., et al. 2006). Además de que recientemente se ha relacionado la deficiencia de un micronutriente, la vitamina D, con la fragilidad (Wilhelm-Leen, E. R., et al. 2010), e incluso se ha propuesto que los individuos considerados como prefrágiles con niveles mayores de dicha vitamina, tienen más probabilidades de recuperarse y convertirse en no frágiles que aquellos con niveles inferiores (Shardell, M., et al. 2012).

Por otro lado, Walston y cols. continuaron con estudios en los que relacionaban otros marcadores relacionados con la fragilidad. Analizaron los mecanismos moleculares y celulares que podrían estar implicados en la fragilidad, con especial atención al estrés oxidativo, daño del DNA mitocondrial y acortamiento de telómeros. (Walston, J., et al. 2006). Estos autores sugirieron que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en el deterioro multisistémico asociado a la fragilidad, pudiendo afectar a la expresión genética y producir un daño a lípidos y proteínas. Así mismo, postularon que el estrés oxidativo podía contribuir a la fragilidad activando el factor de transcripción “factor nuclear Kappa B” (NFκB), el cual se trasloca al núcleo de la célula donde activa la transcripción de diversos genes, especialmente de tipo inflamatorio (Yamamoto, Y., et al. 2001) (por ejemplo, citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNFα) (Taylor, B. S., et al. 1998, Ershler, W. B. 2007). La inflamación sistémica, a su vez, contribuye al desarrollo de la fragilidad (Hubbard, R. E., et al. 2010).

En un estudio con 619 mujeres, Waltson y colaboradores comprobaron que aquellas mujeres que presentaban menores niveles de antioxidantes tenían mayores niveles de IL-6 y que eran más vulnerables a la discapacidad y a la muerte en un período de 5 años (Walston, J., et al. 2006). Además, el estrés oxidativo contribuye a diversos trastornos metabólicos sistémicos y a la inflamación asociada a la obesidad visceral (Furukawa, S., et al. 2004); la cual juega un papel importante en la fragilidad (Powers, S. K., et al. 2007). Por otro lado, contribuye a la pérdida de masa y función muscular tras la inactividad, es decir, a la sarcopenia característica de la fragilidad (Ershler, W. B. 2007, Powers, S. K., et al. 2007), tal y como muestra la Figura 1.8.

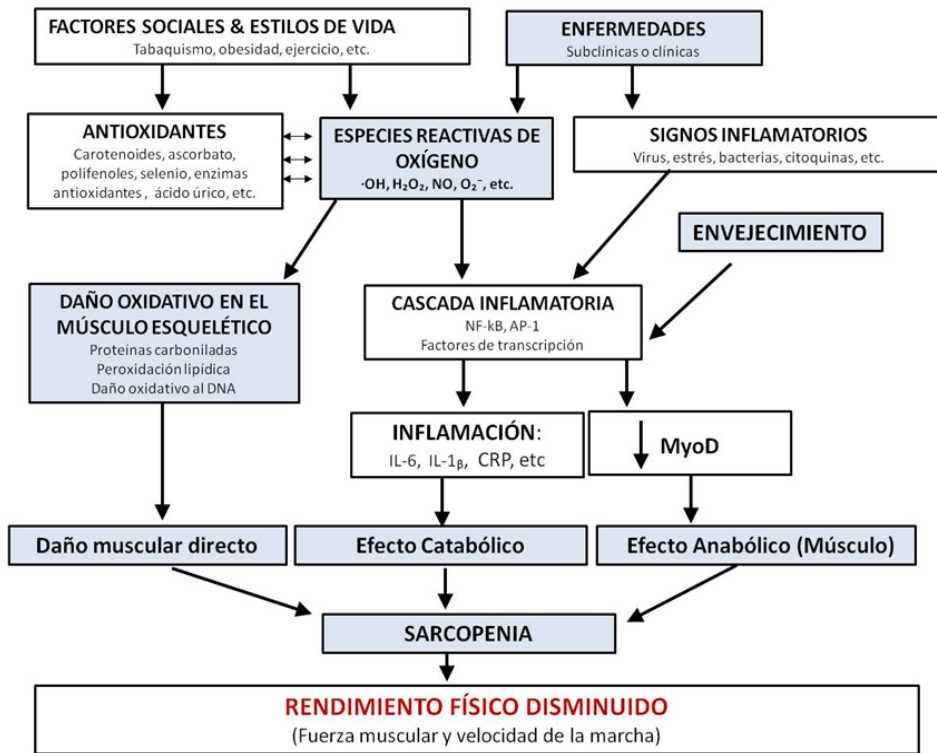


Figura 2.8 Mecanismos moleculares implicados en la sarcopenia.

Por su parte, Howard y colaboradores relacionaron el daño oxidativo a proteínas (mediante la determinación de los niveles de carbonilación proteica) con una disminución de la fuerza de agarre (Howard, C., et al. 2007). El incremento en los niveles de proteínas oxidadas se ha mostrado como predictor de la aparición de dificultades para la marcha en un período de 3 años (Semba, R. D., et al. 2007).

Sin embargo, aunque acabamos de ver que diversos autores han propuesto el estrés oxidativo como mecanismo molecular subyacente a la condición de fragilidad basándose en relaciones indirectas entre estrés oxidativo y

marcadores de fragilidad (inflamación, sarcopenia, obesidad...), hasta el momento sólo dos estudios han determinado la relación entre estrés oxidativo y fragilidad, midiendo marcadores de daño oxidativo en individuos clasificados como frágiles, prefrágiles y no frágiles, según los criterios de Fried.

En el primero, Wu y colaboradores estudiaron los niveles séricos de 8-OHdG, considerado como el principal marcador de daño oxidativo a DNA, en 90 sujetos mayores de 65 años (13 no frágiles, 56 prefrágiles y 21 frágiles), encontrando mayores niveles de dicho marcador en los individuos frágiles (Wu, I. C., et al. 2009). La fragilidad en este estudio se correlacionó negativamente con los niveles séricos de albúmina y de forma positiva con los niveles de proteína C reactiva (PCR) y el ratio cintura-cadera; lo cual sugiere que el catabolismo de proteínas, la inflamación sistémica y la obesidad visceral relacionan el estrés oxidativo con la fragilidad.

Por otro lado, Serviddio y colaboradores, en un estudio con 62 pacientes, demostraron que mediante el ratio GSH/GSSG, y el daño oxidativo a lípidos, mediante los niveles de MDA y 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE) en plasma, se relacionaban con la fragilidad (Serviddio, G., et al. 2009).

### **2.6.6 Fragilidad en animales de experimentación.**

La fragilidad se caracteriza por una baja actividad, disminución de la masa corporal magra, fuerza, resistencia, equilibrio y rendimiento (Fried, L. P., et al. 2001). Por lo tanto, el mantenimiento de la función neuromuscular es crítico en la prevención de la fragilidad (Pendergast, D. R., et al. 1993). Dada la influencia de la fragilidad en la salud de los adultos mayores, el desarrollo

de modelos animales para la fragilidad representa un reto muy importante en la investigación de geriatría y gerontología básica (Walston, J., et al. 2008, Ko, F., et al. 2011).

A pesar del interés clínico en la fragilidad en los últimos años (Gill, T. M., et al. 2010), a nuestro conocimiento, la investigación en modelos de experimentación animal de la fragilidad es muy escasa. Sólo dos artículos el de Walston y el de Parks; los dos relativamente recientes del 2009 y del 2011 respectivamente (Walston, J., et al. 2008, Parks, R. J., et al. 2011) engloban la investigación hasta ahora de un modelo de ratón frágil.

Una laguna importante a resaltar es la falta de contextualización entre lo realizado en los modelos animales de fragilidad y el contexto clínico diario del anciano en la consulta, es decir, de lo realizado diariamente en la evaluación de las personas mayores.

Los investigadores han resaltado la importancia de crear modelos animales que reproduzcan los signos y síntomas comunes de la fragilidad humana (Walston, J., et al. 2008). Por ello, uno de los objetivos de la presente tesis es desarrollar una nueva prueba para determinar la fragilidad en animales de experimentación que hemos denominado “Valencia Test” y dicha prueba se basa en las características del síndrome de fragilidad en los ancianos.

Mediante la elaboración de sistemas de valoración específicos de fragilidad en animales de experimentación se podrían elaborar estrategias de intervención y prevención transferibles al humano.

### **2.6.6.1 Instrumentos utilizados en la valoración de la fragilidad en ratones.**

Como ya hemos mencionado, actualmente sólo existen dos artículos relacionados con modelos de ratón frágil y su valoración. El primero fue publicado en el 2008 por Jeremy Walston en la revista "*Journal of Gerontology*" (Walston, J., et al. 2008).

Este estudio se basa en las evidencias de que existe un incremento de los marcadores inflamatorios con la edad y una disminución de las hormonas asociadas al músculo; además de una importante correlación de esto con la fragilidad y las adversidades en la salud de las personas ancianas.

Los modelos frágiles de animales constituyen un importante avance para los estudios etiológicos e intervencionistas en relación a la fragilidad, mostrando los signos y síntomas típicos de la fragilidad humana. No obstante, estos signos y síntomas no deben ser atribuibles a determinados estados de enfermedad.

En este caso en concreto, se contemplaba un modelo específico de ratón (ratones hembras C57BL/6J deficientes en IL-10 frente a sus controles). En este estudio, se evaluó la fuerza del ratón, la actividad de los mismos, expresión de IL-6, peso, pérdida de pelo, "rearings" (elevaciones a dos patas) y múltiples genes asociados a la musculatura esquelética y su capacidad de apoptosis, crecimiento y función mitocondrial. En este estudio se vio que a edades ya más avanzadas, los ratones con déficit de IL-10 mostraban valores inferiores respecto a sus homólogos controles.

Las ventajas que se aportan en este modelo animal presentado son sobretodo que reproducen dos elementos críticos del envejecimiento en

humanos como puedan ser la fuerza y la inflamación; además, de los múltiples genes estudiados, muchos actúan a nivel de la apoptosis y la función mitocondrial, que son dos de los objetivos importantes en las investigaciones acerca del envejecimiento.

Por el contrario, este modelo animal de fragilidad debe vivir en zonas controladas libres de patógenos (SPF) ya que si no, presentan enfermedades y patologías no relacionadas con el envejecimiento y que podrían alterar los resultados. Esto no favorece la utilización de este modelo ya que no es representativo de la población humana. Este estudio está realizado exclusivamente en hembras, excluyendo al macho y sin llevar un estudio exhaustivo de los estrógenos y su relación con el envejecimiento. A esto hay que añadir la falta de seguimiento y control de la ingesta de comida y el índice de masa corporal. Así como que el aumento de IL-6 podría corresponder a enfermedades crónicas no detectadas en el estudio.

El segundo artículo al que hacemos referencia, que destaca la importancia de crear modelos de animales frágiles, es el de Randi J. Parks, publicado recientemente (2011) en la misma revista (Parks, R. J., et al. 2011).

En este estudio se destaca el hecho de que los modelos de envejecimiento animal se estén centrando en ratones. La causa principal es que estos presentan cambios asociados a la edad similares a los de los humanos. Por ello, el estudio se centra en desarrollar un índice de fragilidad asociado al envejecimiento específico para modelos con ratones (utilizando ratones C57BL/6J, como es nuestro caso).

En el desarrollo del índice de fragilidad, toman en consideración 31 elementos individuales que engloban niveles de actividad, estado

hemodinámico, composición corporal, metabolismo basal y función de los órganos (como la contractilidad cardiaca, que se trata de un objetivo secundario del artículo).

Para desarrollar el índice de fragilidad, tuvieron en cuenta a cada ratón de forma específica para cada variable del estudio, dando 0.25 puntos por cada desviación estándar (SD) que se daba; es decir, 0.25 por una SD, 0,5 por 2 SD... hasta un máximo de 1 punto en comparación a los resultados de los ratones de mediana edad. En caso de que no llegaran a una SD, se les daba un valor de 0. Una vez obtenidos todos los resultados de las distintas variables, se hallaba la media para cada ratón, obteniendo así un valor entre 0 y 1 (donde 0 no era frágil y 1 implicaba fragilidad).

Las conclusiones a las que llega el estudio son que los ratones de edad avanzada obtenían valores más elevados que los de mediana edad. En relación al índice de fragilidad, se objetivó que a partir de valores próximos a 0,75 se producía una mayor mortalidad (muy similar a la de los humanos).

En el mismo artículo, se decidió desarrollar una prueba con tan sólo 8 variables para cuantificar el mismo índice, obteniendo resultados similares, aunque se precisa que con mayor número de variables el estudio se vuelve más preciso, hallando mayores diferencias estadísticamente significativas.

No obstante, este estudio presenta importantes limitaciones. La primera de ellas consiste en que el número de ratones utilizados, es muy reducido. Así mismo, el hecho de que el estudio presente un número tan elevado de parámetros a estudio, lo convierten en un sistema poco práctico para un seguimiento exhaustivo de una curva de longevidad. De aquí nace otra limitación, pues tan sólo se han hecho las mediciones una vez en una



población de ratones de mediana edad y otra en ratones de edad avanzada; no realizando un estudio de la evolución de los mismos. Finalmente, existen elementos en este estudio que no se tienen en cuenta para los ratones pero que sí se valoran en el estudio de los humanos; la fuerza de agarre, inflamación y funciones cognitivas.

Una vez hemos analizado los artículos más representativos acerca del modelo de ratones en fragilidad, se puede concluir que la nueva prueba de fragilidad en animales de experimentación facilitaría el desarrollo de estrategias de intervención en diferentes áreas de animales de experimentación y, finalmente, en las áreas de salud humana que podrían fomentar la investigación dirigida a la prevención de la fragilidad. Esto podría tener un importante impacto económico en la sociedad y, lo más destacable, se lograría favorecer positivamente el bienestar de la población de edad avanzada y de la población general (Gill, T. M., et al. 2002).

Otra vía de desarrollo importante para estudiar en animales de experimentación es la genética. La identificación de las vías biológicamente relevantes que influyen en la fragilidad se ve desafiadas por su complejidad biológica y la necesidad de separar estados de la enfermedad con el síndrome de fragilidad. En relación a esto, Ho proporciona una pequeñas indicaciones de cinco polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) relacionados con la fragilidad, en su artículo publicado en el año 2011 (Ho, Y. Y., et al. 2011, Volkert, D. 2011).

### **2.6.7 Estrategias de retraso o prevención de la fragilidad.**

Para la geriatría, el estudio de la fragilidad y el envejecimiento es un valor añadido. La medicina geriátrica especializada en atención multidisciplinar puede prevenir el declive funcional con un diagnóstico apropiado, preciso y temprano; así como puede reducir la utilización de hogares específicos para el anciano o la atención sanitaria en los domicilios, pudiendo modificar positivamente la expresión esperada de discapacidad en el anciano (Vellas, B. J., et al. 1997, Laske, C., et al. 2006). Esto repercutirá positivamente tanto en el plano social de integración, como en la calidad de vida de las personas mayores y en la economía en general.

Por lo que hasta el momento, una evaluación completa e integral del anciano que proporcione un diagnóstico completo, preciso, detallado y temprano proporciona ventajas en el tratamiento de prevención y retraso del deterioro funcional y, por lo tanto, la aparición de fragilidad.

La práctica de actividades sociales, educativas y de ejercicio físico previenen y actúan como tratamiento eficaz contra la depresión (Nascimento Ordoneza, T., et al. 2011). Como ya hemos visto, todos los aspectos asociados a la esfera mental y social son fundamentales para el buen diagnóstico del anciano y, por lo tanto, todas estas estrategias pueden paliar o reducir de forma positiva los signos de la fragilidad. Un estudio publicado en la revista Española de Geriatría y Gerontología revela que una intervención educativa en el anciano, proporciona que este adquiera un mayor conocimiento de sí mismo y de su enfermedad. Además, esta intervención puede contribuir a cambiar los hábitos de vida y, con ello,

aumentar el grado de autocuidado (Eckman, M. H., et al. 2012, Estrada, D., et al. 2012).

Otros estudios defienden la importancia de la práctica deportiva en relación a la fragilidad, ya que el ejercicio de resistencia aumenta la masa muscular, la fuerza y contenido mitocondrial (Forbes, S. C., et al. 2012). Estos efectos beneficiosos que proporciona el ejercicio físico son mayores cuanto menor sea la afectación de fragilidad o discapacidad que tenga el anciano (Baztán Cortés, J. J. 2006).

Por otro lado, la nutrición en las personas mayores, así como su estilo de vida, es un punto importante a incidir durante el transcurso del envejecimiento. En el anciano las vitaminas E (carotenoides) y C se ven disminuidas y están relacionadas con la fragilidad y la disminución de la fuerza (Traber, M. G., et al. 2008, Volkert, D. 2011). Al mismo tiempo, la vitamina D también se ve disminuida en el anciano. Este descenso produce una disminución de la masa muscular, pérdida de fuerza y un aumento de la fragilidad en personas de edad avanzada. Gozar de unos valores óptimos de vitaminas proporciona un estado adecuado en los ancianos (Niki, E., et al. 2012).

Hay estudios que defienden la idea de que la ingesta de ácidos grasos saturados son buenos, mientras que los insaturados no son beneficiosos porque son proinflamatorios (Forbes, S. C., et al. 2012).

La ingesta o suplementación de aminoácidos esenciales como la Leucina tiene opiniones controvertidas; desde una aceptación y promoción de esta (Forbes, S. C., et al. 2012), como de la defensa de que periodos largos de tratamiento, no alteran la adquisición de enfermedades crónicas y no

previene la pérdida de masa magra asociada a la edad, aunque a corto plazo estimula la síntesis de proteínas y disminuye la masa corporal (Vianna, D., et al. 2012).

El ejercicio proporciona, además de aumentar la síntesis de proteínas musculares, aumenta el gasto energético, el apetito y la ingesta de alimento en el anciano con riesgo de malnutrición (Vianna, D., et al. 2012).

Por todo lo comentado hasta el momento, una buena alimentación, una vida activa y unos hábitos saludables son la clave para la prevención o retraso de la aparición de los síntomas de fragilidad y por lo tanto una mayor calidad de vida (Dodge, H. H., et al. 2010, Garcia-Garcia, F. J., et al. 2011). Hay que tener en cuenta que, hoy en día, se relaciona más la fragilidad a la edad biológica que a la edad cronológica de las personas (Romero Ortuno, R. 2011).

## **2.7 Marcadores de Fragilidad.**

### **2.7.1 Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).**

#### **2.7.1.1 Concepto.**

Los factores neurotróficos son una importante familia de proteínas que modulan el crecimiento, el desarrollo, la diferenciación, la función y reparación de las neuronas (Reichardt, L. F. 2006). Dentro de esta familia hay que destacar cuatro neurotróficos más importantes que son: el factor de crecimiento nervioso (NGF), descubierto por primera vez por Barde en 1982 (Barde, Y. A., et al. 1982), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), del cual la primera evidencia de su existencia en suero y plasma fue en 1995 gracias a Rosenferld (Rosenfeld, R. D., et al. 1995), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (Reichardt, L. F. 2006).

BDNF juega un papel muy importante en la regulación, mantenimiento y supervivencia de las neuronas; además de influir en el aprendizaje y la memoria (Rasmussen, P., et al. 2009). Recientemente se ha demostrado que los niveles obtenidos tras la medición de este en suero, reflejan los niveles de BDNF en el cerebro (Erickson, K. I., et al. 2010). Este factor neurotrófico derivado del cerebro, se expresa en muchos tejidos y no sólo en el cerebro, por ejemplo en el hígado, en el músculo esquelético, etc. esto se debe principalmente a que este es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, liberándose al plasma y pudiendo volver del mismo modo al cerebro, existiendo así un flujo bidireccional (Klein, A. B., et al. 2011).

Como hemos mencionado, BDNF se expresa en diversos tejidos, aunque el 70-80% del BDNF circulante proviene del cerebro (Rasmussen, P., et al.

2009, Zoladz, J. A., et al. 2010) llegando al torrente sanguíneo. Las neurotrofinas descritas anteriormente se sintetizan inicialmente como proneurotrofinas, que son posteriormente sintetizadas a sus formas maduras y se unen a dos tipos de receptor: receptores tirosín - kinasa de alta afinidad (TrkA, TrkB y TrkC) y el receptor de baja afinidad p75 (Reichardt, L. F. 2006). En concreto, el BDNF tiene mayor afinidad por el receptor TrkB y el p75, que es un receptor para los factores de necrosis tumoral (Zoladz, J. A., et al. 2010).

BDNF promueve el crecimiento y proliferación de las células en el hipocampo, además de desempeñar un papel importante a largo plazo para la formación de la memoria y en su potenciación (Erickson, K. I., et al. 2010). Se defiende la idea de que BDNF juega un papel crucial en el aprendizaje, la memoria y el comportamiento; así como su relación con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Connor, B., et al. 1997) y la demencia vascular, el Parkinson, trastornos depresivos (Karege, F., et al. 2002) o epilepsia, obteniendo estos sujetos niveles más bajos de BDNF (Howells, D. W., et al. 2000, Laske, C., et al. 2006, LaFrance, W. C., Jr., et al. 2010).

No obstante, BDNF no disminuye siempre en condiciones adversas, hay evidencia científica que este factor neurotrófico aumenta durante procesos inflamatorios (Lin, Y. T., et al. 2011). Se defiende la idea que BDNF podría ejercer un papel protector a las neuronas del daño inflamatorio en otro tipo de enfermedades (esclerosis múltiple) (Kerschensteiner, M., et al. 1999).

La evidencia de que BDNF está relacionado con el ejercicio, que puede ser modificado por este y que podría explicar (en parte) los beneficios que

provoca el ejercicio en el cuerpo humano (Erickson, K. I., et al. 2010) y la cognición, hacen importante el estudio de esto y por eso se explicará con mayor detenimiento en el siguiente punto de la presente tesis.

### **2.7.1.2 BDNF y ejercicio físico.**

El cerebro es un órgano productor de BDNF, tanto en reposo como durante el ejercicio, aunque durante la práctica de este se sabe que la producción de BDNF es mayor (Rasmussen, P., et al. 2009). El interés por esta área de investigación fue iniciado por Neeper, quien observó una correlación positiva entre la distancia recorrida en rueda por una rata y el nivel de mRNA de BDNF en el hipocampo (Neeper, S. A., et al. 1995).

El deterioro del hipocampo antecede al deterioro de la memoria en humanos de edad avanzada. La estrategia para luchar contra la pérdida del hipocampo y proteger contra el desarrollo del deterioro cognitivo se ha convertido en un tema importante en los últimos años. Diversos artículos han resaltado la importancia de la práctica de ejercicio físico aeróbico como una estrategia accesible para todos que no produce efectos secundarios adversos (Erickson, K. I., et al. 2011).

El ejercicio físico modifica los niveles de BDNF (Klein, A. B., et al. 2011), mejora la proliferación celular, aumenta la perfusión del hipocampo, protege contra la pérdida del volumen del hipocampo, proceso que ocurre en un 1-2 % anualmente en adultos sin demencia (Erickson, K. I., et al. 2011). Las diferentes formas de ejercicio provocan cambios en diferentes regiones

del cerebro, que conllevan a diversos efectos sobre el aprendizaje y la memoria (Zoladz, J. A., et al. 2010).

Esta mejora cognitiva puede explicarse, en parte, por un aumento en la plasticidad de las redes neuronales y no siendo únicamente, esta mejora en aspectos funcionales, sino que se han visto cambios estructurales en el sistema nervioso central en respuesta al ejercicio, con un incremento de sustancia gris y blanca. (Garcia-Garcia, F. J., et al. 2011).

### **2.7.1.3 BDNF y fragilidad.**

A medida que llegamos a edades avanzadas, el nivel de BDNF se ve disminuido, se produce una depreciación del volumen del hipocampo y, por lo tanto se ven alteraciones en la memoria y aumentando el riesgo de demencia (Erickson, K. I., et al. 2010, Erickson, K. I., et al. 2011).

En la actualidad, sólo hay un estudio en el que se relacione BDNF con los niveles de fragilidad (Coelho, F. M., et al. 2011). Este artículo mide los niveles de BDNF en plasma de 48 mujeres clasificadas en: no frágiles y pre-frágiles, basándose en los criterios de L. Fried (Fried, L. P., et al. 2001). Estos autores obtuvieron niveles más altos de BDNF, medidos por inmunoabsorción ligado a un encima (ELISA), en el grupo de mujeres clasificadas como no frágiles comparadas con la pre- frágiles. Por otro lado sometieron a 20 de esas 48 mujeres a un protocolo de ejercicio físico, y el resultado defiende que el ejercicio físico aumenta los niveles de BDNF; ya que estas mujeres tras el protocolo de ejercicio obtuvieron niveles más altos que las mujeres control.



Todo esto propone que hay concordancia entre los estudios realizados en animales y en humanos, tanto observacionales como de intervención, en que la actividad física provoca mejoras cognitivas a corto, medio y largo plazo.

## **2.8 Regulación de la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético.**

La biogénesis mitocondrial es uno de los principales criterios para poder explicar la pérdida de la función muscular en el envejecimiento y en el desarrollo de la fragilidad. El aumento de la longevidad, como ya se ha comentado previamente, lleva también a un importante incremento de la fragilidad de la población humana y animales, secundario a ese envejecimiento muscular (Vanitallie, T. B. 2003).

Se ha visto que el ejercicio físico puede ser una estrategia de intervención anti-edad, ya que favorece la prevención de problemas cardiovasculares y puede también ser utilizado como prevención de la sarcopenia y la pérdida de funcionalidad del músculo (Fiatarone, M. A., et al. 1994) entre otras enfermedades.

Desde hace años, se sabe que el tamaño de las mitocondrias, el número y el volumen de estas varía en respuesta a estímulos fisiológicos (Holloszy, J. O. 1967). Este hecho fue, y sigue siendo, relevante para los fisiólogos del ejercicio interesados en las bases moleculares del rendimiento, en programas de entrenamiento e incluso en rehabilitación o entrenamientos de fuerza para personas de edad avanzada.

En los primeros trabajos de Miquel et al., se propuso que la pérdida de mitocondriogénesis fue fundamental en el proceso de envejecimiento (Miquel, J., et al. 1980). Se confirmó experimentalmente la validez de esta hipótesis (Sastre, J., et al. 1996). La función mitocondrial puede influir y contribuir a la fragilidad en los adultos mayores (Moore, A. Z., et al. 2011).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el músculo de las ratas viejas presenta una marcada pérdida en la mitocondriogénesis debido a una falta de inducción de PGC-1 $\alpha$ . Dicho estudio puso de relieve la importancia de mantener PGC-1 $\alpha$  para la capacidad de respuesta del músculo y su función (Derbre, F., et al. 2011).

PGC-1 $\alpha$  es un importante regulador mitocondrial. Dicha proteína participa en la respuesta al estrés oxidativo, aumentando la capacidad de la célula ante ROS, además de prevenir la disfunción endotelial y la muerte celular por apoptosis. (Valle, I., et al. 2005, Olmos, Y., et al. 2009).

### **2.8.1 Cambios en el envejecimiento muscular.**

El envejecimiento afecta a todas las especies y de forma sustancial influye en el ámbito de nuestras actividades y calidad de vida. Hay que tener en cuenta que el proceso de envejecimiento es influido a su vez por factores ambientales, enfermedades y hábitos que pueden acelerar dicho proceso.

El envejecimiento humano es diferente al de otras especies debido a la larga duración de la vida. Basándonos en artículos, podemos decir que a partir de la cuarta década de la vida (a los 30 años de edad) empieza el proceso de envejecimiento (Cadenas, E., et al. 2000). A partir de esta década se observa una disminución paralela entre la masa muscular y la fuerza con relación al aumento de la edad (Commoner, B., et al. 1954).

El músculo esquelético es un tejido elástico que en respuesta al ejercicio físico es capaz de inducir adaptaciones morfológicas y metabólicas en respuesta a la actividad contráctil. Los mecanismos mediante los cuales se

producen los diferentes eventos moleculares están relacionados con la activación y expresión de factores de transcripción implicados en la biogénesis mitocondrial, como NRF-1, Tfam y PGC-1 $\alpha$  (Hood, D. A., et al. 2006). Dichos cambios, en la expresión de PGC-1 $\alpha$ , provocan un aumento del contenido mitocondrial, así como el aumento de la expresión de genes nucleares y mitocondriales.

La intensidad del ejercicio y la duración de este modifican el contenido mitocondrial y, desde hace años, un indicador de estas modificaciones es Citotromo C, una proteína que su expresión es influida por las adaptaciones en el músculo esquelético (Hood, D. A. 2001).

El envejecimiento provoca una disminución de las reservas fisiológicas y la fragilidad afecta a múltiples sistemas y órganos. El ejercicio físico provoca efectos beneficiosos, y esto se sabe desde tiempo atrás, pero en recientes estudios se ha demostrado que el ejercicio físico en personas de edad avanzada tiene un efecto positivo en la composición corporal y en la capacidad funcional del músculo; además de poder ser una herramienta de gestión de la fragilidad (Theou, O., et al. 2011). En un artículo recientemente publicado (Gielen, E., et al. 2012), se han establecido diferentes enfoques terapéuticos encauzados hacia la debilidad del músculo esquelético (ver tabla 2.2).

| Approach                           | Advantages  | Disadvantages   |
|------------------------------------|---|---|
| Physical exercise                  |   |   |
| Progressive resistance training    | Increase in muscle strength and power<br>Increase in physical performance and activity<br>Increase in BMD   |   |
| Whole-body vibration training      | Increase in muscle mass<br>Increase in muscle strength<br>Increase in BMD in some studies   |   |
| Testosterone (T)                   | Increase in muscle mass<br>Increase in muscle strength and performance in some trials<br>Increase in BMD when T < 200 ng/dL and signs of hypogonadism | Possible higher risk of prostate events<br>Possible higher risk of cardiovascular events                            |
| Vitamin D (700-1,000 IU)           | Increase in muscle strength in vitamin D deficient elderly<br>Increase in physical performance (controversial)  | Increased risk of falls/fractures with annual high-dose   |
|                                    | Decrease in fall risk when achieving vitamin D level >60 nmol/L<br>Increase in BMD when combined with 1000-1200 mg calcium                            |   |
| Growth hormone                     | Increase in muscle mass   | No functional improvement<br>Adverse effects (soft tissue edema, arthralgias, gynecomastia, carpal tunnel syndrome) |
| Growth hormone secretagogue        | Increase in muscle mass<br>Increase in physical performance in some trials  |   |
| High-protein diet (1.2-1.5 g/kg)   | Generally well tolerated<br>Increase in body weight   | No functional improvement   |
| Antiresorptive or anabolic therapy | Reduction of the incidence of secondary fractures<br>Improved survival after a fracture   |   |

Tabla 2.2 Enfoques terapéuticos para la prevención de la debilidad músculo-esquelética (Gielen, Verschueren et al. 2012).

## 2.9 Metabolómica.

Para poder entender el concepto de metabolómica, es preciso introducir algunos elementos como son los metabolitos y el metaboloma.

En el caso de los metabolitos, estamos hablando de uno de los elementos fundamentales de los sistemas biológicos (los que constituyen la base de los mismos). Fundamentalmente, los sistemas biológicos se pueden dividir en 4 componentes bioquímicos principales, que son: los genes, transcripciones, proteínas y metabolitos.

Los metabolitos podrían llegar a definirse como productos químicos, orgánicos o inorgánicos, de bajo peso molecular que son intermediarios o productos de reacciones bioquímicas mediadas por enzimas. En su detección hemos utilizado herramientas de última generación como la resonancia magnética nuclear (NMR), que se explicará con más detalle más adelante.

Otro elemento que debe ser explicado es el de metaboloma. El metaboloma es el conjunto cuantitativo de metabolitos que se encuentran en un sistema biológico. En el caso de los humanos, por ejemplo, se ha realizado una aproximación (probablemente subestimada) de que se contienen miles de metabolitos diferentes. El metaboloma se puede subclasificar a su vez en endometaboloma (aquellos metabolitos que son el resultado del metabolismo intracelular) y en exometaboloma (aquellos que presentan un origen extracelular). Por ello, muchos metabolitos, y por tanto el metaboloma, son el resultado de los procesos metabólicos de los

organismos (ya sea mediante el catabolismo o el anabolismo) (Fiehn, O. 2002, Dunn, W. B., et al. 2010).

Por ello, entendemos la metabolómica como el estudio de los metabolitos involucrados en el metabolismo y cómo son modificados a través de la interacción con enzimas u otros cofactores. Un ejemplo de la importancia de la metabolómica es que nos ha permitido entender procesos tan complicados como la homeostasis interna de los seres vivos, pues se mantiene un ambiente químico estable mediante el control del metabolismo. Por tanto, se podría concluir que la metabolómica es el estudio comprensivo de los metabolitos presentes en los sistemas biológicos (Dunn, W. B., et al. 2010).

Además de todo esto, es preciso destacar que la detección de los metabolitos es mucho menos laboriosa y costosa que las de la transcripción o la medición proteica, otorgándole una ventaja frente a estas otras técnicas.

La metabolómica es un apartado de la ciencia relativamente nuevo, pues la primera referencia que se hizo a ella fue alrededor de 1970 (Horning, E. C. 1968, Pauling, L., et al. 1971). No obstante, quedó bastante estancada hasta que se desarrollaron nuevas herramientas para su estudio, como fue el caso de la NMR (por lo que en los primeros 20 años se publicaron muy pocas cosas al respecto). Es ya en la década de los 90 y principios del siglo XXI cuando se produce un crecimiento exponencial de los estudios en este campo, desarrollándose mucho el estudio sobre las complejas interacciones entre los distintos elementos y componentes biológicos.

### **2.9.1 Espectroscopia NMR. Los principios básicos.**

En nuestro caso, nos hemos decantado por su estudio y detección mediante la NMR, pues es una herramienta que nos otorga múltiples datos de la información estructural y permite la identificación de constituyentes individuales de los tejidos o materiales estudiados. A todo ello hay que añadir que se trata de un mecanismo de análisis que no altera la muestra y es fácilmente reproducible, además de que permite múltiples análisis de la misma muestra al no lesionarla.



### 3. *OBJETIVOS*



### **3.1 OBJETIVO:**

El objetivo general de la presente tesis consiste en el estudio del efecto del ejercicio físico espontáneo durante toda la vida sobre la longevidad, la salud y la fragilidad en ratones C57BL/6J.

#### **3.1.1 Objetivos específicos:**

1. Estudio de los efectos del ejercicio espontáneo durante toda la vida, sobre la fragilidad mediante el desarrollo de un índice de fragilidad en animales de experimentación.
2. Estudio del efecto del ejercicio espontáneo durante toda la vida, sobre los mecanismos moleculares implicados en el proceso de biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético (PGC-1 $\alpha$  y Citocromo C).
3. Estudio del efecto del ejercicio espontáneo durante toda la vida sobre el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).
4. Estudio del efecto del ejercicio espontáneo durante toda la vida, sobre el estrés oxidativo y su relación con la longevidad.
5. Estudio del efecto del ejercicio espontáneo durante toda la vida, sobre la expresión de genes relacionados con la longevidad.

6. Estudio del efecto del ejercicio espontáneo durante toda la vida, sobre las respuestas metabólicas en plasma de los ratones a la edad de 20 meses.

Estos objetivos son los que perseguimos fundamentalmente en el desarrollo de la presente tesis, y cuyas observaciones mostraremos en los siguientes apartados de la misma.

## 4. *MATERIALES Y MÉTODOS*



## 4.1 Materiales

### 4.1.1 Comité de ética

Todos los protocolos experimentales que se describen en este apartado fueron realizados de acuerdo con el establecimiento en el Real Decreto 1201/2005, del 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 21 dE Octubre 2005). El Comité de Ética en Investigación de la Universitat de València aprobó el procedimiento experimental de la presente tesis doctoral.

### 4.1.2 Animales de experimentación

.Este estudio se desarrolló con ratones C57BL/6J machos. Fueron comprados a Jackson Laboratory en el año 2008.



Figura 4.1 Ratón C57BL/6

#### 4.1.2.1 Estandarización genética

Utilizar animales genéticamente homogéneos, en condiciones estables y definidas, permite reducir la variabilidad y aumenta la calidad de los resultados experimentales.

#### **4.1.2.2 Estado sanitario**

Nuestros ratones se compraron con un estado sanitario de SPF (Specific Pathogen Free), libres de agentes patógenos propios de su especie que pudieran alterar nuestros resultados experimentales. Fueron alojados en una zona convencional del animalario y tras la adaptación de una semana a las nuevas instalaciones y recuperados del estrés causado por el traslado, se inició el proyecto.

Durante todo el experimento se llevaron a cabo estudios periódicos del estado sanitario de los ratones, garantizando la calidad y fiabilidad de nuestros resultados. Este chequeo sanitario se lleva a cabo bajo las recomendaciones de la “Federation of European Laboratory Animal Science Associations” (FELASA).

#### **4.1.2.3 Estado ambiental**

Para el buen desarrollo del experimento es fundamental cumplir los cinco criterios del bienestar animal y garantizar la reproducción de los resultados en estudios posteriores, disminuyendo las interferencias y garantizando la fiabilidad y calidad de nuestros resultados. Por ello, nuestros animales se encuentran estabulados en el animalario de la Facultad de Farmacia (Universitat de València) bajo condiciones constantes de temperatura ( $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa (60 %), con ciclos de luz / oscuridad de 12 – 12 horas y acceso *ad libitum* a comida y agua.

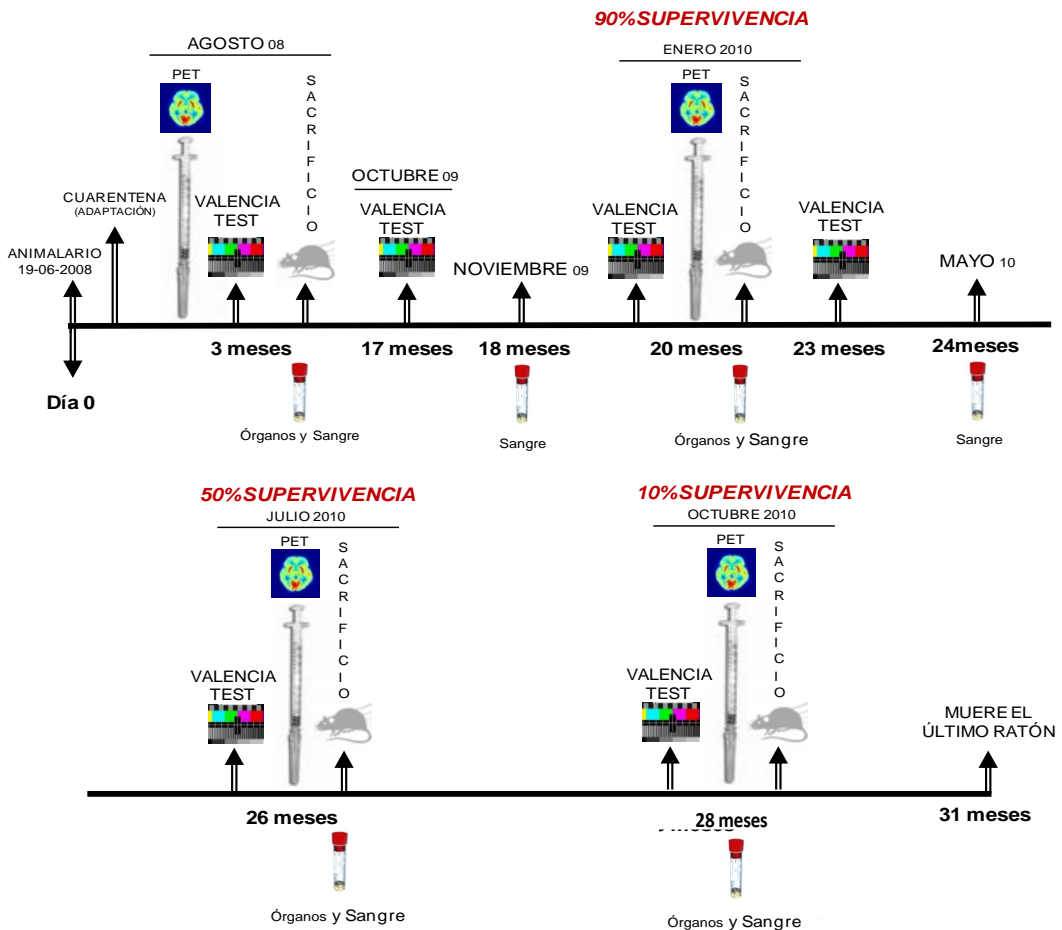


#### 4.1.2.4 Tipo de instalaciones

Según la clasificación por ILAR (Institute for Laboratory Animals Research), las instalaciones utilizadas para la presente tesis corresponden al grado III, en donde los animales se encuentran estabulados en un medio convencional con las cubetas abiertas y con presión positiva. Todos los animales se estabularon individualmente en jaulas según la normativa vigente.

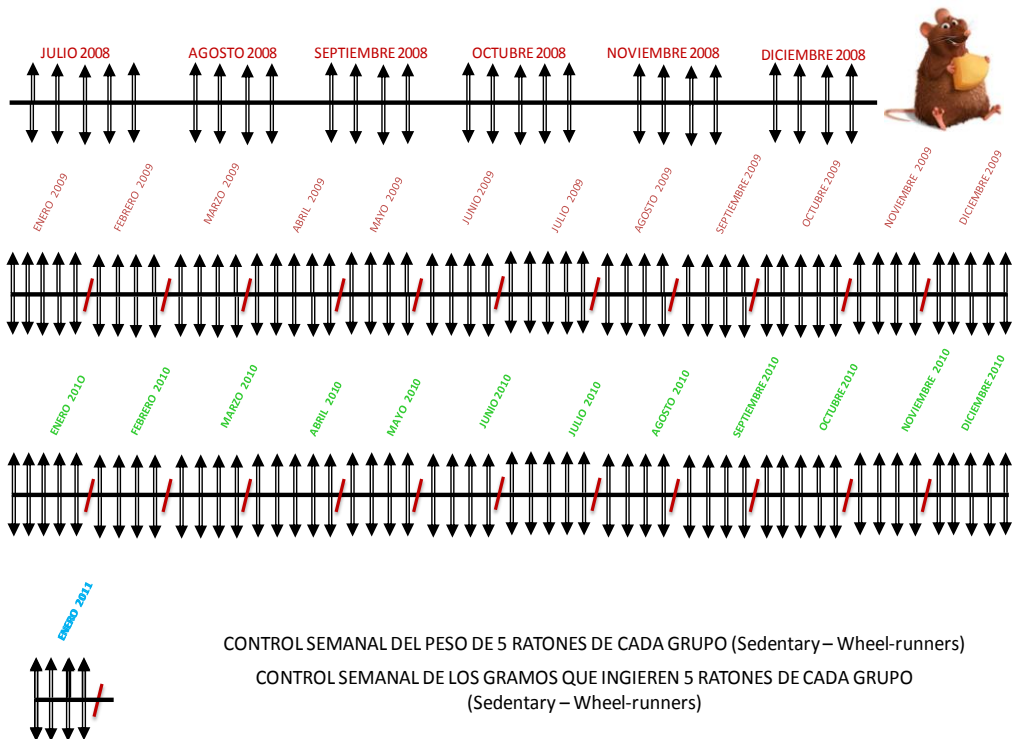
#### 4.1.3 Planificación anual

##### 4.1.3.1 Diseño experimental

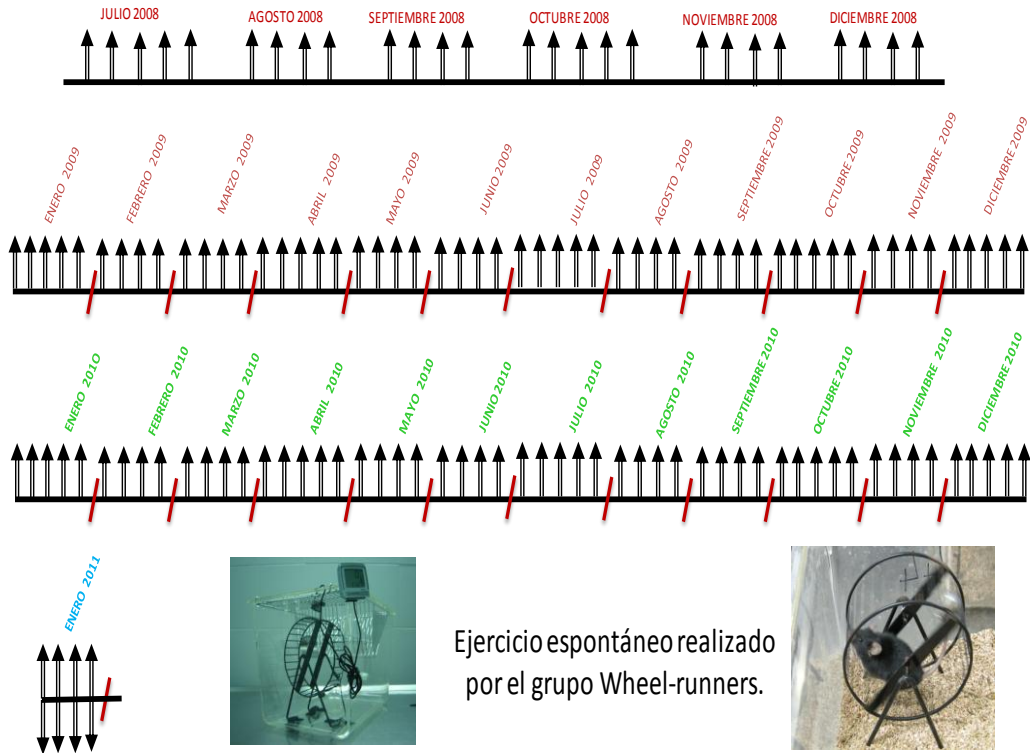


Se establecieron dos grupos experimentales (Grupo Sedentario y el Grupo Corredor) se dividieron al azar 144 en dos grupos de 74 ratones macho en cada uno de los grupos.

#### 4.1.3.2. Control y seguimiento de la ingesta y peso de los ratones



### 4.1.3.3 . Control y seguimiento del ejercicio espontáneo realizado por los animales pertenecientes al grupo activo.



Ejercicio espontáneo realizado por el grupo Wheel-runners.

#### 4.1.4 Aparatos

**Ruedas:** Modelo AQ 6084 con un diámetro de 11.5 cm procedentes de una tienda especializada en material de animales, "*Tienda Animal*".

**Cuenta-kilómetros:** Modelo CN 34030850 TOTANA, marca MACH.

**Autoclave:** Marca SELECTA, modelo Autester-G, casa comercial "Collaso S.A". Se utiliza peróxido de hidrógeno.

**Lava-biberones:** Modelo Lancer, casa comercial Matachana.

**Lava-racks:** Modelo Dynajet New SMITH, Pacific Rack Washer. Donde se utiliza detergente alcalino.

**Balanzas:** Balanza de precisión marca SARTORIUS, modelo TECATOR 6110, Balanza SARTORIUS (Portable), modelo PT 1200.

**Dispositivos fotográficos:** Sistema fotográfico marca Nikon, modelo Coolpix P80, JVC Hard disk camcorder GZ-MG27E y cámara web Genius serie V2.

**Tapiz rodante:** Marca COLUMBUS INSTRUMENTS modelo 1050 LS Excer 3/6; Columbus, OH, USA.

**Fuerza de Agarre (Grip strength):** "Bioseb" llamado Grip strength test modelo GS3.

**Dispositivo para coordinación motora:** Estructura de 45x36x36 cm y una cuerda. Construido artesanalmente siguiendo instrucciones (Matheu, A., et al. 2007).

**Centrífugas:** Para centrifugaciones de baja velocidad se utilizó una centrífuga de la firma SORVALL, modelo GLC-1. Para las de alta velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada marca HERAEUS, modelo Sepatech Biofure 17RS.

**Cromatografía líquida de alta eficacia. Para la determinación de MDA:** El cromatógrafo está compuesto por los siguientes elementos:

- Bomba marca SHIMADZU, modelo LC-10 AD
- Autoinyector SHIMADZU, modelo SIL-10AD vp
- Detector UV SHIMADZU, modelo SPD-10 AV
- Controlador del equipo CBM-10 A
- Ordenador IBM XT modelo 486 con el programa de integración CLASSLC10
- Columna TEKNOLROMA de fase reversa, modelo Spherisorb C18 cuya dimensiones son 15 x 0.46 cm y de un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m.

**Cronómetro:** Modelo No.TR 118, OREGON SCIENTIFIC.

**Fuente de alimentación para la electroforesis:** Marca SIGMA, modelo PS 250-2 y marca BIORAD, modelo 200/2.0 Power Supply.

**Cubeta de electroforesis:** Marca BIORAD, modelo Mini-PROTEAN 3Cell.

**Cubetas de electrotransferencia:** Marca BIORAD, modelo Mini- Trans-Blot Cell.

**Sistema de purificación de agua:** Marca MILLIPORE, modelo MILI-Q y MILI-RO

**Fluorímetro:** Marca PERKIN ELMER, modelo LS 50B.

**pHmetro:** Marca CRISON, modelo Microph 2001, con electrodo incorporado INGLOD.

**Desecador:** Marca EPPENDORF, modelo Concentrador 5301

**Agitador magnético:** Marca SELECTA, modelo Agimatic-S.

**Espectrofotómetro:** Marca KONTRON, modelo Uvikon 810 termostatizador Y el Microplate Spectrophotometer, marca SPECTRAMax PLUS 384.

**Baño termostaticado:** Se utilizó un baño provisto de agitación automática regulable, marca SBS, modelo BT.

**Homogeneizador:** Marca IKA-WERK, modelo Janke y Kunkel RW 20 DZH.

**Material quirúrgico:** Marca LAWTON, modelo HIBC-CODE.

#### **Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear de 14.1**

**Teslas:** Bruker Avance DRX 600 (Bruker Biospin GmbH) equipo con sondas de 5mm (500µL de muestra) y de 1mm (20µL de muestra) con capacidad de detección de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ .

**Equipo de anestesia o sedación:** Marca CIBERTEC con vaporizador de Isoflorano.

**Campana de flujo laminar vertical:** Marca CRUMA S.A., modelo 1100-GA y marca BURDINOLA, modelo OR-ST 1200.

**Nanodrop:** Marca Thermo Scientific, modelo 2000.

**Termociclador:** Marca Biorad, modelo iCycler Iqtm Multi-Color. Real-Time PCR Detection System

### **Cromatógrafo líquido de alta eficacia para la determinación de glutatión:**

Está compuesto por los siguientes elementos:

- 2 bombas marca WATERS modelo 510
- Un inyector marca PHARMACIA LKB, modelo 2157
- Detector UV marca WATERS, modelo 441, a longitud de onda constante de 365nm.
- Ordenador marca IBM XT modelo 286 con integrador y controlador del equipo.
- Columna cromatográfica marca WATERS modelo Spherisorb aminada, de dimensiones 20 x 0.46cm y 5µm de diámetro de partícula.

#### **4.1.5 Reactivos**

**Determinación de proteínas por Lowry:** Se empleó el “Protein ASSAY Kit” de Sigma-Aldrich Química, que contiene el reactivo Lowry y Folin (Lowry, O. H., et al. 1951).

**Determinación de proteínas por Bradford:** Se utilizó para la cuantificación de las muestras que se emplearon para medir la actividad de la MnSOD y GPx. Marca Biorad, siguiendo el método de Bradford (Bradford, M. M. 1976).

**Proteínas carboniladas:** Kit OxyBlot protein oxidation detection kit de Millipore.

**Revelado de las membranas de Western Blottings:** Para revelar las membranas de nitrocelulosa de los western se empleó el kit “Protoplot

Western Blot AP System” de la firma Promega. Está basado en la utilización de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa.

**Aislamiento de RNA total:** Se utilizó el kit TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen <sup>™</sup>).

**Retrotranscripción y amplificación:** Para la realización de la RT-PCR se empleo el Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for 200 and 1000; y para la amplificación se empleó Maxima<sup>®</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) de Fermentas.

**Determinación de BDNF:** Se utilizó el “Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich Elisa kit”. Casa comercial MILIPORE.

**Enzimas:** Glutación reductasa, glutación-S-transferasa (Boehringer Mannheim), xantina oxidasa y peroxidasa de rábano (Sigma).

**Otros:** Fosfato potásico, CDNB, cloruro sódico, EDTA, EGTA, MOPS, HEPES, tris, glicina, acrilamida, bisacrilamida, ácido acético, sacarosa, ácido clorhídrico, SDS, azul de bromofenol, azul comassie, DMSO, mercaptoetanol, TEMED, BSA, APS, metanol, ácido maleico, Tween 20 y Cianuro de potasio.



## 4.2 Métodos.

### 4.2.1 Curva de longevidad.

#### 4.2.1.1. Características.

La longevidad ha sido objeto de investigaciones a lo largo de los últimos años (Bronikowski, A. M., et al. 2003); además, también es notable el desarrollo que han tenido las técnicas de análisis del comportamiento animal (Cotman, C. W., et al. 2002) y cómo el ejercicio físico modula, retrasa o protege ante enfermedades o deterioros que sufre el cuerpo con el envejecimiento (Whitfield, C. W., et al. 2003, Navarro, A., et al. 2004).

En este estudio, como hemos dicho anteriormente, nuestros ratones estaban distribuidos en dos grupos y estabulados individualmente. Se lleva a cabo un seguimiento diario para verificar el estado del animal. Los ratones pertenecientes al grupo de corredores tenían acceso 24 horas al día a una rueda de 11.5 cm de diámetro, la cual estaba conectada a un sistema de recuento o medición del ejercicio, instalado en la parte superior de la jaula; mientras que los ratones del grupo sedentario sólo podían desplazarse por la jaula.

Optamos por comenzar a los 3 meses de edad debido a que los ratones alcanzan la madurez del músculo esquelético a dicha edad, además de que, a esa edad, se postula su máximo rendimiento (Lapvetelainen, T., et al. 2002).

Muchas de las pruebas se llevaron a cabo durante el transcurso de la curva de longevidad y otras a su finalización. Se realizaron sacrificios en 5 momentos puntuales de la curva de longevidad, relacionados con la

supervivencia de los animales. Al inicio del experimento (3 meses), al 90% de supervivencia (20 meses), al 50% de supervivencia (26 meses) y al 10% se supervivencia (29 meses). Todo esto se llevo a cabo con el fin de obtener muestras para análisis posteriores.

Por otro lado, dado que la fragilidad es un síndrome relacionado con la edad, las mediciones del “Valencia test” comenzaron a los 17 meses de edad de los ratones y continuaron hasta los 28 meses.

### **4.2.2 Valencia test.**

El Valencia test se llevó a cabo durante el transcurso de la curva de longevidad en distintos puntos (17,20, 26 y 28 meses). El índice de fragilidad correspondiente para cada edad y grupo se calculó sumando el número total de pruebas falladas de cada grupo dividido por el número total de pruebas realizadas por todos los animales pertenecientes al mismo grupo. Éste se expresa en porcentaje (ver figura 4.7).

Todas las pruebas realizadas se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo de actuación; es decir, se trasladó a los animales a una sala tranquila, sin ruidos y con la iluminación adecuada. Todos tuvieron su periodo de adaptación a la sala y/o a la prueba, siendo los ratones que realizaron cada uno de los test escogidos al azar.

#### **4.2.2.1. Test incremental en tapiz rodante.**

Los animales fueron sometidos a una prueba incremental en tapiz rodante para determinar su resistencia y velocidad a lo largo de la curva de

longeidad. Para ellos seguimos una modificación del estudio realizado por Davidson y colaboradores (Davidson, S. R., et al. 2006).



*Figura 4.2 Tapiz rodante*

Procedimiento:

- Se lleva a cabo una adaptación de tres días al tapiz antes de la realización de la prueba. Dicha adaptación sirve de aprendizaje para el roedor. La velocidad inicial del protocolo es de 5 metros por minuto y aumenta hasta 15 metros por minuto durante 10 minutos.
  
- Una vez el roedor haya adquirido los patrones de carrera en el tapiz, se desarrolla la prueba. Ésta consiste en llevar a cabo un calentamiento inicial de 5 minutos a una velocidad de 6 metros por minuto y, transcurrido este tiempo, se va incrementando la velocidad 2 metros por minuto cada dos 2 minutos, hasta alcanzar el agotamiento.
  
- Se establecen unos parámetros de evaluación para determinar que el ratón es incapaz de continuar corriendo; momento en el cual finaliza el test. Dicho momento se establece cuando el ratón se deja arrastrar a la parte posterior del tapiz donde se le estimula mediante

una pequeña descarga eléctrica y es incapaz de reanudar la marcha en tres ocasiones consecutivas.

#### **4.2.2.2. Fuerza de agarre (Grip strength).**

El medidor de fuerza de presión se empleó en la evaluación de la función neuromuscular mediante la determinación de la fuerza máxima realizada por el ratón. El sistema de Panlab está diseñado para detectar la fuerza máxima realizada por el ratón y queda registrada en la pantalla de dicho instrumento (Ingram, D. K. 1983, Crabbe, J. C., et al. 2003).



*Figura 4.3 Fuerza de agarre*

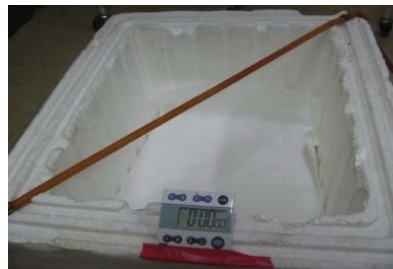
#### Procedimiento:

- Situamos al roedor sobre el sensor que tiene forma de “T”, al cual se agarra instintivamente con sus patas delanteras.
- Una vez el animal se agarra, se ejerce una tracción en dirección contraria al aparato con el fin de que el animal intente frenar dicho movimiento y se agarre lo más fuerte posible. El aparato registrará la fuerza máxima realizada por el ratón una vez éste se suelte. Esto se realiza 5 veces, dejando descansar al animal, para posteriormente

obtener la media de los valores de fuerza máxima recogida por el dinamómetro.

#### 4.2.2.3 . Coordinación motora (Tightrope test).

La prueba se basó en el método descrito previamente por Miquel y Blasco (Miquel, J., et al. 1978) y ampliamente utilizado por nuestro grupo de investigación (Matheu, A., et al. 2007).



*Figura 4.4 Coordinación motora*

#### Procedimiento:

- Se coloca al animal en medio de una cuerda de 60 cm de largo y 1 cm de diámetro. Las dimensiones de la superficie son 60cm de ancho, 50cm de alto y 30cm de largo.
- Esta prueba se consideró superada cuando el ratón salía por uno de los dos extremos o se mantenía en equilibrio durante 60 segundos.
- Todos los animales, escogidos al azar tuvieron 5 oportunidades para lograr dicha prueba.

#### 4.2.2.4 . Determinación del peso.

El peso corporal de los ratones se registró semanalmente mediante el uso de una balanza SARTORIUS (Portable), modelo PT 1200.

### **4.2.3 Tests adicionales para la determinación de la respuesta al estrés de los animales.**

Durante el desarrollo de la curva de longevidad, se llevaron a cabo distintos tests, además de los comentados con anterioridad, para determinar la respuesta al estrés de los animales.

#### **4.2.3.1. Función hepática (zoxazolamina).**

Mediante este test se perseguía comprobar el tiempo de aclaramiento o eliminación de la zoxazolamina, que es un relajante muscular utilizado como un índice de la función hepática (Pappas, P., et al. 1998). Administramos a los ratones una sola dosis inyectada intraperitonealmente de zoxazolamine ( $150\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$ ) diluida en aceite de oliva. El test se iniciaba colocando a los animales en decúbito supino tras su parálisis y se registró el tiempo necesario requerido para la recuperación del reflejo por parte de los ratones (darse la vuelta tras la parálisis inducida por este compuesto).

#### **4.2.3.2. Crecimiento de pelo.**

El test consistió en rasurar la parte dorsal del animal, aproximadamente un área de  $1.5 \text{ cm}^2$ . Se observó el crecimiento del pelo a las dos semanas y, mediante un sistema de fotografía digital, se realizó una evaluación semi-cuantitativa utilizando una escala arbitraria de uno a cuatro (donde cuatro representa la regeneración completa) (Matheu, A., et al. 2007).

#### **4.2.3.3. Tolerancia a la glucosa.**

La medición de la glucosa sanguínea se realizó para valorar el metabolismo de los roedores a una edad concreta. El protocolo consistió en la administración a 7 ratones, (de los dos grupos experimentales) de una dosis de  $2\text{g} \times \text{Kg}^{-1}$  tras un ayuno de 6 horas. La administración de la dosis de glucosa se realizó vía oral. Las mediciones se llevaron a cabo antes de la administración oral de la sustancia y tras ésta, se midió cada 15 minutos la glucemia hasta que los animales alcanzaron sus niveles basales. Esta medición se llevó a cabo extrayendo sangre de la vena safena del roedor y mediante un glucosímetro.

#### **4.2.3.4. Campo abierto.**

Es una de las pruebas más conocidas para evaluar integridad del aparato locomotor, comportamiento exploratorio y la ansiedad en animales de laboratorio (Fuss, J., et al. 2009). La prueba se desarrolla en un espacio abierto y vacío donde se evalúa el comportamiento del animal, su movimiento y sus acciones durante 5 minutos (Tartar, J. L., et al. 2009). Todo esto es filmado mediante un sistema de video digital para su posterior análisis.

#### **4.2.4 Extracción de sangre.**

A lo largo de la curva de longevidad se llevaron a cabo dos extracciones de sangre, como control y seguimiento de la misma (17 y 24 meses de edad). La cantidad establecida como volumen máximo de extracción fue de  $250\mu\text{l}$  que

se colocaron en tubos de EDTA. Este protocolo se llevó a cabo por la veterinaria responsable del animalario y la sangre se obtuvo del seno mandibular del roedor.

Los tubos fueron centrifugados inmediatamente después de la extracción a 1500 rpm, a temperatura ambiente y durante 15 minutos. El sobrenadante, producto de esta centrifugación, fue alicuotado y almacenado a -20°C.

### **4.2.5 Sacrificio de los animales. Extracción y conservación de muestras.**

Los sacrificios se llevaron a cabo a lo largo de la curva de longevidad en unos puntos concretos de su supervivencia. En cada punto establecido (Inicio, 90%, 50% y 10% de supervivencia) se escogieron al azar 4 ratones del grupo Sedentarios y 4 ratones al azar del grupo Coreadores.

Tras la anestesia con el vaporizador de Isoflorano, se abrió la cavidad abdominal y se accedió a la vena cava inferior con una jeringuilla de 2,5mL para la obtención de sangre que introdujimos en tubos con Heparina y con EDTA

Al finalizar la extracción de la sangre, se centrifugaron los dos tubos (Heparina y EDTA) a 1500 rpm, durante 15 minutos y a temperatura ambiente. De esta centrifugación se retiró el sobrenadante, el cual se utilizó para medir MDA, IGF-1 y proteínas carboniladas.



La extracción de órganos y músculos se realizó inmediatamente después y éstos se almacenaron a -80°C.

## **4.2.6 Extracción de proteínas a partir de tejido muscular.**

### **4.2.6.1. Fundamento**

Para poder completar nuestros objetivos es necesario llevar a cabo la valoración de las proteínas (Tabla 4.2.11.6) previo a la aplicación de la técnica del Western Blotting. Para llevamos a cabo el siguiente protocolo de extracción de proteínas a partir de tejido muscular.

### **4.2.6.2. Protocolo.**

- Se parte un fragmento de músculo esquelético que pese alrededor de 100mg, que es lavado en primer lugar con PBS.
- Tras el lavado, se introduce el tejido en un homogeneizador tipo Dounce de vidrio en donde se encuentra nuestro tampón de lisis frío. La proporción es 1mL de tampón por cada 100mg de tejido.
- El Buffer (Stock) consta de: Tris 10mM pH 7.5 ; Sacarosa 0.25M; 50mM NaCl; 5mM EDTA; Pirofosfato Sódico 30Mm.
- Se le añade en el día de su utilización: 1% Nonidet-P40; Ortovanadato Sódico 100µM, 50 mM NaF, 0.25% Sodium deoxycholate, 5µL por mL de tampón del cocktail de inhibidores de proteasas.

- La suspensión se somete a 20 pases de homogeneización con el émbolo.
- El producto del paso previo se pasa a unos Eppendorfs (rotulados).
- Se deja la muestra 10 minutos en hielo.
- Se sónica 3 tiempos a media intensidad.
- Se centrifuga durante 15 minutos a 12000xg a 4°C.
- Se recoge el sobrenadante que contiene el extracto proteico en alícuotas y se almacena a -80°C.

### **4.2.6.3 Cuantificación**

De los extractos de proteínas, se determinó la concentración de éstas mediante el método de Lowry (Lowry, O. H., et al. 1951).

### **4.2.7 Extracción de proteínas a partir de hígado.**

Para poder llevar a cabo las mediciones en hígado a través de la transferencia desde los geles a las membranas (Western Blotting), se realiza el siguiente protocolo.

#### **4.2.7.1. Protocolo.**

- Se parte un fragmento de hígado que pese alrededor de 100mg, que es lavado en primer lugar con PBS.

- Tras el lavado, se introduce el tejido en un homogeneizador tipo Dounce de vidrio en donde se encuentra nuestro tampón de lisis frío. La proporción es 1mL de tampón por cada 100mg de tejido.
- El tampón de lisis consta de: Tris 76.5mM; SDS 2g por cada 100mL; Glicerol 10mL por cada 100mL.
- Y se le añade en el día de su utilización: 3.8mL de tampón TRIS-SDS-GLICEROL; 40µL Ortovanadato Sódico 200Mm y 40µL de inhibidor de proteasas.
- La suspensión se somete a 20 pases de homogeneización con el émbolo.
- El producto se pasa a unos eppendorfs (rotulados).
- Se deja la muestra 10 minutos en hielo.
- Se sónica 3 tiempos a media intensidad.
- Se centrifuga durante 5 minutos a 1500xg en frío (4°C).
- Se recoge el sobrenadante que contiene el extracto proteico en alícuotas y se almacena a -80°C.

#### **4.2.7.2. Cuantificación.**

De los extractos de proteínas se determinó la concentración de éstas mediante el método de Lowry (Lowry, O. H., et al. 1951).

## **4.2.8 Extracción de proteínas a partir de corteza cerebral.**

Para poder completar nuestro objetivo relacionado con BDNF en corteza a través de un Kit Elisa, se debe llevar a cabo la extracción de proteína siguiendo el protocolo explicado a continuación.

### **4.2.8.1. Protocolo.**

- Se parte un fragmento de la corteza que pese alrededor de 50mg que es lavado en primer lugar con PBS.
- Tras el lavado se introduce el tejido en un eppendorf en donde se encuentra el tampón de lisis frío. La proporción es 1mL de tampón por cada 100mg de tejido.
- El tampón consta de: Tris 100mM; 2% de BSA; 1M NaCl; 4mM EDTA; 2% Triton x-100; 5µL por mL de tampón del cocktail de inhibidores de proteasas.
- La suspensión se somete a 20 pases de homogeneización con el émbolo específico para eppendorf.
- Se centrifuga durante 30 minutos a 14000xg a 4°C.
- Se recoge el sobrenadante que contiene el extracto proteico en alícuotas y se almacena a -80°C.
- 

### **4.2.8.2. Cuantificación.**

De los extractos de proteínas se determinó la concentración de éstas mediante el método de Lowry (Lowry, O. H., et al. 1951).

## **4.2.9 Método para determinar la concentración de proteínas: Lowry.**

### **4.2.9.1. Fundamento.**

Empleamos el “Protein Assay Kit”, basado en una modificación de Peterson del método de Lowry (Lowry, O. H., et al. 1951, Peterson, G. L. 1977). El reactivo de Lowry, incluido en el kit, contiene dodecilsulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas. El reactivo de Folin, también incluido en el kit, contiene fenol, que al interactuar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul. El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas.

A la muestra se le añaden los reactivos antes mencionados y forma un complejo coloreado, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. La absorbancia de una solución es la resultante de la absorbancia del soluto cuya concentración se desea conocer.

### **4.2.9.2. Preparación de los reactivos.**

- El Lowry, solución de reactivo, se prepara añadiendo 40 ml de agua a botella de reactivo de Lowry, en polvo (0.15% Deoxycholate (DOC), ácido tricloroacético (TCA)).
- El Folin Ciocalteu (18 ml) se encuentra en botella de vidrio ámbar previstas para la solución de trabajo. A este reactivo se le añaden 90 ml de agua y se debe mezclar bien.

#### 4.2.9.3. Protocolo.

- Preparamos nuestra recta patrón. Hay que preparar una serie de eppendorfs (numerados y por duplicado) que contengan las siguientes concentraciones de Albumina (BSA): 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875 mg/ml en agua bidestilada. Para ello se pesa 50mg de BSA en un eppendorf y se le añade 1ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. Para las siguientes concentraciones sólo se realizan diluciones ½ (cogiendo la mitad del volumen de la concentración anterior y añadiendo 500µl de agua bidestilada).
  
- En cada tubo donde vamos a mezclar los reactivos introducimos:
  - 490µl de agua
  - 10µl de muestra o patrón
  - 500µl de reactivo Lowry

Hay que tener en cuenta que dependiendo de la muestra, de la que queremos saber su concentración, se realizarán previamente diluciones de la misma. Muestras derivadas de hígado, músculo esquelético y corteza (dilución ¼).

- Se dejan las muestras en oscuridad durante 20 minutos después de añadir el Lowry.
- A cada tubo le se le añade 250µl de reactivo Folin. (mezclarlo bien).
- Se dejan las muestras en oscuridad durante 30 minutos para que se desarrolle completamente la reacción. (Adquiere un color azul).
- Leer las absorbancias a 660 nm.

#### 4.2.9.4. Cálculos.

Hay que tener en cuenta los compuestos de interferencias (solventes y reactivos) que absorben a la misma longitud de onda. Se debe descartar la absorbancia de las interferencias, y para ello es necesario hacer siempre una muestra que contenga todos los componentes del sistema menos aquello que se desea medir (muestra o patrón). Esta muestra se llama blanco y la absorbancia de esta debe restarse a las muestras problema y a los patrones.

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs muestra o patrón} - \text{Abs blanco}$$

El resultado se expresa en una gráfica de la absorbancia en función de la concentración conocida (recta patrón). Si el sistema sigue la ley de Lambert-Beer, se obtiene una línea recta que pasa cerca del origen.

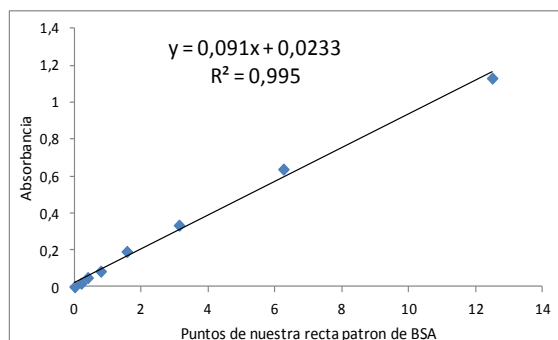


Figura 4.5 Gráfico de absorbancia

Mediante este cálculo es posible determinar gráficamente la concentración de una muestra desconocida dibujando la absorbancia frente a concentraciones conocidas. Se escoge la parte lineal y se calcula la recta de regresión lineal que mejor se ajusta. A partir de esta, se interpolan los datos de absorción de nuestras muestras problema o desconocida.

## **4.2.10 Método para determinar la concentración de proteínas: Bradford.**

### **4.2.10.1 Fundamento.**

Se utiliza el “Bradford Reagent” de la firma BIO-RAD siguiendo el protocolo de Bradford (Bradford, M. M. 1976). La unión de las proteínas con el reactivo de Bradford produce un cambio en el color del reactivo y, por tanto, un cambio en su absorbancia. El reactivo Bradford contiene ácido fosfórico, metanol y también azul de Comassie que se une a los residuos aminoacídicos de proteínas y la absorbancia se mide a 595 nm.

En los extractos de proteína de los hígados de los ratones en los diferentes puntos de la curva (3 meses o Inicio, 90% de supervivencia, 50% de supervivencia y 10% de supervivencia), se determinaron los niveles de concentración de proteínas mediante esta técnica.

### **4.2.10.2 Reactivos.**

- Agua milli-Q
- Bradford Reagent (BIO-RAD)
- BSA (seroalbúmina bovina): Para realizar la recta patrón

### **4.2.10.3 Protocolo**

- Se realiza una recta patrón de BSA, para posteriormente interpolar nuestras muestras de concentración desconocida. Para ello, hay que preparar una serie de eppendorfs que contengan las siguientes concentraciones de albumina (BSA): 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.37, 0.19



mg/ml en agua bidestilada. Para ello se pesan 50mg de BSA en un eppendorf y se le añade 1ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. Para las siguientes concentraciones, sólo se realizan diluciones ½ (cogiendo la mitad del volumen de la concentración anterior y añadiendo 500µl de agua bidestilada).

- Una vez tengamos nuestra recta patrón, esta se trata como otra muestra más. En cada microcubeta se mezclan 800µl de H<sub>2</sub>O Bidestilada , 200µl de Bradford y 2µl de muestra o patrón.
- Se lee la absorbancia a 595nm de cada una de las muestras y patrones. No hay que olvidar el “Blanco”, que consiste en una muestra que sólo contiene los reactivos. Esta nos permite saber las interferencias que ejercen estos.

#### 4.2.10.4 Cálculos.

La absorbancia de la muestra llamada “blanco” debe restarse a las muestras problema y a los patrones.

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs muestra o patrón} - \text{Abs blanco}$$

El resultado se expresa en una gráfica de absorbancia en función de la concentración de nuestros patrones. Si el sistema sigue la ley de Lambert-Beer se obtiene una línea recta que pasa cerca del origen.

Una vez obtenida las absorbancias de todas nuestras muestras. Se realiza una recta de regresión lineal con los datos de la recta patrón para interpolar en esta los datos de las muestras de las que desconocemos su concentración.

## 4.2.11 Electroforesis en geles de poliacilamida-SDS (PAGE-SDS) y posterior Western Blotting.

### 4.2.11.1 Fundamento.

Las alícuotas del lisado de las muestras se separan por electroforesis. Esta electroforesis se lleva a cabo con geles de poliacrilamida, comúnmente denominado electroforesis en poliacrilamida, que es utilizado para la separación de proteínas. Concretamente, se utilizó el PAGE en condiciones desnaturizantes. Las proteínas en presencia de algunos compuestos químicos pierden su estructura nativa y su organización tridimensional, propia de su función biológica, provocando un desplegamiento de la misma.

La combinación de un detergente desnaturizante como el SDS y un agente reductor como el  $\beta$ -mercaptoetanol separan las proteínas según su tamaño molecular y, así, es posible estimar su masa molecular.

En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas se unen a 1.4 g de SDS por cada 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.



Figura 4.6 Material del Western Blotting

#### 4.2.11.2 Condiciones del gel y transferencia

Para detectar la expresión de proteínas (Tabla 4.1), se cargaron entre 40 y 80µg de proteína en geles discontinuos al 15%, 12,5% o 10% de acrilamida con un 0,1% de SDS; sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 100 voltios durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (Tris 25 mM, Glicina 200 mM, SDS 0.1%, pH 8.3). Una vez finalizado el desplazamiento electroforético, el gel es transferido (Western Blotting) a una membrana de Nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA) mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Miniprotean II (Bio-Rad, USA). El proceso se desarrolla durante 80 minutos a una temperatura de 4°C, una intensidad constante de 240 miliamperios y en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20% v/v, pH 8.3).

A mayor concentración del gel, la separación de las bandas superiores será mayor; es decir, las de mayor peso molecular. En caso de una menor concentración del gel, conllevará una mayor separación de las proteínas de menos peso molecular, es decir, las bandas de abajo.

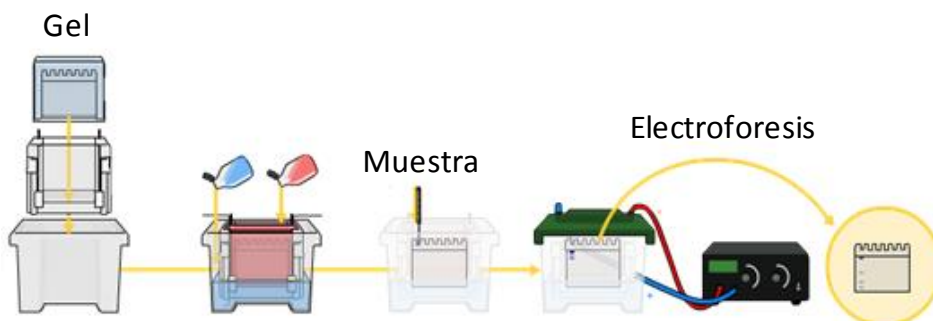


Figura 4.7 Esquema electroforesis SDS-PAGE.

#### 4.2.11.3 Protocolo

- Tras la transferencia, las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo en 0.1% Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6) o 5% de BSA en, 0.1% Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6). Esto puede variar en función de la proteína que se desea obtener, ver Tabla 4. 1.
- Se realizan tres lavados de diez minutos con 15 mL de TBS-T.
- Las membranas se incuban durante toda la noche a 4°C con agitación orbital en el tampón del anticuerpo (recomendado por la casa comercial) y con las correspondientes diluciones de anticuerpos primarios.
- Se realizan tres lavados de cinco minutos con 15 mL de TBS-T.
- Las membranas son incubadas 60 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente a cada proteína.
- Se realizan tres lavados de cinco minutos con 15 mL de TBS-T.

#### 4.2.11.4 Visualización.

- La membrana se incuba 1-5 minutos con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se expone a un digitalizador de imagen de la marca Fujifilm.
- 

#### 4.2.11.5 Cuantificación de los resultados.

Las proteínas especificadas en la tabla 4.1, se visualizaron mediante el procedimiento de quimioluminiscencia, como especifica el fabricante (Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents). Las imágenes

obtenidas fueron guardadas en formato digital TIF para poder realizar la densitometría de las bandas utilizando el software Fujifilm Image Gauge V4.0.

Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en función de los valores de expresión del control de carga (Tabla 4. 2).

#### 4.2.11.6 Relación de anticuerpos empleados.

| POTEINA     | PESO MOLECULAR | µg/µl | CASA COMERCIAL | ANTICUERPO DILUCIÓN | SECUNDARIO | □ GEL % | CONTROL DE CARGA | LECHE/BSA (%) |
|-------------|----------------|-------|----------------|---------------------|------------|---------|------------------|---------------|
| GPx         | 22 kda         | 40    | Abcam          | 1;1000              | Rabbit     | 12,5    | Tubulina         | BSA 5%        |
| MnSOD       | 25 kda         | 40    | Assay Designs  | 1;1000              | Rabbit     | 12,5    | Tubulina         | Leche 5%      |
| Catalasa    | 61 kda         | 40    | Sigma          | 1;5000              | Mouse      | 12,5    | Tubulina         | Leche 5%      |
| PGC-1α      | 92 kda         | 80    | Cayman         | 1;500               | Rabbit     | 10      | α Actina         | BSA 5%        |
| Citocromo C | 15 kda         | 25    | Santa Cruz     | 1;500               | Mouse      | 15      | α Actina         | Leche 5%      |

Tabla 4.1 Anticuerpos.

| POTEINA                           | PESO MOLECULAR | CASA COMERCIAL | ANTICUERPO DILUCIÓN | SECUNDARIO | LECHE/BSA (%) |
|-----------------------------------|----------------|----------------|---------------------|------------|---------------|
| α Actina<br>(muestras de músculo) | 48 kda         | Sigma          | 1;1000              | Mouse      | Leche 5%      |
| Tubulina<br>(muestras de hígado)  | 55 kda         | Santa Cruz     | 1;1000              | Mouse      | BSA 5%        |

Tabla 4.2 Anticuerpos (Control de carga).

## **4.2.12 Estudio de la oxidación de proteínas (Proteínas Carboniladas).**

### **4.2.12.1 Fundamento.**

El estrés oxidativo modifica la actividad de las proteínas y las hace más susceptibles a la degradación. Las modificaciones oxidativas de las proteínas por los radicales libres derivados del O<sub>2</sub> afectan a éstas, modificando algunos aminoácidos mediante la formación de puentes disulfuro en cisteínas o introduciendo grupos carbonilo (aldehídos y cetonas). Como consecuencia de dicha modificación, los grupos carbonilo se introducen en la cadena larga de las proteínas y se pueden detectar por western blotting. Este kit, mediante la derivatización de las muestras con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), marca los grupos carbonilos y queda como 2,4-dinitrofenilhidrazone, para el cual hay anticuerpos.

### **4.2.12.2 Derivatización de la muestra.**

Para la derivatización de las muestras se utilizan los reactivos presentes en el kit (OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit, MILLIPORE) así como el protocolo aconsejado por el fabricante.

- Antes de comenzar hay que determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry.
- En eppendorfs con una capacidad de 0.75 µL introducimos 5µL total de solución (15µg de proteínas + H<sub>2</sub>O bidestilada).
- Desnaturalizar todas las muestras añadiendo 5 µL de SDS 12%.
- Derivatización de las muestras:

1. Se añaden 10  $\mu\text{L}$  de 1X DNPH a cada muestra.
2. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Se añaden 7.5  $\mu\text{L}$  de la solución de neutralización.
4. Se añaden 1-1.5  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol (5%v/v).

Una vez derivatizadas las muestras, se carga el gel de poliacrilamida y se lleva a cabo el procedimiento descrito en el punto 2.4, que se denomina western blotting.

#### **4.2.12.3 Condiciones del gel y transferencia.**

Exceptuando el paso de la derivatización, todas las condiciones del gel y transferencia cumplen lo establecido en el punto 2.11.

#### **4.2.12.4 Procedimiento.**

- Una vez obtenida la membrana, tras la transferencia, se realiza una incubación de BSA al 1% en PBS-T.
- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10mL de PBS-T.
- Se incuban las membranas con el anticuerpo primario (proporcionado por el kit llamado 1<sup>o</sup> Antibody stock). La dilución debe ser 1:150 en BSA al 1%/PBS-T. Dicha incubación debe hacerse durante 1 hora en agitación orbital.
- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10mL de PBS-T.
- Se incuban de nuevo las membranas, pero esta vez con el anticuerpo secundario proporcionado por el kit llamado 2<sup>o</sup> Antibody stock. La

dilución debe ser 1:300 en BSA al 1%/PBS-T. Dicha incubación debe hacerse durante 1 hora en agitación orbital.

- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10mL de PBS-T.

### **4.2.12.5 Visualización.**

- La membrana se incuba 1-5 minutos con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se expone a un digitalizador de imagen de la marca Fujifilm.

### **4.2.12.6 Cuantificación de los resultados.**

Las imágenes obtenidas se almacenan en formato digital TIF para poder realizar la densitometría utilizando el *software* FUJIFILM Image Gauge V4.0.

La imagen de las proteínas se obtiene tras un tiempo de exposición comprendido entre 1 y 6 minutos, en función de la muestra y el investigador.

Como control de carga, teñimos las membranas con rojo ponceau. El cálculo final se obtiene del ratio: densitometría de las proteínas oxidadas/densitometría de la membrana teñida con rojo ponceau.



### **4.2.13 Determinación de los niveles de peroxidación lipídica (Malondialdehído) por cromatografía líquida de alta eficacia.**

#### **4.2.13.1 Fundamento**

Se ha seguido el método descrito por Wong y colaboradores (Wong, S. H., et al. 1987). Este método se basa en la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes en la muestra y posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malondialdehído liberado (TBA-MDA<sub>2</sub>). El malondialdehído es uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos en las membranas biológicas, capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez y un aumento de su rigidez. Por ello, es un índice ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación lipídica. En la reacción del ensayo, una molécula de MDA reaccionará con 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) produciendo un cromógeno rosa con un máximo de absorción entre 532-535nm. Los resultados obtenidos se expresarán por ml de plasma.

#### **4.2.13.2 Protocolo.**

##### **4.2.13.2.1 Recogida de muestras.**

- Muestras de sangre: Se recogen en tubos con EDTA como agente quelante del Ca<sup>+2</sup>. Hay que tener la precaución de no poner en hielo los tubos para evitar la hemólisis de los glóbulos rojos. Centrifugar a 1500g, 15 min., a 4 °C para obtener el plasma.

#### 4.2.13.2.2. Reactivos

- Tampón Acetato Sódico anhidro 2M, pH 3.5, con TBA 0.2%. Para preparar 1L se toman 119 mL de ácido acético glacial (pureza 98%) y se le añaden 600 mL de agua “mili-Q”. Se ajusta el pH hasta 3.5 con NaOH 10 M.

A continuación, se añade la solución 2g de TBA y se mantienen en agitación a 50-60°C hasta la total disolución del TBA. Se comprobará que el pH se mantiene y, si no es así, se volverá a ajustar. Finalmente se ajusta el volumen a 1litro y se guarda protegido de la luz a 4°C.

- Tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 6.8: Para 500 mL se pesan 3.4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se añaden 400 mL de agua; se ajusta el pH con KOH (1 M) hasta 6.8 y se enrasa con agua hasta el volumen final. Se guardará a 4°C.
- Tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 3.5: Para 500 ml se pesan 3.4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se añaden 400 mL de agua; se ajusta el pH con HCl (1 M) hasta 3.5 y se enrasa con agua hasta el volumen final. Se guardará a 4°C.

#### 4.2.13.2.3. Preparación de los patrones:

Dado que la identificación y cuantificación del MDA de las muestras analizadas se llevará a cabo gracias a una curva patrón, previamente a determinar el MDA de las muestras hay que elaborar dichos patrones. La elaboración se lleva a cabo mediante los siguientes pasos:

- Partimos de una solución comercial de MDA-bis (Merck) que está a una concentración de 12.2 M. Para obtener una solución inicial 10mM, diluimos 410  $\mu$ L de MDA de 12.2 M en 500 mL de agua.

- Si diluimos la solución anterior en  $\frac{1}{2}$ , tenemos entonces una solución 5 mM, a partir de la cual conseguimos los siguientes puntos de la recta patrón realizando unas diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$ .

#### **4.2.13.2.4. Procedimiento de Derivatización.**

- Todas las muestras y los patrones están preparados en eppendorfs.
- A 500  $\mu$ L del tampón inicial (con TBA) se le añaden 20-25  $\mu$ L de muestra (plasma) o patrón, ya que se trata de la misma forma.
- Estos eppendorfs se incuban durante 60 minutos a una temperatura de 95°C. Es en este punto del proceso donde se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de moléculas de malondialdehido, que se conjugan con dos moléculas de ácido toibarbitúrico (TBA). Por lo tanto, estrictamente, se determina el aducto MDA-TBA<sub>2</sub> como índice de peroxidación lipídica.
- Desde este paso, las muestras o patrones deben mantenerse en hielo para evitar la oxidación.
- Añadir 500 $\mu$ L del tampón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 6.8 a cada muestra. Agitar. Este paso es crítico ya que el aducto MDA-TBA<sub>2</sub> es inestable en el rango de pH neutro-básico, por lo que debe hacerse con rapidez.
- Centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm a temperatura de 4°C.
- Retiramos 200 $\mu$ L del sobrenadante a un nuevo eppendorf y se le añade 200  $\mu$ L del tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 3.5. Agitar.

- Tomar 200 - 300 $\mu$ L y colocarlos en un vial para realizar el análisis por HPLC.

#### 4.2.13.2.5 Preparación de las fases móviles para el HPLC.

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

- *Fase de elución (Fase A)*: La sal que contiene esta fase es  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM, pH 6,8. La relación es de 83/17 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM, pH 6,8 / acetonitrilo). El modo de preparación es el siguiente:

- Pesar 13,6g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y disolverlos en unos 1800 ml de “agua mili-Q”.

- Ajustar el pH de esta disolución con KOH 1M.

- Enrasar hasta 2000 mL.

- Añadir 410 mL de acetonitrilo. Esta solución debe homogenizarse bien.

- La solución debe filtrarse, mediante bomba de vacío y filtro de 0,22 micras (Millipore).

- *Fase de lavado (Fase B)*: está constituida por una mezcla de acetonitrilo/agua al 70%, ambos de máxima pureza y el agua del tipo “mili-Q”.

- Antes de pasar por el HPLC, ambas fases deben desgasificarse por baño de ultrasonidos unos 20 minutos.



Figura 4.8 Equipo de HPLC para la determinación de los niveles de MDA

#### 4.2.13.2.6 Condiciones cromatográficas

- Flujo de las fases: 1.0 mL/min.
- Detección en HPLC: se utiliza el detector UV a 532 nm.
- Columna: C18 Spherisorb de 15 cm de longitud y 5  $\mu\text{m}$  de partícula.

#### 4.2.13.2.7 Método cromatográfico.

Al ser un método isocrático, sólo se necesita programar el tiempo que debe pasar en cada una de las fases líquidas correspondientes. Un cromatograma conlleva unos 30 minutos. La secuencia de las fases móviles a través del HPLC es la siguiente:

| Fase A                | Fase B                 | Fase A                 |
|-----------------------|------------------------|------------------------|
| →                     | →                      | →                      |
| ELUCIÓN DE LA MUESTRA | LIMPIEZA DE LA COLUMNA | PREPARACIÓN DE COLUMNA |
| 13minutos             | 9minutos               | 8minutos               |

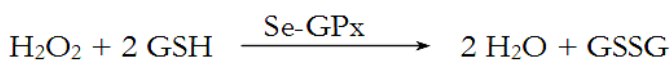
Tabla 4.3 Programa de duración, durante un cromatograma de análisis de MDA

Una programación de muestras supone repetir la secuenciación anterior tantas veces como muestras y patrones se deseen analizar.

## 4.2.14 Determinación de los niveles de actividad glutatión peroxidasa (GPx).

### 4.2.14.1 Fundamento

La encima GPx cataliza la reacción de oxidación de glutatión a glutatión disulfuro utilizando para ello peróxido de hidrógeno. Esta enzima usa como cofactor, el selenio.



Se halla predominantemente en el citosol, aunque existe cierta actividad en la mitocondria. GPx es un antioxidante primario. Convierte el peróxido de hidrogeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas (Chance et al.1979).



La actividad de GPx se determinó según el método propuesto por Flohe (Flohe, L., et al. 1984). La reacción que permite su análisis es la siguiente:

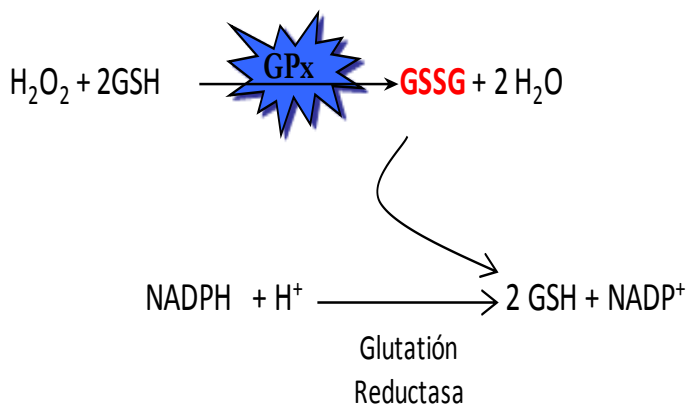


Figura 4.9 Esquema del análisis de la GPx.

De este modo, el glutatión oxidado generado en la reacción catalizada por la GPx, como consecuencia de la reducción del peróxido de hidrógeno es, a su vez, reducido en la reacción catalizada por la glutatión reductasa (que utiliza NADPH como cofactor). La desaparición de NADPH puede registrarse espectrofotométricamente a 340nm de longitud de onda.

#### **4.2.14.2 Reactivos**

Todos los reactivos preparados para esta técnica deben estar filtrados.

##### **4.2.14.2.1 Reactivos preparados con anterioridad**

- Tampón fosfato potásico 0.1 M, EDTA 1 mM, azida sódica 1 mM, pH 7.
- Azida sódica 1Mm ( $\text{Na N}_3$ ). Inhibe la catalasa. Sólo se necesita 100 $\mu$ l por muestra.
- Bicarbonato Sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) 0.1%

##### **4.2.14.2.2 Reactivos preparados en el día**

- 2.4U/mL. Glutatión Disulfuro Reductasa (GR).
- GSH 10mM se disuelve en agua.
- NADPH 1.5mM disuelto en  $\text{NaHCO}_3$  0,1%.
- Peróxido de Hidrógeno 1.5mM ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Es necesario medir la molaridad que tiene el bote madre. Se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Se pone 1998 $\mu$ l de tampón fosfato (Kpi).

- Se mide absorbancia a 240nm (blanco).
- Se añade 2 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se resuspende rápido con la pipeta de 1mL.
- Se mide absorbancia a 240nm.
- Cálculos: Se realizan siguiendo la ley de Lambert-Beer.

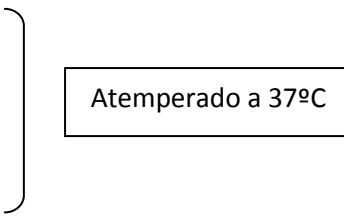
El coeficiente de extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es 40M. El resultado obtenido de la ecuación lo multiplicamos por nuestro factor de dilución (en nuestro caso 1000) y obtenemos la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los homogenados se hacen en Kpi, se sónica 3 veces 3segundos y para medir la actividad hay que diluirlos 1/50 para que el incremento de la absorbancia sea mayor a 0.02.

- Las muestras no se deben congelar hasta haber terminado la medición de su actividad. Una vez obtenidos los datos se pueden guardar a -20°C o -80°C.
- Es necesario medir la concentración de proteínas en las muestras (en la dilución utilizada para medir la actividad).

#### **4.2.14.3 Procedimiento**

Preparar un mix que contenga lo siguiente por cada muestra que se mida:

- 450 µl de Kpi
  - 50 µl de Azida
  - 100 µl de GSH
  - 100 µl de GR
- 
- Atemperado a 37°C

De esta se cogen 750 µl y se introducen en la microcubeta de plástico.



Seguido se añade:

- 50 µl de MUESTRA
- 100 µl de NADPH

Se incuba durante 5 minutos a 37°C y se añaden 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para, transcurridos 10 segundos, hacer un registro durante 3 minutos de la oxidación del NADPH mediante la disminución de la absorbancia (340nm).

#### 4.2.14.4 Cálculos

- La cantidad de NADPH oxidado por unidad de tiempo (c), se calcula según la expresión siguiente:

$$c = \frac{V_f}{\epsilon \times d \times V_m} \times \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Siendo:

- V<sub>f</sub> = volumen final (mL)
- V<sub>m</sub> = volumen de muestra (mL)
- ε = coeficiente de extinción molar
- d = paso de luz de la cubeta
- ΔA = incremento de los valores de absorbancia
- Δt = incremento de tiempo

- Es necesario medir la concentración de proteína en la muestra (la dilución utilizada). Se realiza mediante Bradford y como la muestra está muy

diluida (y no entraría dentro de la recta) se ajustan los cálculos para poder medirlo. Pero se sigue el protocolo explicado en el apartado 2.10.

- 775µl de agua
  - 200µl de Bradford
  - 25µl de muestra
- } Por muestra

El Valor final se expresa como U/mg de proteínas

## 4.2.15 Determinación de los niveles de actividad de manganeso superóxido dismutasa (MnSOD).

### 4.2.15.1 Fundamento

La superóxido dismutasa es una metaloenzima que cataliza la dismutación del anión superóxido a una molécula de oxígeno y peróxido de hidrógeno.



Hay caracterizados tres tipos de SOD dependiendo del metal que contiene: cobre/zinc (Cu/Zn), manganeso (Mn) y hierro (Fe). La Cu/Zn-SOD es citosólica, el Mn-SOD es mitocondrial y Fe-SOD se encuentra en las bacterias.

Para la determinación de esta actividad enzimática, se utiliza el kit de Cayman Chemical "Superoxide Dismutase Assay Kit" y se sigue el protocolo recomendado por el fabricante. Salvo dos aspectos muy importantes:

1. La muestra después de ser homogeneizada no se puede congelar hasta medir actividad
2. La enzima no se puede vortear

El kit de Cayman utiliza sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para exhibir el 50% de la dismutación del radical superóxido.

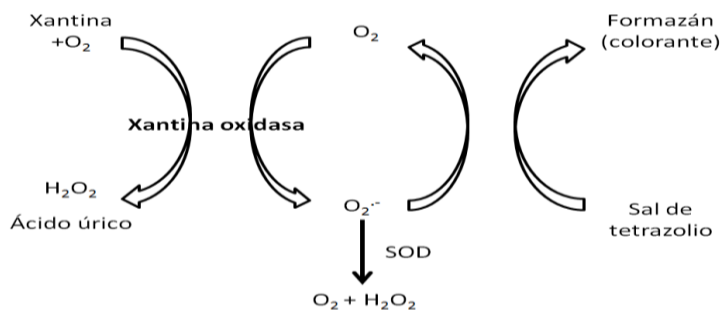


Figura 4.10 Esquema del ensayo Superóxido Dismutasa.

Con este kit se mide la actividad de los tres tipos de SOD en conjunto o por separado según interese al investigador.

#### 4.2.15.2 Reactivos

- Tampón de HEPES 20 mM, pH 7.2 (para el homogenado de tejido).
- Cianuro de potasio 2 mM (para inhibir la Cu/Zn-SOD y la SOD extracelular).
- Reactivos incluidos en el kit y su preparación:
  - Tampón de muestra 10X: se necesita una concentración del 1X en H<sub>2</sub>O milli-Q (para preparar la recta estándar de SOD, diluir la Xantina Oxidasa y las muestras).
  - Tampón de ensayo 10X: se necesita una concentración del 1X en H<sub>2</sub>O milli-Q (para diluir el detector del radical, razón 1:400).
- Detector del radical (solución de sal de tetrazolio): diluir en tampón de ensayo 1X (razón 1:400).

- SOD estándar (para construir la recta estándar).
- Xantina oxidasa: se diluye en tampón de muestras 1X (razón 1:40).

#### 4.2.15.3 Protocolo

- Preparación de las muestras:
  - Homogeneizar tejido hepático en tampón de HEPES 20mM y pH 7.2 que contiene: 1 mM EGTA, 210 mM manitol y 70 mM sacarosa.
  - En un tubo eppendorf: 100  $\mu$ L de tampón por 20 mg de hígado.
  - Sonicar durante 3 segundos, tres veces.
  - Centrifugar a 1500 g durante 5 minutos a 4°C.
  - Recoger el sobrenadante.
- Preparar diluciones de todas las muestras (razón 1:2) en tampón de muestras 1X.
- Preparación de la recta estándar de SOD:

Preparar una dilución 1/100 de SOD estándar en tampón de muestra 1X, para obtener una solución madre de SOD; a partir de la cual hacemos diluciones seriadas para elaborar una recta de varias concentraciones:

| Tubo | SOD madre ( $\mu$ L) | Tampón de muestra 1X | Actividad final de SOD (U/ml) |
|------|----------------------|----------------------|-------------------------------|
| 1    | 0                    | 1000                 | 0                             |
| 2    | 25                   | 975                  | 0.025                         |
| 3    | 50                   | 950                  | 0.0625                        |
| 4    | 100                  | 900                  | 0.125                         |
| 5    | 200                  | 800                  | 0.25                          |

Tabla 4.4 Recta estándar de la SOD.

- Preparar la reacción (en placa de 96 pocillos). Hay que tener en cuenta que cada muestra o patrón debe hacerse por duplicado como mínimo.
- Añadir a cada pocillo de recta patrón:
  - 200  $\mu\text{L}$  del detector del radical diluido
  - 10  $\mu\text{L}$  de la curva preparada anteriormente.
- Añadir a cada pocillo de muestras:
  - 190  $\mu\text{L}$  del detector del radical diluido
  - 10  $\mu\text{L}$  de inhibidor (cianuro potásico 2mM)
  - 10  $\mu\text{L}$  de muestra
- Iniciar la reacción:
  - Añadir 20  $\mu\text{L}$  de Xantina Oxidasa diluida en todos los pocillos en donde se tiene la recta patrón o muestra.
  - Agitar la placa cuidadosamente durante unos segundos.
  - Incubar la placa en agitación durante 20 minutos a 25°C.
  - Leer la absorbancia en espectrofotómetro de placas a  $\lambda=450\text{ nm}$
- Medir la concentración de proteínas con el método de Bradford para extrapolar la actividad enzimática por miligramo de proteína. Protocolo explicado en el apartado 2.10.

#### **4.2.15.4 Cálculos**

- Calcular la absorbancia promedio de cada concentración de la SOD estándar y de las muestra medidas por duplicado.

- Dividir la absorbancia del tubo 1 (de la recta estándar, tabla 4.4) sobre sí mismo y dividir esa misma absorbancia, del tubo 1 de la recta, sobre las absorbancias de los otros puntos de la recta y de las muestras. Así observamos el ratio de linealidad llamado recta de Regresión Lineal (LR).

Ejemplo: LR para punto 2 de la recta = Abs Std 1/ Abs Std 2.

Construir una recta con los valores de LR y sus actividades finales de SOD (U/mL) de la tabla 4.4 Obtener la función de la recta.

Calcular la actividad SOD de las muestras utilizando la ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva estándar y sustituir los valores de LR de cada muestra.

$$\text{SOD} \left( \frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \left[ \frac{(\text{LR muestra} - \text{Intercepto})}{\text{Pendiente}} \times \left( \frac{0,23\text{mL}}{0,01\text{mL}} \right) \right] / \text{mg prots}$$

## 4.2.16 Aislamiento de RNA a partir de tejido.

### 4.2.16.1 Fundamento.

Para la extracción de RNA total de hígado se utiliza como reactivo TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del protocolo establecido por el fabricante, que es una modificación del método de extracción en un sólo paso de Chomczynski (Chomczynski, P., et al. 1987). Este método se basa 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).

#### **4.2.16.2 Reactivos**

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

#### **4.2.16.3 Protocolo**

##### **4.2.16.3.1 Trabajo previo**

- Autoclavar todo el material:
  - Eppendorfs (pequeños, grandes y redondos)
  - Puntas (Blancas, amarillas y azules)
  - Preparar el agua de DEPC (Autoclavar dos veces)
- Siempre que se trabaja con este material, debe realizarse en campana y previamente debe limpiarse bien con alcohol al 96%.
- Agua DEPC: 1L de agua Bi-Destilada con 1mL de agua DEPC.
- Como precaución, todos los botes o productos deben abrirse en campana y cerrarse dentro de la misma con parafilm.



#### **4.2.16.3.2 Homogenados**

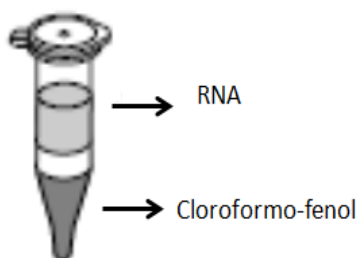
- Intentar cortar siempre la misma cantidad de muestra. A 60 mg de tejido añadimos 1mL de Trizol. El tejido cortado se guarda en Eppendorfs redondos en nitrógeno líquido hasta ser homogenados.
- Se prepara la zona de homogenar, se esteriliza.
- Se homogeneiza la muestra con 800 mL de trizol. Se comprueba que se ha destruido bien el tejido y se le añade 200 mL más que faltaban para completar el mL.
- Entre muestra y muestra hay que lavar el pistilo y el procedimiento es el siguiente:
  - Se introduce el pistilo en un eppendorf con agua oxigenada al 30% y se pone en funcionamiento.
  - Después se introduce en tres eppendorf con agua autoclavada y también se pone en funcionamiento.
  - Se debe comprobar que no quedan restos de tejido entre las cuchillas.

#### **4.2.16.3.3 Separación de fases**

- Las muestras son centrifugadas por el alto contenido en proteínas, grasas, polisacáridos y/o material extracelular, a una velocidad de 12000g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se desecha y el sobrenadante contiene el RNA que pasamos a un eppendorf nuevo para continuar el protocolo.
- Añadir Cloroformo (0,2mL por 1mL Trizol usado).
- Tapar y agitar fuerte durante 15-20 segundos.
- Se incuba durante 2-3 minutos a temperatura ambiente.

- Se centrifuga a 12000g durante 15 minutos a 4°C. Tras este paso se ven dos fases diferentes.

- La parte de abajo (color rojo) es donde se encuentra el cloroformo-fenol y corresponde a la parte orgánica
- También, se percibe una capa blanca que delimita la parte acuosa (incolora) en donde se encuentra el RNA.



*Figura 4.11 Esquema visual de la separación en dos fases tras la centrifugación.*

- Se retira esa parte acuosa a un nuevo eppendorf con mucho cuidado de no contaminarla y se guarda la orgánica a -80°C.

#### **4.2.16.3.4 Precipitación *del RNA***

- El RNA en un nuevo eppendorf obtenido por el paso anterior se precipita de la fase acuosa con Isopropil alcohol (0.5 mL por 1 mL trizol utilizado en el homogenado). Al introducir en el eppendorf esta cantidad hay que resuspender con la pipeta y el color que adquiere es “blanquecino”.

- Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente.

- Se centrifuga a 12000g durante 10 minutos a 4°C. Al terminar este paso se ve un pellet blanco en el fondo del eppendorf.

#### **4.2.16.3.5 Lavado**

- Se retira el sobrenadante volcando el eppendorf en una zona limpia y con mucho cuidado no se caiga el pellet. Si no cae todo el sobrenadante o líquido hay que retirarlo con pipeta. El pellet no debe quedarse mucho tiempo sin líquido.
- Se lava el pellet de RNA una vez con ETANOL al 75%.
- Se centrifuga a 7500g durante 5 minutos a 4°C.
- Se retira el sobrenadante (Etanol al 75%) volcando el eppendorf y retirando todo el líquido, con pipeta si fuera necesario. El pellet no debe quedarse mucho tiempo sin líquido.

#### **4.2.16.3.6 Dilución y medición de la pureza e integridad del RNA total**

- Se añaden 50µl de agua DEPC o agua libre de RNAsas al pellet que tenemos.
- Se ponen todas las muestras en el baño seco a 57°C durante 10 minutos. Si se ve que no se disuelve el pellet, se añaden otros 50µl y se vuelven a calentar las muestras otros 5-10 minutos.
- En el NANODROP se mide la pureza. Es importante llevar un eppendorf con la misma agua que se haya añadido a las muestras en el paso anterior para verificar que no esté contaminada.

Para comprobar que la extracción del RNA no está contaminada o para comprobar la pureza de la muestra, el dato obtenido en el rango 260/280 debe salir por encima de 1.7 y por debajo de 2.4.

El NANODROP es un espectrofotómetro de amplio espectro (220-270nm) que mide muestras de 1  $\mu\text{L}$  con alta precisión y reproducibilidad mediante métodos de tensión superficial.



*Figura 4.12 Nanodrop*

### **4.2.17 Retrotranscripción del una copia de DNA (cDNA).**

#### **4.2.17.1 Fundamento**

Consiste en la obtención de cDNA a partir de un RNA mensajero (mRNA), el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas DNA polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus (virus que presentan RNA como genoma, en vez de DNA). La transcripción reversa fue realizada utilizando el High-Capacity cDNA Transcription kits for 200 and 1000 Reactions (Applied Biosystems).

#### **4.2.17.2 Reactivos**

- 10X RT Buffer (específico del enzima, le permite ser activa y llevar a cabo su función).

- 25X dNTPs (100mM) (solución de desoxinucleótidos trifosfato necesarios para la síntesis de cDNA).
- 10X RT Random Primers. Cebadores al azar (puntos de anclaje que servirán a la retrotranscriptasa para iniciar la síntesis).
- Enzima MultiScribe TM Reverse Transcriptase (MsRT) (reconoce el RNA molde y tiene la actividad DNA polimerasa).
- Inhibidor de RNAsas.
- Agua libre de RNAsas (DEPC).

#### 4.2.17.3 Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT)

##### 4.2.17.3.1 Protocolo.

- En primer lugar, se prepara un “MIX” que contenga lo expuesto en la tabla 4.5. Esto se prepara en función del número de muestras que se tenga. Se cargan 10µl en cada pocillo de la placa.

|  | Volumen (µL) por Muestra |
|--|--------------------------|
| 10X RT Buffer                                      | 2                        |
| 25X dNTPs (100mM)                                  | 0,8                      |
| 25X dNTPs (100mM)                                  | 2                        |
| Inhibidor de RNAsas                                | 1                        |
| Agua libre de RNAsas (DEPC)                        | 1                        |
| Enzima MultiScribe TM Reverse Transcriptase (MsRT) | 3,2                      |
| <b>TOTAL</b>                                       | <b>10</b>                |

Tabla 4.5 Reactivos y volumen para la RT

- El volumen de muestra necesario para una correcta transcripción es de 10µl con una concentración de 1.7µg/µL. Por lo que se carga esta cantidad después del “Mix”.
- Se sella la placa para que no se contamine. (Se utilizan placas de 96 pocillos).
- Se agita suavemente para que se mezcle bien el mix con la muestra y se centrifuga para que no queden burbujas de aire que puedan interferir en una buena RT.

Importante: Tanto la placa como los reactivos deben estar en hielo en todo momento.

- Se lleva la placa al termociclador.
- Una vez finalizado todo el proceso, hay que hacer alícuotas. Una de estas se utilizará para la curva estándar (3µL por muestra).

#### 4.2.17.3.2 Condiciones de amplificación

|             | Fase 1     | Fase 2      | Fase 3    | Fase 4 |
|-------------|------------|-------------|-----------|--------|
| Temperatura | 25°C       | 37°C        | 85°C      | 4°C    |
| Tiempo      | 10 minutos | 120 minutos | 5 minutos | ∞      |

Tabla 4.6 Condiciones de los ciclos térmicos

## **4.2.18 Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa de RNA (RT-PCR en tiempo real).**

### **4.2.18.1 Fundamento.**

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) es uno de los métodos más sensibles y exactos para la detección de niveles de RNA mensajero (mRNA), tanto en células como en tejidos. Este método, a diferencia del semicuantitativo, permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, a través del empleo de compuestos con propiedades fluorescentes. Estos compuestos sólo emiten fluorescencia cuando el DNA está en forma de doble cadena, de modo que determinando el incremento de fluorescencia se puede determinar la cantidad de producto formado.

La sustancia fluorescente utilizada en dicha técnica fue el SYBR Green I; el cual, se une al DNA y emite fluorescencia sólo en el caso de que las dos hebras complementarias de DNA estén unidas.

El parámetro a tener en cuenta como dato de medida de la expresión del gen deseado (en la presente tesis fue MnSOD y GPx) es el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo es el denominado Ciclo Umbral (“threshold cycle”, Ct), y es a partir de este cuando la amplificación es apreciable.

Mediante esta técnica, cuanto mayor sea la cantidad de mRNA que haya en la muestra, mayor será la cantidad de cDNA que se obtendrá en la transcripción; y, por tanto, la amplificación se obtendrá antes. Por lo que

cuantos menos Ct se obtengan, mayor cantidad de cDNA y mayor será la expresión del gen a estudiar.

#### **4.2.18.2 Protocolo.**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que permite amplificar de forma selectiva una secuencia específica de DNA. Esta técnica utiliza dos fragmentos cortos de DNA (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o primers se unen específicamente a secuencias que rodean la región a amplificar, uno en cada cadena del DNA.

Las exigencias de la reacción simple son las siguientes:

- Deoxinucleótidos (dNTPs) que proporcionan tanto la energía como las unidades de síntesis.
- DNA Polimerasa
- Cebadores
- El DNA molde
- Un tampón que contenga magnesio

El proceso se desarrolla siguiendo tres pasos que se repiten tantas veces como sea necesario para el gen a amplificar:

- Desnaturalización: Separación de las cadenas complementarias del DNA.
- Unión de los primers específicos. Esto se realiza a una temperatura específica (según el primer).



- 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 DNA, que viene dado por la expresión  $2^n$  (siendo n el nº de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial.

La RT-PCR se lleva a cabo con el sistema de detección 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y se usa el kit de la casa comercial “Fermentas” (Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X).

Es recomendable hacer por duplicado las muestras y el control endógeno (si es posible) por triplicado, para una mayor fiabilidad; además del control negativo (sin cDNA) y el control sin Transcriptasa.

Hay que tener en cuenta y ajustar los volúmenes de la reacción al recomendado por el kit (25µL) o en nuestro caso a 20µL; puesto que nuestro sistema de PCR lo recomienda.

- Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2x) →10µL
  - Cebador sentido → 0,3µM →0,6µL
  - Cebador antisentido → 0,3µM →0,6µL
  - DNA molde 1µL (≤500ng) →1µL
  - Agua libre de RNAsas→Hasta 20µL →7,8µL
- } POR MUESTRA

Una vez efectuados los cálculos y cargada la placa de 384 pocillos especial de qPCR, eliminamos las burbujas de aire producidas a la hora de pipetear mediante una centrifugación, ya que esto podría intervenir y hacer que no fuera óptima la amplificación.

#### 4.2.18.3 Primers.

Los cebadores que se utilizaron para la determinación de los niveles de expresión de los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa GCG a partir de las secuencias génicas obtenidas en el “Genebank”.

Para complementar los objetivos de la presente tesis, se seleccionaron los siguiente genes a estudiar (todos expresados en dirección 5’ - 3’).

Se escogió como control interno el RNA de la proteína GAPDH, dado que este RNA se expresa a un nivel constante en muchos tejidos.

|              | Cebadores sentido                    | Cebadores antisentido                |
|--------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>MnSOD</b> | 5'-CGT GCT CCC ACA CAT CAA TC-3'     | 5'-TGA ACG TCA CCG AGG AGA AG-3'     |
| <b>GPx</b>   | 5'-GAC ATC AGG AGA ATG GCA AG-3'     | 5'-CAT CAC CAA GCC AAT ACC AG -3'    |
| <b>GAPDH</b> | 5'-CCT GGA GAA ACC TGC CAA GTA TG-3' | 5'-GGT CCT CAG TGT AGC CCA AGA TG-3' |

*Tabla 4.7 Secuencia de oligos utilizados para la RT-PCR.*

#### 4.2.18.4 Condiciones de amplificación.

Para una buena amplificación, las condiciones de la RT-PCR para los genes estudiados son:

- Desnaturalización inicial: 95°C, durante 10'.
- Desnaturalización: 95°C durante 15 segundos.
- Extensión, Unión o "annealing": 62°C durante 30 segundos y 45 ciclos.

#### 4.2.18.5 Cálculos.

En la presente tesis realizamos una cuantificación relativa del gen problema utilizando el método de comparación de Ct que, como se ha comentado anteriormente, es cuando el sistema comienza a detectar el aumento de la señal fluorescente asociada con un crecimiento exponencial del producto de PCR durante la fase log-lineal.

Todas las muestras se relativizan o se normalizan con el control endógeno, que en la presente tesis es GAPDH. Por otro lado, es importante verificar la eficacia de la PCR. Esta debe estar entre el 90-100%, o lo que es lo mismo, obtener una pendiente comprendida entre  $-3.6 > \text{pendiente} > 3.1$ . Para calcular dicho valor se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

El software de análisis representa dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. El ciclo umbral o Ct se convierte en una cantidad relativa a través del uso de una recta estándar construida de todas las

muestras agrupadas (3 $\mu$ L por muestra en un mismo eppendorf). Esta recta se realiza a partir de concentraciones conocidas para cada uno de los genes (el problema y el de referencia (GAPDH)). A partir de esta recta de concentraciones conocidas, se hallan las unidades relativas en función de los Ct del gen; tanto para el gen de referencia como para el gen problema.

#### **4.2.19 Determinación de los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).**

##### **4.2.19.1 Fundamento.**

BDNF juega un papel importante en el desarrollo neurológico normal. Dicho factor fue determinado mediante el Kit de Elisa “Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich”. Estudios en humanos han demostrado que el ejercicio físico tiene efectos sobre aspectos relacionados con la memoria y, que cuanto mayor actividad, mejores son los resultados; (Colcombe, S. J., et al. 2004) así como una menor incidencia de demencias (Abbott, R. D., et al. 2004, Larson, E. B., et al. 2006).

##### **4.2.19.2 Reactivos o componentes del kit.**

- Placa de Elisa para BDNF
- Tampón de lavado concentrado
- Diluyente de muestras y estándar
- BDNF estándar
- Anticuerpo Monoclonal Biotinilado anti-humano (BDNF)

- Enzima conjugada de Estreptavidina
- TMB/E Solución
- Solución de parade

#### 4.2.19.3 Protocolo.

Los niveles de BDNF se midieron por duplicado y mediante un kit. Esta medición se realizó en la corteza cerebral de los ratones sacrificados a distintos tiempos y de ambos grupos mediante los siguientes pasos:

- Extracción de proteína a partir de la corteza cerebral de los ratones. Ver apartado 2.8.

##### 4.2.19.3.1. Primer día.

- Reconstituir el vial de BDNF Standard con el Sample Diluent y, a partir de este, preparar la curva patrón con concentraciones (pg/mL) de:

500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.82, 0.

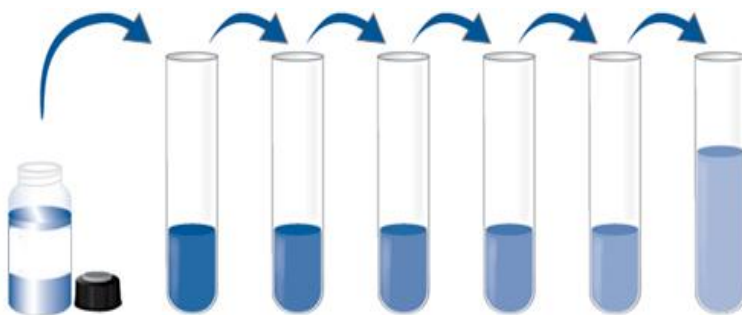


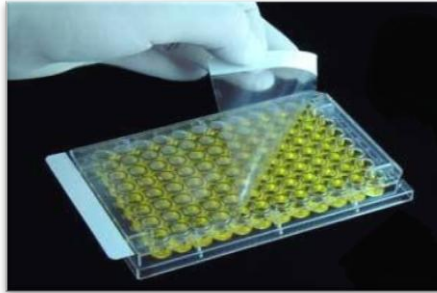
Figura 4.13 Elaboración de la recta patrón mediante diluciones seriadas.

- Diluir las muestras 1: 20 con Standard Diluent.
- Colocar el número deseado de tiras en el porta placas (96 pocillos en total).
- Añadir 100µL de las diferentes diluciones de la curva en cada pocillo (por duplicado).
- Añadir 100 µL de muestra en cada pocillo (por duplicado) y sellar la placa.
- Incubar a 4°C toda la noche (overnight), en agitación.

#### **4.2.19.3.2 Segundo día.**

- Retirar con cuidado el sellado de la placa y lavar 4 veces con Wash Buffer (1: 10).
- Añadir 100 µL de Biotinylated Mouse anti-Human BDNF y sellar nuevamente la placa.
- Incubar a temperatura ambiente 3 horas en agitación (400 rpm).
- Retirar con cuidado el sellado de la placa y lavar 4 veces con Wash Buffer (1: 10).
- Añadir 100 µL de Streptavidin-Enzyme conjugate y sellar la placa de nuevo.
- Incubar a temperatura ambiente 1 hora en agitación (400 rpm).
- Retirar con cuidado el sellado de la placa y lavar 4 veces con Wash Buffer (1: 10).
- Añadir 100 µL de TMB/E en cada pocillo previamente atemperado.
- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos; en este momento los pocillos adquieren un color azul.

- Detener la reacción con 100  $\mu\text{L}$  de Stop Solution y en este momento el color azul se convierte en amarillo.
- Inmediatamente después, leer la absorbancia a  $\lambda=450\text{nm}$ .



*Figura 4.14 Placa de Elisa*

#### **4.2.19.4 Cálculos**

Los datos obtenidos tras la lectura en el Microplate Spectrophotometer se determinan interpolando la recta patrón o curva estandar realizada de concentraciones conocidas. Los valores se expresan como  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína.

#### **4.2.20 Determinación del perfil metabólico en plasma mediante resonancia magnética nuclear.**

A un punto concreto de la curva, 20 meses de edad, se extrajo sangre a los ratones de ambos grupos con el objetivo de realizar un estudio metabolómico mediante espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN y análisis multivariable y analizar cuantitativamente los niveles de diferentes metabolitos implicados en procesos bioquímicos y celulares diferenciales.

##### **4.2.20.1 Fundamento**

La metabolómica tiene como objetivo el análisis, en la muestra biológica analizada (en este caso plasma de roedor), de las pequeñas moléculas que son producto del metabolismo. Esta información puede resultar fundamental para la comprensión de las rutas metabólicas y procesos bioquímicos característicos del sistema en estudio, ya que habitualmente los compuestos medidos representan los productos finales del metabolismo (Robertson et al., 2005, Lenz and Wilson, 2007). La espectroscopia de RM permite medir el contenido de protones en muestras biológicas complejas de moléculas de pequeño peso molecular. El espectro de  $^1\text{H}$  da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo y, por tanto, da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalarmente.



#### 4.2.20.2 Procedimiento

- La preparación de la muestra para realizar la espectrometría de RM consiste en descongelar una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  de plasma.
- A cada muestra se le añaden 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Se centrifugan a 10000 rpm durante 10 minutos a 20°C.
- Una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  es tomada del sobrenadante.
- Dicha alícuota se coloca en un tubo de 1 mm para NMR de alta resolución (Bruker Biospin GmbH).

Todos los espectros se obtienen con un Espectrómetro Bruker Avance DRX 600 (Valencia, España) operando a una frecuencia  $^1\text{H}$  de 600.13 MHz. El instrumento está equipado con una sonda de 1mm  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ .

- Las muestras se colocan en un Robot SampleJet con control de temperatura que mantiene a las mismas a 4°C hasta el momento de su medida (no más de 1 hora de espera).
- Una vez en el espectrómetro, se espera un tiempo total de 3 minutos para que la temperatura de la muestra alcance 37°C estables antes de que los espectros sean adquiridos.
- Se mide un experimento de pulso-adquisición con pre-saturación del agua para todas las muestras.

Para evitar efectos sobre la intensidad de la señal diferente de la cantidad de metabolito, se prefieren experimentos de un solo pulso sin filtrar antes que secuencias de pulso filtradas.

- Se usa una pre-saturación durante 1 segundo a lo largo del periodo de reciclado para la supresión de la señal del disolvente.

La anchura de todos los espectros es 8000 Hz para  $^1\text{H}$ . Antes de la transformación de Fourier, la FID (free induction decay) se multiplica por una ventana exponencial de 0.3 Hz.

- Se realiza un referenciado del desplazamiento químico sobre la señal del doblete CH<sub>3</sub> de la alanina a 1.475 ppm en todos los espectros.

#### **4.2.20.3 Análisis de datos y cálculos.**

Todos los espectros se procesan usando MNova (MestreLab S.A., 2008, Santiago de Compostela) y se transfieren a MATLAB (MathWorks Inc, 2006) usando sus secuencias para el análisis de datos. Se investiga la región de desplazamiento químico incluyendo las resonancias entre 0.50 y 4.70 ppm (región alifática) y 5.20 a 10.00 ppm (región aromática). Los espectros se normalizan al área espectral total alifática para eliminar las diferencias en la concentración de las muestras.

Los espectros están diezmados en cubos de 0.01 ppm y se realiza el análisis estadístico usando las secuencias propias de MATLAB y la librería de análisis estadístico multivariable PLS\_Toolbox. Las columnas están centradas a la media antes del análisis multivariable. Se aplica un Análisis de Componentes Principales (ACP) al conjunto de vectores espectrales, ya que es capaz de representar estructuras de datos multivariadas complejas en un espacio de dimensiones reducidas, conservando la estructura de los datos. Los componentes principales se eligen para explicar, al menos, el 45.2% de la varianza. Se usan los diagramas de carga de los componentes principales correspondientes para detectar las posiciones de los metabolitos más relevantes. El método de selección para las posiciones relevantes incluye

una comparación entre la carga de cada columna y el valor medio en todos los espectros. Las columnas con factores de carga más grandes que los valores espectrales medios son seleccionados como relevantes. Las señales de estos metabolitos se integran y se cuantifican usando secuencias de ajuste de picos semi-automáticos de MATLAB. Estas secuencias de ajuste se basan en los procedimientos de optimización de Lavenberg- Marquardt. La función objetivo para la optimización incluye medidas de espectros experimentales para soluciones estándar de los metabolitos seleccionados con patrones de multiplete complejo y señales de curva Lorentziana generadas teóricamente para aquellos metabolitos con patrones espectrales más simples.

#### **4.2.21 Análisis estadístico de los resultados.**

La simbología empleada en la presente tesis doctoral es la siguiente: (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ . Se usó el software SPSS (versión 17.0; SPSS Inc, Chicago,IL) para todos los análisis estadísticos.

Para el análisis estadístico de los resultados, primero se realizó un análisis de la varianza de medidas repetidas de ambos grupos (Sedentario y Corredores) a diferentes tiempos, es decir, desde los 17 meses hasta los 28 meses de edad. Las diferencias en el peso corporal, la fuerza de agarre, coordinación motora, tiempo de carrera y velocidad de la misma se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher para cada grupo de edad y los parámetros mencionados.

Para determinar el efecto de una vida activa o sedentaria por parte de los ratones durante toda su vida en la expresión de las proteínas, genes, actividades de los mismos y el factor neurotrófico, se realizó la prueba t de Student de 2 colas para muestras no apareadas. Los datos se expresan como el porcentaje de cambio que se efectúa a lo largo del tiempo, partiendo de que los datos obtenidos a los 3 meses son el 100%.

Para el estudio de los metabolitos se realizó un análisis de varianza de una cola, para determinar el grado de significación estadística de las integrales correspondientes a la media de los grupos.

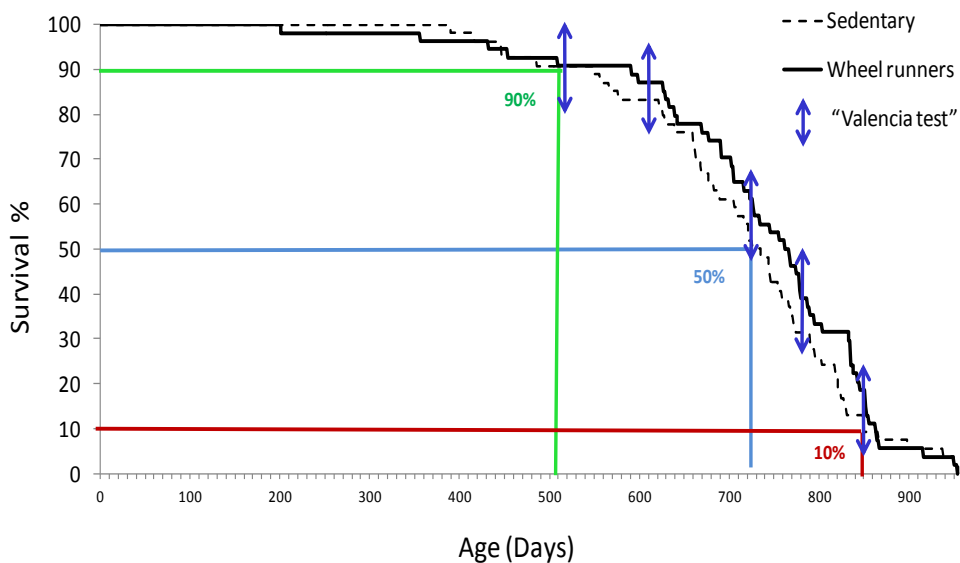
## 5. *RESULTS*



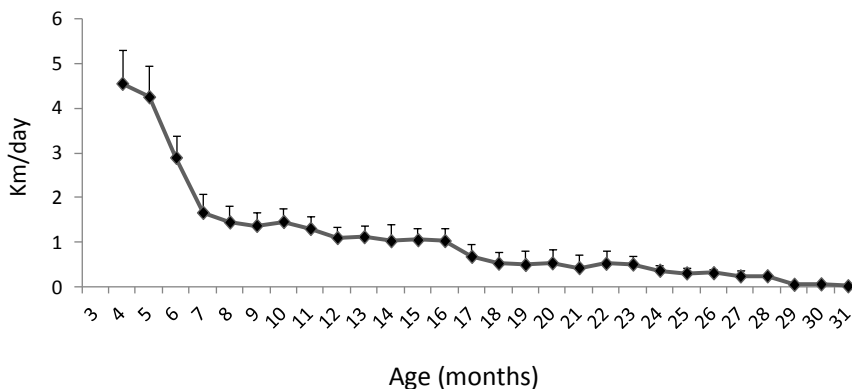
## 5.1 Effect of spontaneous wheel - running on longevity.

The following results represent all periodic measurements carried out during the project throughout the animal's life.

**Figure 5.1 Survival curve in sedentary and wheel-running mice.**



*Survival curves of cohorts of sedentary (n=72) and spontaneous wheel-running mice (n=72). Exercise does not cause an increase in either average lifespan or maximal lifespan. Maximal lifespan was defined as the age at which the oldest animal died. In our mice, it was 950 days. Average life span was defined as the age at which 50% of the animals died. It was 750 days for sedentary mice and 770 for wheel-runners ( $p>0.05$ ). The "Valencia Test" was performed at different survival time points (17, 20, 23, 26 and 28 month-old) as shown in the longevity curve with arrows.*

**Figure 5.2 Running wheel activity in mice along the longevity curve.**

*The values are expressed as mean  $\pm$  the standard deviation (n=72)*

Our mice ran an average of  $4.6 \pm 1.5$  Km  $\times$  d<sup>-1</sup> at the beginning of the experiment, when the animals were 4 month-old. Seventeen month-old mice ran approximately 0.5 Km  $\times$  d<sup>-1</sup> and, as expected, this distance declined steadily during the life of the animals to the point at which the oldest ones (29 months and older) hardly ran at all.



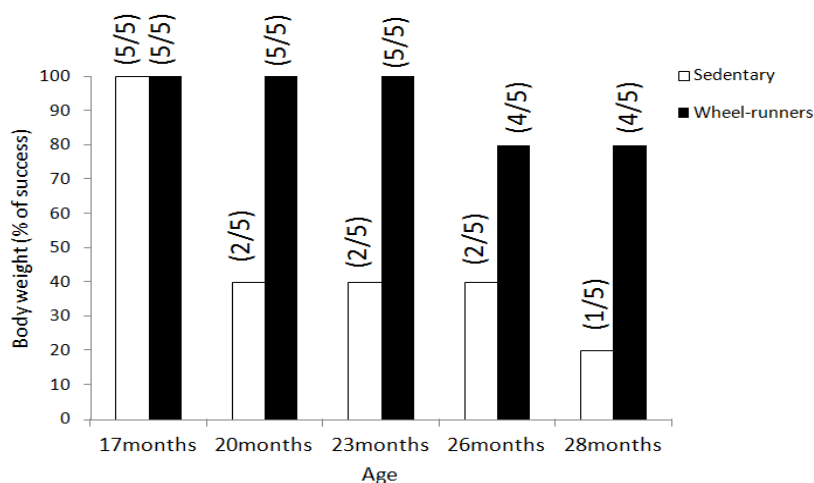
## 5.2 Effect of aging and spontaneous wheel - running on frailty. The Valencia test

The major problem to measure frailty in our study was the lack of a test for frailty in experimental animals. Although the clinical interest in frailty has grown in recent years, research in experimental animal models of frailty is very scarce. Only two models have been reported in the literature, but these models suffer from a lack of clear correlation with the clinical aspects of frailty (Walston, J., et al. 2008, Parks, R. J., et al. 2011). Thus, we had to develop a new test to determine frailty in experimental animals that we have named the “Valencia Test”. This test is based on a previous one designed to evaluate frailty developed for humans by Linda Fried (Fried, L. P., et al. 2001). We have adapted it to experimental animals (See Table 5.1). The test consists in the measurement of five components: weight loss (body weight), weakness (grip strength), poor endurance-energy and slowness (Incremental treadmill test), and low physical activity (tightrope test).

**Table 5.1 Frailty components in mice vs humans**

| VALENCIA TEST FOR FRAILITY         |   |  |
|------------------------------------|---|--|
| FRAILITY IN HUMANS                 | FRAILITY COMPONENTS                                       | FRAILITY IN RODENTS  |
| >5% BW in prior year               | ← Weight Loss, unintentional →                            | >5% BW   |
| In the lowest 20%                  | ← Weakness, Grip Strength →                               | In the lowest 20%  |
| Selfreport of exhaustion           | ← Poor Endurance and Energy →                             | Performance in an incremental treadmill test               |
| Time to walk 15 feet : slowest 20% | ← Slowness →  | Maximal velocity achieved in an incremental treadmill test |
| Score of Kcal/wk: lowest 20%       | ← Low physical activity level<br>Low motor coordination → | Tightrope test   |

*Adaptation of the parameters studied in humans for the evaluation of frailty in a model of experimental animals. The number of animals in which we could perform the tests decreased significantly with aging in every parameter studied.*

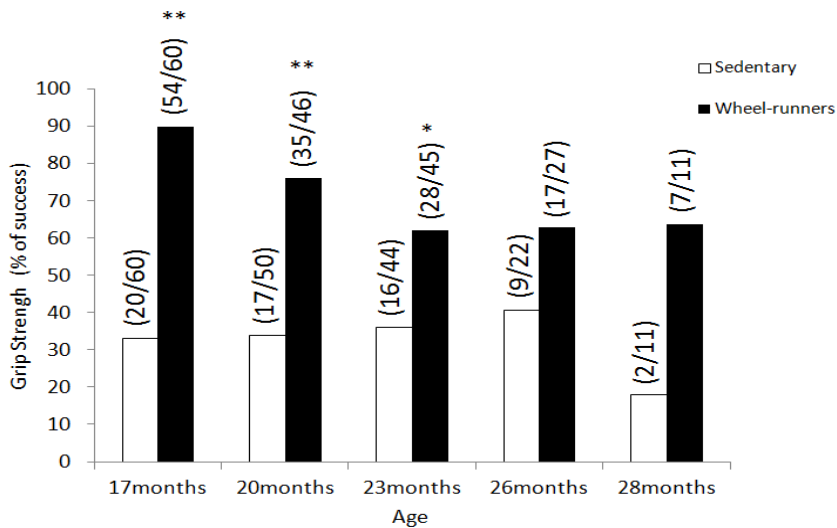
**Figure 5.3 Frailty components: unintentional weight loss.**

*Animals' body weights were recorded throughout their lives. When an animal lost more than 5% of the weight at the age of 17, we considered that it was frail for this parameter. Data are expressed as percentage of mice that did not lose more than the 5% of body weight. The number of animals tested and those that passed the test are shown above the bars.*

The figure shows the animal's body weights recorded throughout their lives. The reference values at the different survival time points (17, 20, 23, 26, and 28 month-old) were obtained as follows: we randomly selected ten mice (five sedentary and five exercise) and weighted them out. The weights were averaged and this was our 100% of weight of an old mouse (we considered old mice those that were 17 or more month-old). When an animal lost more than 5% of their weight at the age of 17, we considered that it was frail for this parameter. The sedentary group lost weight faster than the wheel-running group along time. At 17 months of age, average weights were

similar in both groups, sedentary ( $31.0 \pm 1.2$  g) and wheel-runners ( $32.8 \pm 7.8$  g). When animals grew older (28 month-old) there was a significant difference between controls ( $28.2 \pm 5.9$  g) and wheel-runners ( $32.2 \pm 7.8$  g).

**Figure 5.4 Frailty components: weakness quantified by using grip strength**

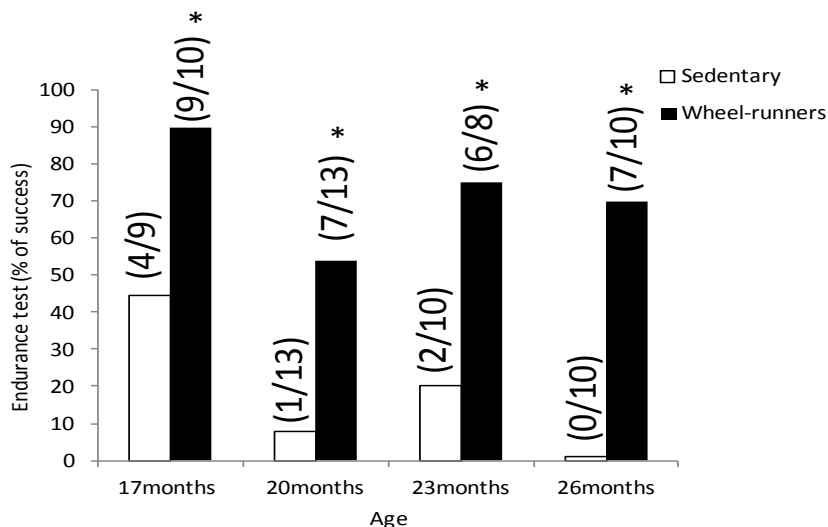


Reference mice grip strength values at the different survival points (17, 20, 23, 26 and 28 month-old) were obtained. Data are expressed as percentage of mice that did not lose grip strength when compared to the reference values. The number of animals tested and those that passed the test are shown above the bars. Fisher's Exact test for each age group is compared to the sedentary animals. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$  and (\*\*)  $p < 0.01$ .

Reference mice grip strength values at the different survival points (17, 20, 23, 26 and 28 month-old) were obtained by calculating the average values after performing the test. For instance, at the age of 17, we measured grip strength of the 120 mice that were alive at that age (60 sedentary and 60 wheel-runners). Then we averaged the grip strength of the strongest 20% mice (independently of whether they were runners or sedentary). This value was 112.9g. We calculated 80% of this value (90.4g) and we considered this as a threshold of frailty for this parameter. Those animals, whose grip strength was less than 90.4g, were considered frail for this parameter at 17 months of age. We made these calculations for 20, 23, 26, and 28 months of age. Animals belonging to the wheel-running group were significantly less frail for this parameter than controls. We can see statistically significant differences in the first months where the wheel-runners' group did better. During all times the wheel-runners' had more animals that did not meet this condition.

**Figure 5.5 Frailty components: endurance and slowness quantified by using an incremental treadmill test.**

**Figure 5.5.1. Endurance test.**

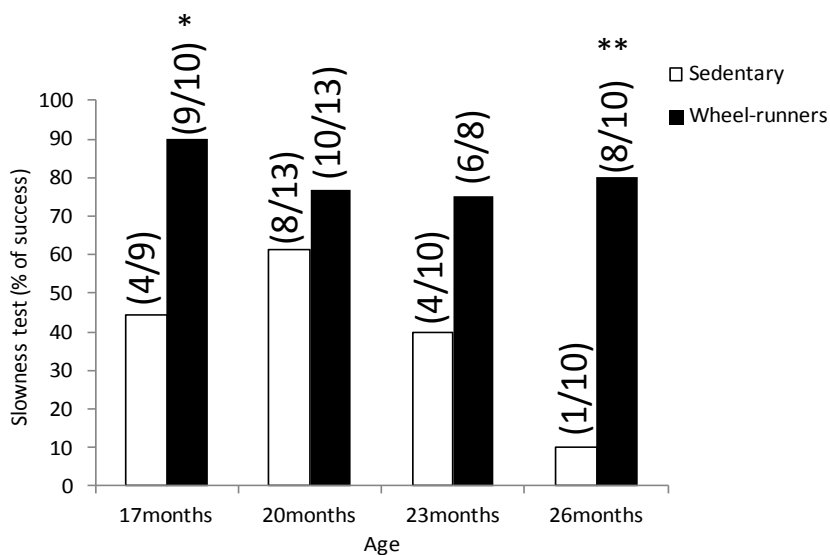


Data are expressed as the percentage of mice that did not show poor endurance (low running time) when compared to the reference values. The number of animals tested and those that pass the test are shown above the bars. Fisher's Exact test for each age group is relative to the sedentary animals. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$ .

Endurance is a key component of the diagnosis of frailty in a clinical setting (Fried, L. P., et al. 2001). We determined the reference endurance and slowness values at the different survival time points (17, 20, 23, and 26 month-old) in our mice. In this test we see the differences between both groups, were the wheel-runners have higher percentages than the sedentary group. These differences were statistically significant. For instance, we measured the running time of 19 mice of 17 months of age (9 sedentary and 10 wheel-runners). Then, we averaged the endurance of the

20% best mice (not taking into account whether they were sedentary or runners). This value was 21.0 minutes. We calculated the 80% of this value, 16.8 minutes, and we considered this as a threshold of frailty for this parameter. Those animals whose endurance was less than 16.8 minutes were considered frail for this parameter at 17 months of age. We made these calculations for the mice at 20, 23 and 26 months of age. We could not perform an endurance test in the oldest animals (28 months of age) because they were unable to keep even the lowest running intensities.

**Figure 5.5.2. Slowness test.**

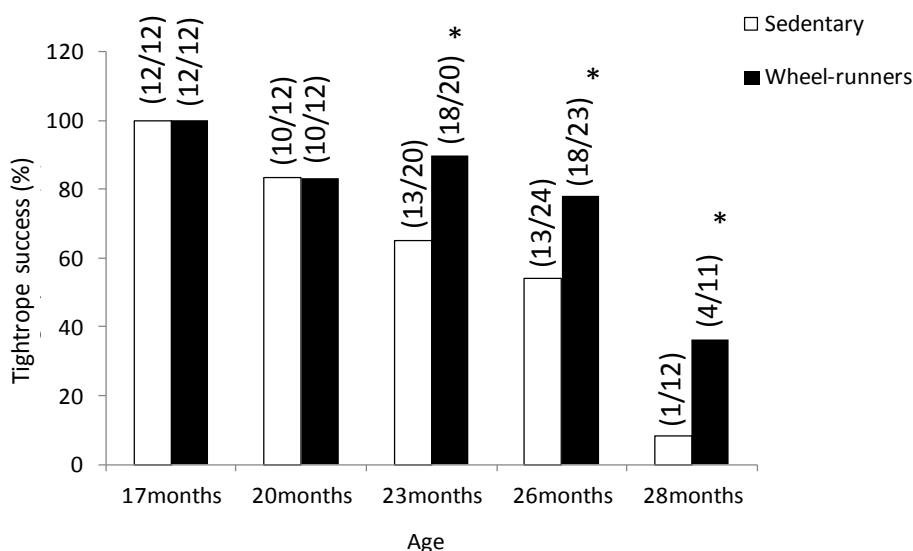


*Data are expressed as the percentage of mice that did not show slowness (low running speed) when compared to the reference values. The number of animals tested and those that passed the test are shown above the bars. Fisher's Exact test for each age group is relative to the sedentary animals. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$  and (\*\*)  $p < 0.01$ .*

We determined the running speed in an incremental treadmill test at the different survival time points (17, 20, 23, and 26 month-old) in our mice. Figure 5.5.2 shows the differences between both groups, the wheel-runners have higher speed percentages than the sedentary group. These differences were statistically significant in the first and last periods being the difference greater through time. We averaged the fastest 20% mice at the different ages studied (17, 20, 23, and 26 month-old) without taking into account whether they were sedentary or wheel-runners. For the 17 month-old mice this value was  $21.5 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$ . We calculated 80% of this value,  $17.2 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$ , and we considered it as a threshold of frailty for this parameter. Those animals whose running speed was less than  $17.2 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$  were considered frail for this parameter at 17 months of age. The same procedure was followed at each age. Again, the wheel-runners performed significantly better in this parameter than the sedentary ones.



**Figure 5.6 Frailty components: low physical activity (motor coordination) quantified by using the tightrope test.**



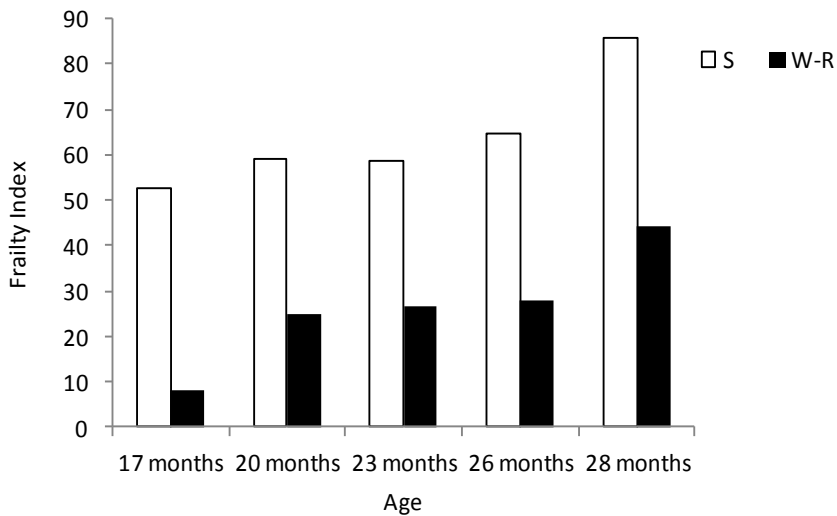
Data are expressed as the percentage of animals that successfully passed the tightrope test at the different survival time points (17, 20, 23, 26 and 28 month-old). The number of animals tested and those that passed the test are shown above the bars. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$

The tightrope test, which we have been using so far, is a widely used and extensively validated behavioral marker of aging (Matheu, A., et al. 2007, Tomas-Loba, A., et al. 2008). Neuromuscular coordination was quantified as the percentage of mice that successfully passed the tightrope test and was considered as a good marker of a decrease in physical activity. We determined the reference activity values at the different ages (17, 20, 23, 26 and 28 month-old) (See Figure 5.6). The spontaneous exercise group, with more passing members, had better results and statistically significant than the control group from the third period tested (23 months of age) onwards.

**Figure 5.7 Frailty test in sedentary and wheel-running mice.**

|                                 | 17 months |    | 20 months |    | 23 months |    | 26 months |    | 28 months |    |
|---------------------------------|-----------|----|-----------|----|-----------|----|-----------|----|-----------|----|
|                                 | W-R       | S  | W-R       | S  | W-R       | S  | W-R       | S  | W-R       | S  |
| Endurance                       | 1         | 5  | 6         | 12 | 2         | 8  | 3         | 10 |           |    |
| Slowness                        | 1         | 5  | 3         | 5  | 2         | 6  | 2         | 9  |           |    |
| Motor C.                        | 0         | 0  | 2         | 2  | 2         | 7  | 5         | 11 | 7         | 11 |
| Body W.                         | 0         | 0  | 0         | 3  | 0         | 3  | 1         | 3  | 1         | 4  |
| Grip S.                         | 6         | 40 | 11        | 33 | 17        | 28 | 10        | 13 | 4         | 9  |
| Total number test failed (A)    | 8         | 50 | 22        | 55 | 23        | 52 | 21        | 46 | 12        | 24 |
| Total number test performed (B) | 97        | 95 | 89        | 93 | 86        | 89 | 75        | 71 | 27        | 28 |

|                     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Frailty Index (A/B) | 0.08 | 0.53 | 0.25 | 0.59 | 0.27 | 0.58 | 0.28 | 0.65 | 0.44 | 0.86 |
| (A/B)x100           | 8    | 53   | 25   | 59   | 27   | 58   | 28   | 64   | 44   | 86   |



*The frailty index for each age group of animals was calculated as follows: The total number of tests failed by the animals at each age group, divided by the total number of tests performed by these animals separated by their respective groups, expressed as a percentage.*

This figure shows the difference in frailty in both groups. We can see that the sedentary group has a higher percentage of frailty than the wheel-running group in all the time periods that the animals carried out the different tests (“Valencia test”) (See Figure 5.7).

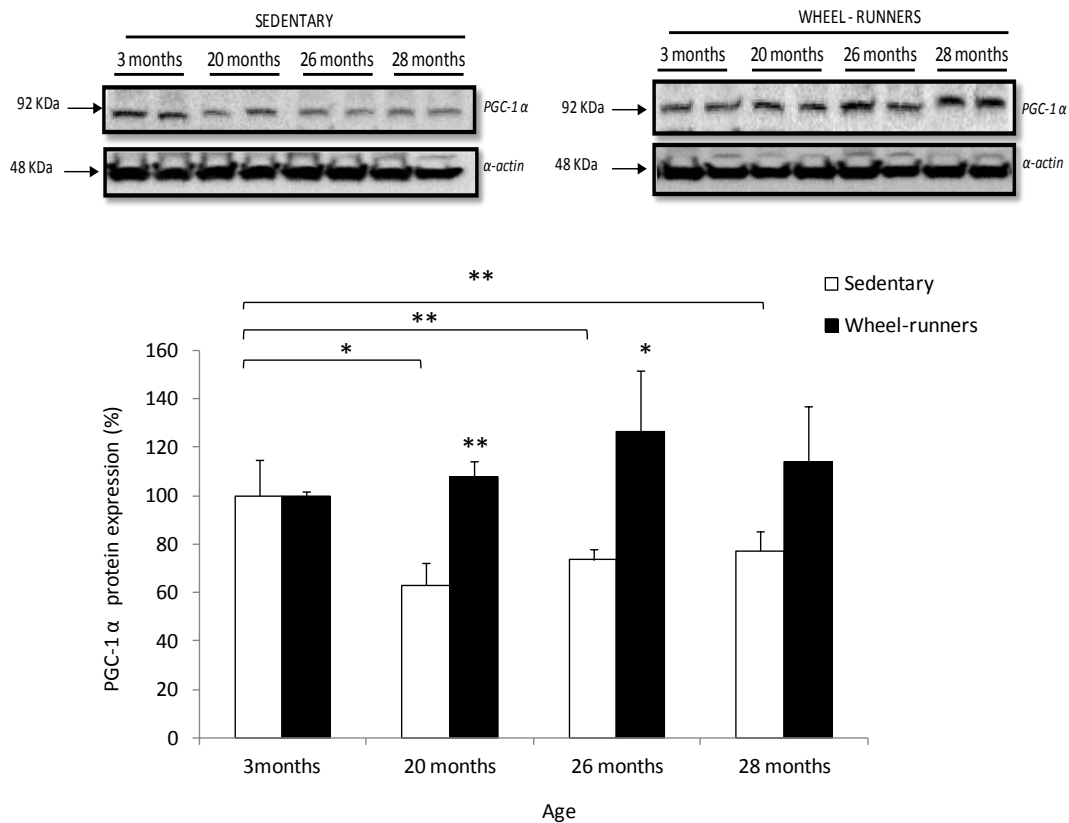
### **5.3 Effects of spontaneous exercise on mitochondrial biogenesis in gastrocnemius muscle.**

A functional muscle that has not lost the capacity to synthesize healthy mitochondria is an important contributor to the prevention of frailty (Fiatarone, M. A., et al. 1994, Gill, T. M., et al. 2010).

Early work by Miquel et al. proposed that loss of mitochondriogenesis was critical in the fundamental process of aging (Miquel, J., et al. 1980). We confirmed experimentally the validity of this hypothesis (Sastre, J., et al. 1996). Mitochondrial function may influence and contribute to frailty in older adults (Moore, A. Z., et al. 2011). We have recently shown that muscle from old rats presents a marked loss in mitochondriogenesis due to a lack of induction of PGC-1 $\alpha$ . Our study highlighted the importance of maintaining a normal PGC-1 $\alpha$  responsiveness to maintain normal muscle function (Derbre, F., et al. 2011).

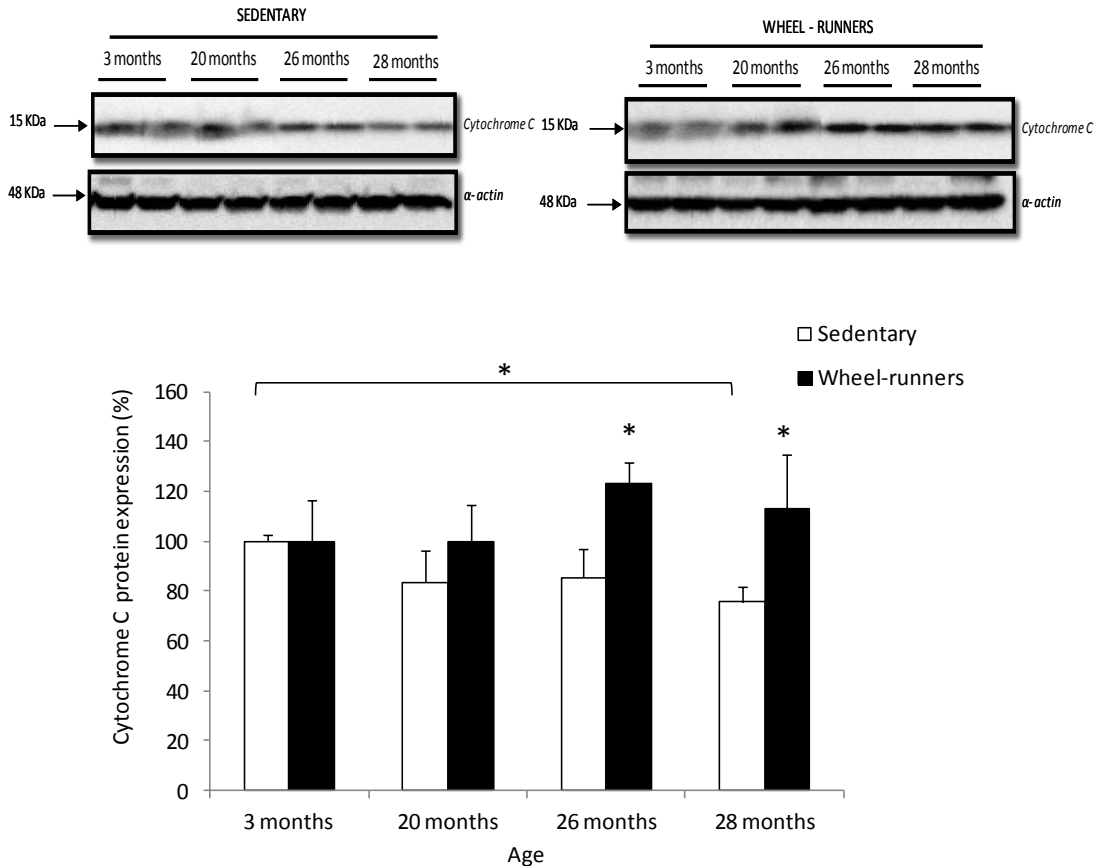
On the other hand, mitochondrial content was estimated by measuring cytochrome C protein levels in skeletal muscle (Gomez-Cabrera, M. C., et al. 2008). Cytochrome C is a protein that belongs to the mitochondrial chain of transport, and its levels have been related to mitochondrial content. Therefore, the mitochondrial amount can be estimated by the changes in cytochrome C levels when determined in tissues. Exercise caused a significant increase in mitochondrial content, especially in later stages of life i.e. when mitochondria become critical to prevent age-associated energy decay. To sum up, a sedentary lifestyle is associated with a decrease in mitochondrialogenesis during aging.

**Figure 5.8 Western blotting analysis of PGC-1 $\alpha$  protein levels in gastrocnemius muscle of sedentary and wheel-running mice at different ages.**



The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$  (\*\*)  $p < 0.01$ .  $\alpha$ -actin was determined as a housekeeping gene. Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.

**Figure 5.9 Western blotting analysis of cytochrome C in gastrocnemius muscle of sedentary and wheel-running mice at different ages.**



The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$ .  $\alpha$ -actin was determined as a housekeeping gene. Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.

Here we show that animals allowed to run spontaneously throughout their live maintain higher protein levels of PGC-1 $\alpha$  and cytochrome C (see figure 5.8 and 5.9). Thus, lifelong spontaneous exercise prevents the impairment in

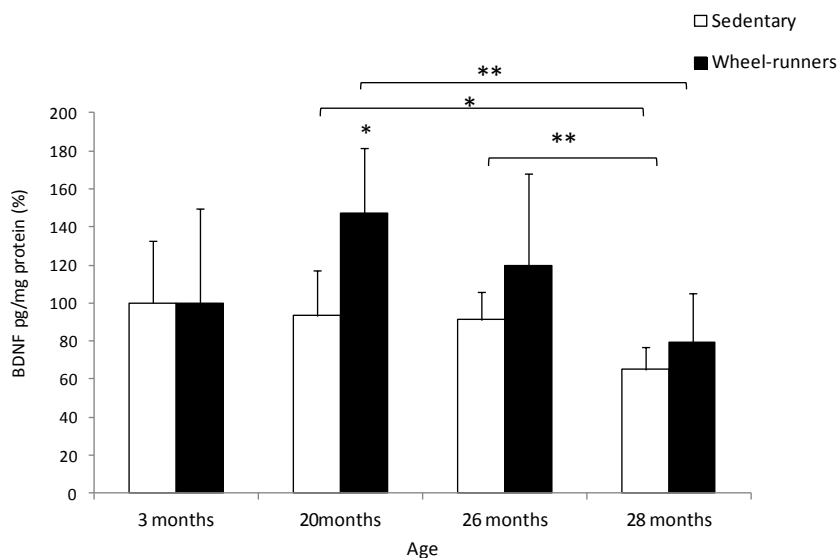
---

the skeletal muscle mitochondriogenesis pathway and decreases the frailty commonly found in sedentary laboratory animals as they age.

## **5.4 Effects of aging and spontaneous wheel - running on cortical BDNF protein levels.**

The beneficial effects of exercise on cognitive function are mainly mediated by the increased expression of neurotrophic factors in some brain areas (Neeper, S. A., et al. 1996). It has been shown that physical exercise acts on neurotrophic factors (Rasmussen, P., et al. 2009). BDNF has an important role in regulating and maintaining the survival of neurons, also having a big influence on learning and memory (Connor, B., et al. 1997). This biologic parameter has been found to interact with different diseases like Parkinson, dementia and frailty. On this last point, there is only one article, which is quite recent, that associates BDNF with the different rates of frailty described by Linda Fried (Coelho, F. M., et al. 2011).

**Figure 5.10 Cortex BDNF levels in sedentary and wheel-running mice at different ages.**



*The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$  (\*\*)  $p < 0.01$ . Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

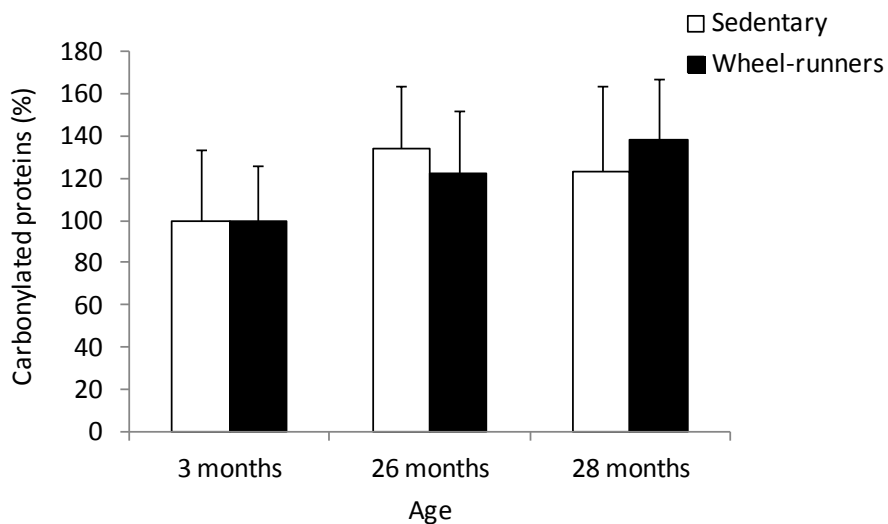
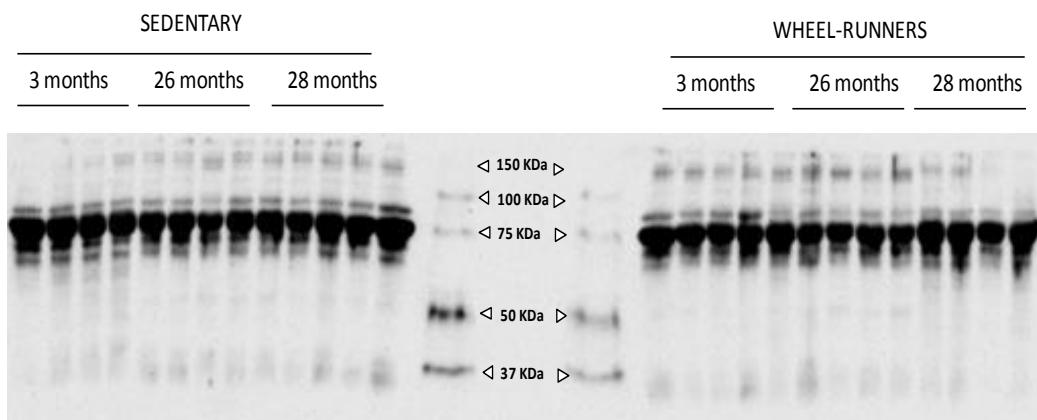
In our study the BDNF protein levels were quantified in the cortex of the animals by ELISA. We found a significant decrease of the neurotrophin in the sedentary animals. Spontaneous wheel-running significantly prevented this decrement in the 20 and 26 month-old mice (See figure 5.10).



## 5.5 Effect of aging and spontaneous wheel-running on plasma oxidative stress parameters

Oxidative stress has been associated with the pathogenesis of chronic diseases related to aging such as cancer (Warburton, D. E., et al. 2006, Gomez-Cabrera, M. C., et al. 2008), Alzheimer's (Cross, A. J., et al. 1987) and cardiovascular disease (Benzie, I. F. 2000). Thirty years ago, and according to some studies, it was said that free radicals are the main actors involved in the aging process (Harman, D. 1956, Harman, D. 1965, Harman, D. 1981, Pacifici, R. E., et al. 1991, Bondy, S. C. 1992, Krajcovicova-Kudlackova, M., et al. 2008). The biomarkers of oxidative stress involve the evaluation of oxidative modified molecules. Indeed, ROS attack to lipids, proteins, or DNA generate uniquely oxidized biomolecules that can be used as "fingerprints" to detect oxidative stress in cells. Common measures of bio-oxidation include the measurement of carbonylated proteins and lipid peroxidation (determined as MDA). We measured these two parameters in the plasma of our animals along the longevity curve.

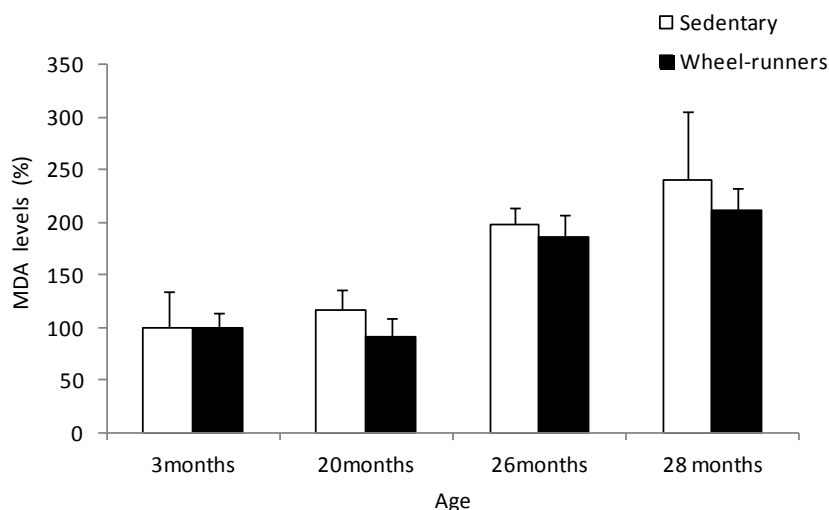
**Figure 5.11 Western blotting analysis of plasma carbonyl groups in sedentary and wheel-running mice at different ages.**



*The values are expressed as mean  $\pm$  the standard deviation. Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

Plasma protein oxidation was determined by using the Western blotting technique. Our results do not show differences between groups at the different ages tested (3, 26, and 28 months of age). Moreover, the plasma protein oxidation was not significantly increased as the mice grew older (see figure 5.11).

**Figure 5.12 Plasma levels of MDA in sedentary and wheel-running mice at different ages.**

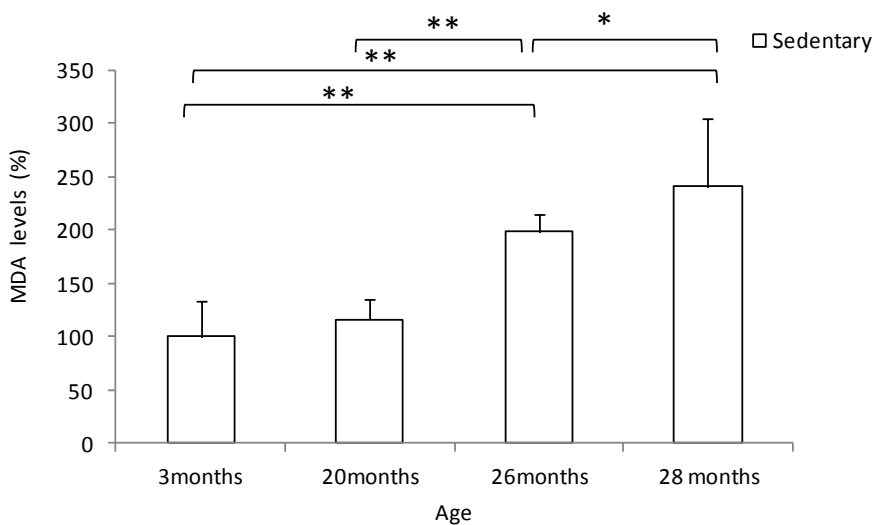


*The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

Plasma lipid peroxidation (determined as MDA) levels were determined by using the HPLC technique. We did not find statistically significant differences between the sedentary and the wheel-running animals at the different ages

tested. However, we found a significant increase in plasma lipid peroxidation in both the sedentary and the active animals as they aged (See Figure 5.12.1 and 2). The MDA plasma levels at 28 months of age doubled those found in the 3 month-old animals, independently of the group. Thus, spontaneous wheel-running did not prevent the aging-associated increase in oxidative stress.

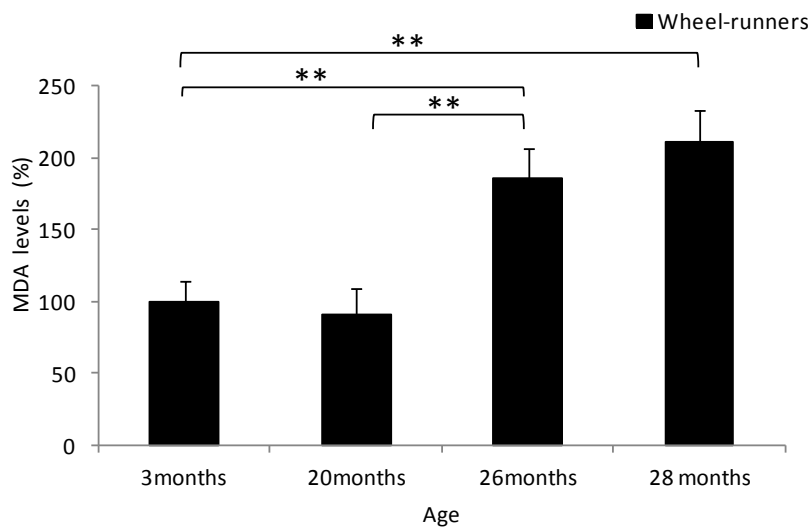
**Figure 5.12.1. Plasma levels of MDA in the sedentary group of mice at different ages.**



*The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$  and (\*\*)  $p < 0.01$ . Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

Figure 5.12.1 confirms the free radical theory of aging. It shows an increase in the plasma MDA levels in the sedentary animals as they grow older.

**Figure 5.12.2. Plasma levels of MDA in the wheel-running group of mice at different ages.**



*The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance: (\*\*)  $p < 0.01$ . Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

## **5.6 Effect of aging and spontaneous wheel - running on liver expression of longevity genes.**

The organisms have different enzymatic and non-enzymatic ways to protect itself from the “free radicals” secondary to the different metabolic reactions. They are the so-called antioxidants (Halliwell, B. 1996). Principal antioxidant enzymes include superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase. Additional antioxidant enzymes such as peroxiredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin reductase also contribute to cellular protection against oxidation. However, we have not studied them in this PhD thesis.

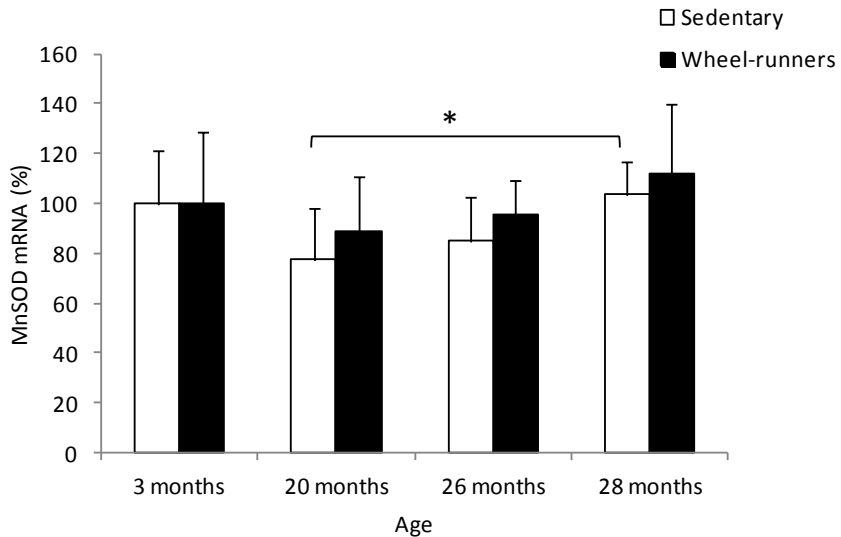
Superoxide dismutase (SOD) was discovered in 1969 by McCord and Fridovich (McCord, J. M., et al. 1969) and forms the first line of defense against superoxide radicals (Hassan, H. M. 1989).

Glutathione peroxidase (GPx) catalyzes the reduction of  $H_2O_2$  to water ( $H_2O$ ) using GSH or, in some cases, thioredoxin or glutaredoxin as the electron donor (Sastre, J., et al. 1992, Vina, J., et al. 1992).

We have previously shown that the genes that encode the antioxidant enzymes MnSOD and GPx are considered longevity genes because their over-expression can modulate lifespan (Orr, W. C., et al. 1994, Sohal, R. S., et al. 1996).

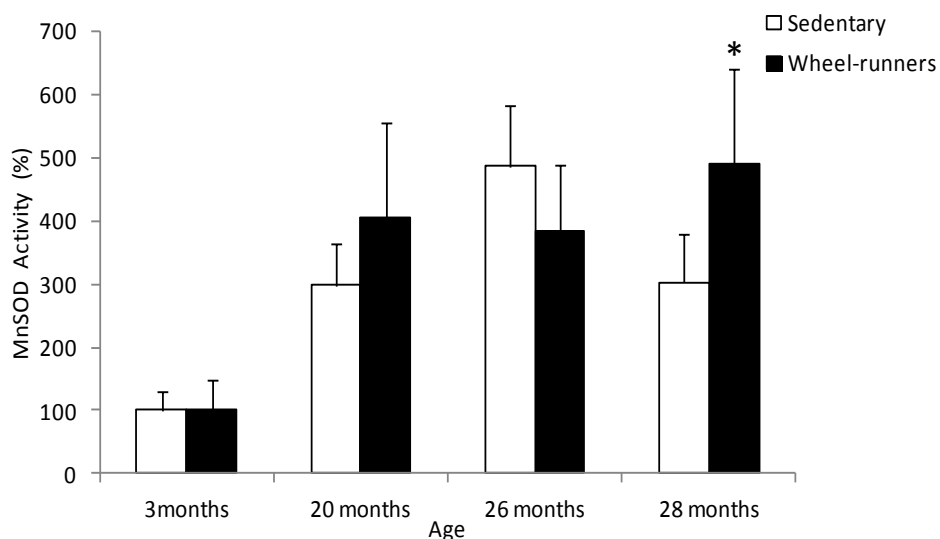
We have used two different approaches to study the effect of aging and spontaneous wheel-running on liver antioxidant enzymes: RT-PCR and the determination of the enzymes activities.

**Figure 5.13 MnSOD RT-PCR in the liver of sedentary and wheel-running mice at different ages.**



*The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$ . GAPDH mRNA content was determined as a housekeeping gene. Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

**Figure 5.14 MnSOD enzymatic activity in the liver of sedentary and wheel-running mice at different ages.**

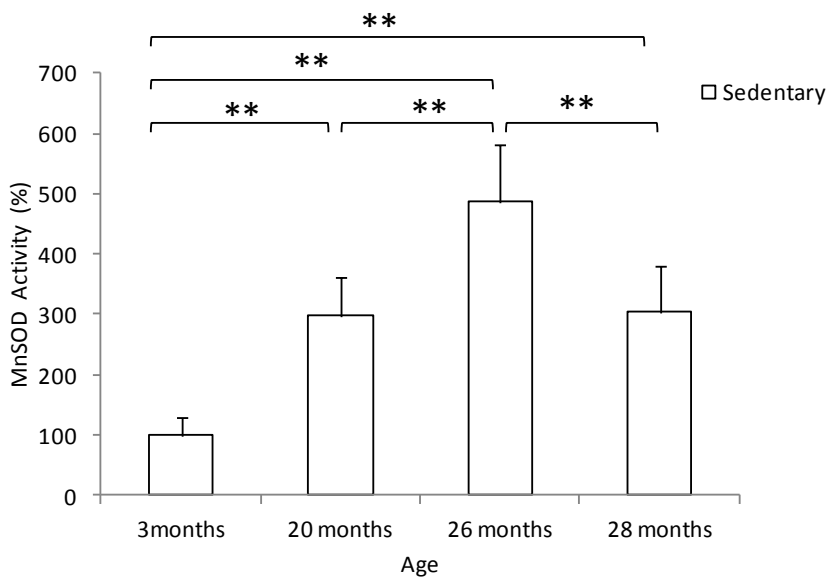


*The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$ . Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

In figure 5.14. we can see how the activity of MnSOD increases through time. Spontaneous exercise produced a high statistically significant difference compared to the sedentary group in the last period of time (28 month-old).

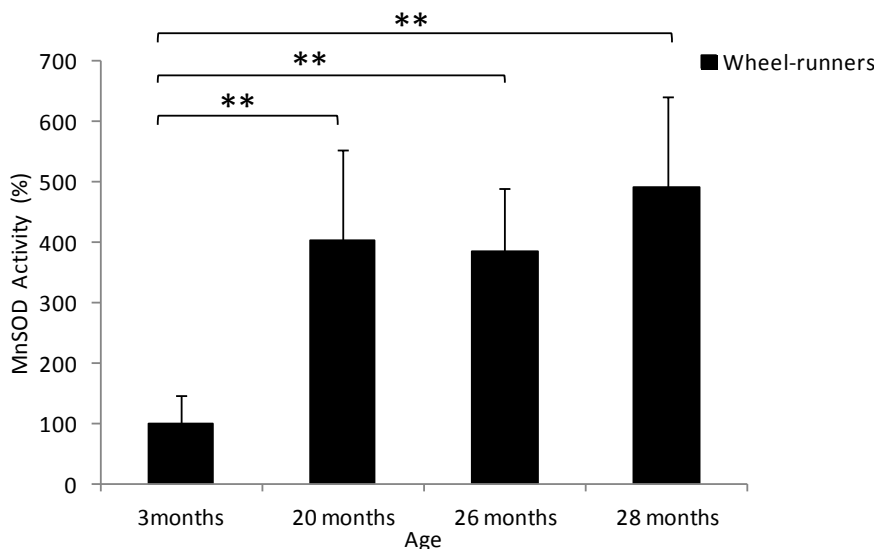


**Figure 5.14.1 MnSOD enzymatic activity in the liver of sedentary mice at different ages.**



*The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance: (\*\*)  $p < 0.01$ . Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

**Figure 5.14.2 MnSOD enzymatic activity in the liver of the wheel-running mice at different ages.**

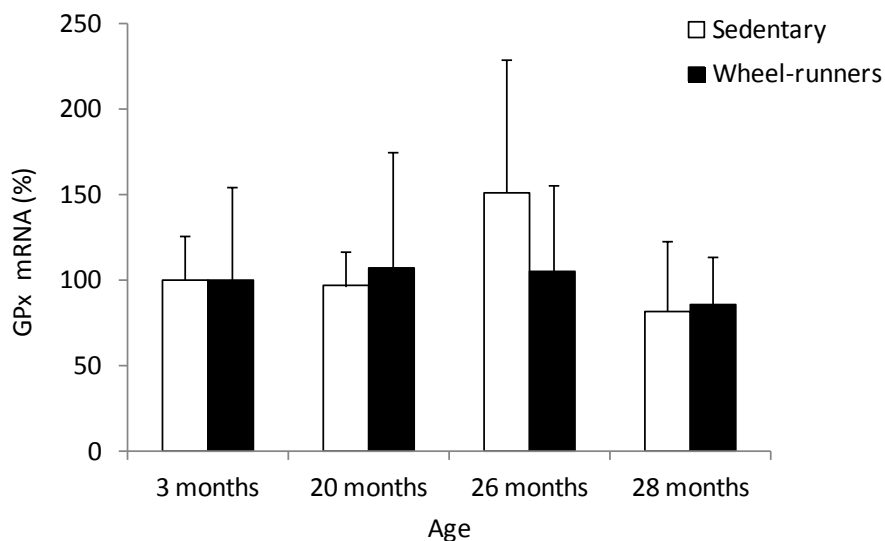


*The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance: (\*\*)  $p < 0.01$ . Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

Sedentary and wheel-runner mice showed hardly any change in the liver MnSOD mRNA levels through time. No differences between the groups were found. However, we found a statistically significant difference when comparing 20 and 28 month-old sedentary mice (see figure 5.13).

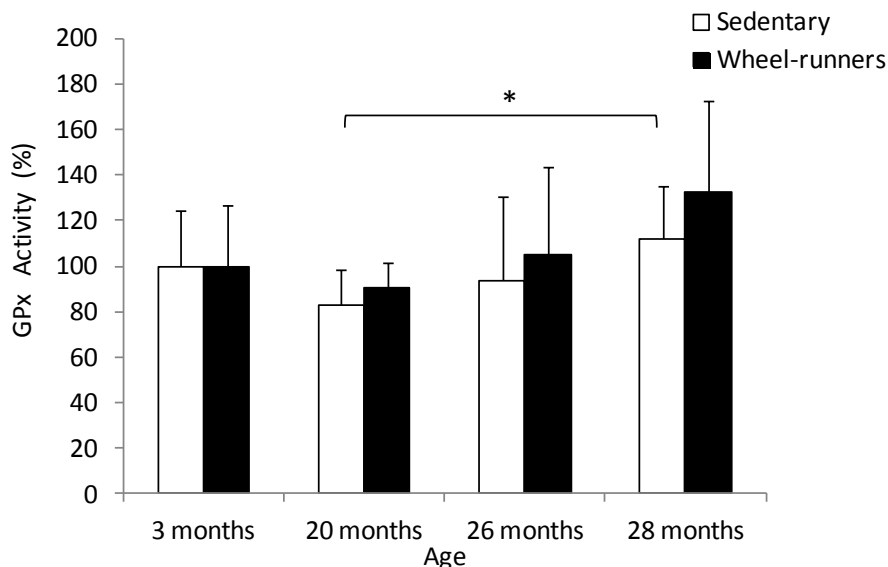
In order to clarify these results we determined the MnSOD enzymatic activity. As mice grew older, we found a significant increase in the MnSOD activity in the liver of both sedentary and spontaneous wheel-runners groups (see figure 5.14.1 and 5.14.2.). Differences between groups were found in the 28 month-old mice. The sedentary ones showed significantly lower MnSOD activity than the exercised ones (see figure 5.14).

**Figure 5.15** GPx RT-PCR in the liver of sedentary and wheel-running mice at different ages.



*The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. GAPDH mRNA content was determined as a housekeeping gene. Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

**Figure 5.16 GPx enzymatic activity in the liver of sedentary and wheel-running mice at different ages.**



*The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$ . Values were normalized to those observed in the samples obtained from the 3 month-old group, which was assigned a value of 100%.*

Our results show no changes though time in liver GPx mRNA levels in the sedentary and wheel-running groups (see figure 5.15). Moreover, no differences in the expression of the antioxidant enzymes was found between groups. However, as reported in figure 5.16, we found that the enzymatic activity of GPX increased along time both in the sedentary and the voluntary wheel-running mice. These differences reached statistical significance only in the sedentary animals when we compared 20 month-old and 28 month-old animals. No differences among groups were found in this parameter.

## 5.7 Effect of spontaneous wheel-running in the plasma metabolic profile using nuclear magnetic resonance in 20 month-old mice

Metabolomics is defined as “the quantitative measurement of the multiparametric metabolic response of living systems to pathophysiological stimuli or genetic modifications” (Nicholson, J. K., et al. 2008). High resolution NMR spectroscopy of biofluids and tissues, combined with multivariate analysis methodologies, like Principal Component Analysis (PCA), represents a powerful technique for investigating the metabolome in the area of physiology, drug toxicology and disease diagnosis and prognosis (Nicholson, J. K., et al. 2002, Ala-Korpela, M. 2007, Monleon, D., et al. 2009). NMR is one of the most efficient, robust and reproducible methods for obtaining metabolic profiles in biological specimens without extensive sample preparation (Monleon, D., et al. 2008). In most of the biomedical applications of NMR, plasma and urine molecular profiles are investigated to obtain information on exogenous and endogenous metabolism of the system.

In Table 5.2 we show the statistically significant metabolite levels according to the t-student test. Metabolic changes induced by long term spontaneous exercise affect several compounds closely related to energy metabolism. Long term spontaneous exercise in mice induces a decrease in serum alanine and lactate and an increase in citrate, which indicates some sustained changes in the TCA cycle balance. Similarly, long term spontaneous exercise increases the amount of total circulating unsaturated fatty acids and those of the serum free fatty acids. Parallel to this increase,

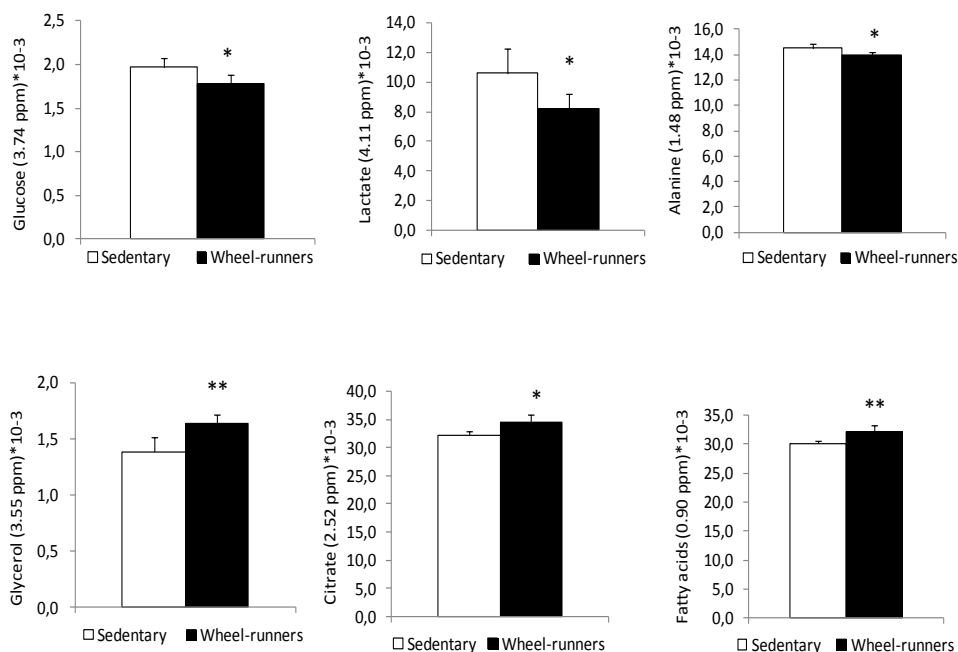
levels of glycerol in the wheel-running group are higher than those found in sedentary. This suggests that fatty acids  $\beta$ -oxidation is enhanced by long term spontaneous exercise. Total creatine, which is an amino acid critical in skeletal muscle function, is lower in the runners group. Phosphocholine, a well known precursor of phospholipids, exhibit lower levels in wheel-running than in sedentary mice. Two important aromatic amino acids like tyrosine and phenylalanine also show higher relative concentrations in the runners group. Phenylalanine is a precursor of tyrosine and, therefore, the levels of these two amino acids are closely related. Total protein levels, measured as the total integral of the protein amide region of the NMR spectra (6.0 to 9.0 ppm) are also higher in wheel-runners than in sedentary.

**Table 5.2 Score metabolic changes induced by long term spontaneous exercise vs sedentary mice.**

| Metabolite                         | Sedentary<br>( $\times 10^{-3}$ ) | Wheel- runners<br>( $\times 10^{-3}$ ) | P-value | Exercise effect |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|---------|-----------------|
| Free Fatty acids (0.90 ppm)        | 30.1 $\pm$ 0.5                    | 32.2 $\pm$ 0.1                         | 0.010   | ↑               |
| Alanine (1.48 ppm)                 | 14.5 $\pm$ 0.3                    | 14.0 $\pm$ 0.3                         | 0.025   | ↓               |
| Unsaturated Fatty acids (2.00 ppm) | 10.3 $\pm$ 0.4                    | 10.9 $\pm$ 0.3                         | 0.025   | ↑               |
| Citrate (2.52 ppm)                 | 32.2 $\pm$ 0.8                    | 34.6 $\pm$ 0.0013                      | 0.057   | ↑               |
| Creatine (3.03 ppm)                | 2.7 $\pm$ 0.1                     | 2.4 $\pm$ 0.2                          | 0.015   | ↓               |
| Phosphocholine (3.22 ppm)          | 25.9 $\pm$ 0.8                    | 24.2 $\pm$ 0.6                         | 0.009   | ↓               |
| Taurine (3.41 ppm)                 | 1.3 $\pm$ 0.1                     | 1.1 $\pm$ 0.1                          | 0.027   | ↓               |
| Glycerol (3.55 ppm)                | 1.4 $\pm$ 0.1                     | 1.6 $\pm$ 0.2                          | 0.010   | ↑               |
| Choline in lipids (3.67 ppm)       | 7.0 $\pm$ 0.2                     | 6.6 $\pm$ 0.2                          | 0.028   | ↓               |
| Glucose (3.74 ppm)                 | 2.0 $\pm$ 0.1                     | 1.8 $\pm$ 0.1                          | 0.025   | ↓               |
| Creatine (3.93 ppm)                | 1.8 $\pm$ 0.1                     | 1.5 $\pm$ 0.2                          | 0.039   | ↓               |
| Lactate (4.11 ppm)                 | 10.6 $\pm$ 1.6                    | 8.2 $\pm$ 1.0                          | 0.037   | ↓               |
| Phenylalanine (7.34 ppm)           | 3.0 $\pm$ 0.1                     | 3.2 $\pm$ 0.1                          | 0.049   | ↑               |
| Total protein (6.5-9.9 ppm)        | 47.0 $\pm$ 3.7                    | 49.7 $\pm$ 6.2                         | 0.048   | ↑               |

Relative levels for statistically significant metabolites with standard error and  $p$ -value calculated with the  $t$ -student test. Arbitrary relative units as peak area normalized to total spectral area.

**Figure 5.17** Histograms for the levels of the most significant metabolites modified by spontaneous exercise.

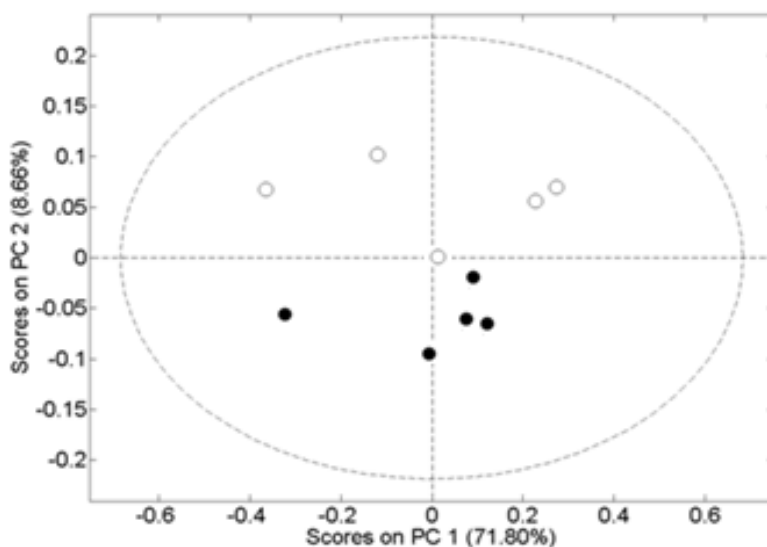


Histograms of the levels of the most significant metabolites for long term spontaneous wheel running mice and sedentary in TCA cycle and glycolysis. Relative arbitrary units as peak area normalized to total spectral area. Statistical significance: (\*)  $p < 0.05$  (\*\*)  $p < 0.01$ .

PCA on the mean-centered normalized serum <sup>1</sup>H NMR spectra provides an overview of the global metabolic variations between wheel-runners and sedentary. The first two principal components expressed 79% of total variance. Figure 5.17 shows the PCA scores plot of mice serum NMR spectra

analysis. The metabolic changes induced by long term spontaneous exercise are sufficient to achieve complete discrimination between groups in the PCA scores plot. The second Principal Component (PC2) loadings plot, which produces the best discrimination between sedentary and wheel-running mice, reveals major metabolic contributions of total free fatty acids, lactate and total creatine. Other important contributors to PC1 in the aliphatic region include alanine, unsaturated fatty acids, glycerol, phosphocholine and citrate. In the aromatic region, tyrosine and phenylalanine are the major contributions to PC1 although the contribution of the hump formed by resonances of protein amide protons (6.0 to 9.0 ppm) is also relevant. Spectral signal integration over these resonances provides relative metabolic quantification in the different samples.

**Figure 5.18. Score plot of PCA in sedentary and wheel-running mice.**

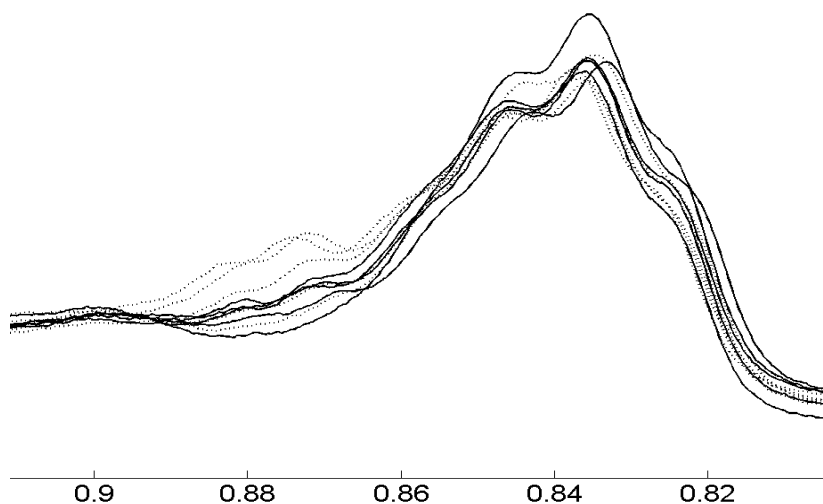


*Scores plot of Principal Component Analysis to compare the metabolome of the long-term spontaneous wheel running mice (black circles) to sedentary mice (white circles).*



Pulse-acquire NMR spectra are dominated by the presence of broad lipoprotein resonance. The spectra cannot be separated between sedentary and wheel-runners by visual inspection, indicating that exercise is not associated with a major metabolic perturbation. All NMR spectra show narrow line widths and adequate signal-to-noise ratios with well resolved spin-spin multiplicities. The 1D single-pulse pre-saturation experiment provides complete and unambiguous identification of the metabolic pattern of the examined samples. In all spectra, the aliphatic region has prominent signals of fatty acids in lipoproteins, choline-containing compounds, lactate, glucose, glycerol and most aminoacids.

**Figure 5.19.** Lipoprotein spectrum by NMR in sedentary and wheel-running mice.



*NMR spectral region between 0.8 and 0.9 ppm which represents the serum lipoprotein profile of the different samples for long-term spontaneous wheel-running mice (dashed line) and sedentary (continuous line) animals.*



## 6. *DISCUSSION*



### **Life-long spontaneous exercise prevents frailty**

In the last decades, a progressive aging of the population has been witnessed. Most of the interventions devised to understand the mechanisms of aging have been focused on survival (Kirkland, J. L., et al. 2009). Recently, however, emphasis has been placed on preventing disability (healthspan) and its predictors (frailty), rather than on merely increasing longevity (lifespan) (Abizanda, P., et al. 2011). Exercise has been unequivocally associated with several beneficial effects, including increased median lifespan in different animal models (Goodrick, C. L. 1980, Holloszy, J. O., et al. 1985). The higher level of aerobic capacity ( $VO_{2max}$ ) and muscle force achieved after a training period have been related to the lower mortality rates in different studies (Fiatarone, M. A., et al. 1994, Myers, J., et al. 2002).

The beneficial effects of exercise on lifespan have been described both in humans (Morris, J. N., et al. 1953, Karvonen, M. J., et al. 1974, Paffenbarger, R. S., Jr., et al. 1993, Sanchis-Gomar, F., et al. 2011) and in rodents (Goodrick, C. L. 1980, Holloszy, J. O., et al. 1985, Navarro, A., et al. 2004). However, in our study we did not find any effect of lifelong spontaneous exercise on longevity (Figure 5.1.). Maximal lifespan in the mice studied was 950 days. Average lifespan in the sedentary mice was 750 days, while in the spontaneous wheel-runners was 770 days ( $p=0.09$ ). Exercise has been unequivocally associated with a slowing of age-specific mortality increase in rats, and with increased median lifespan (Holloszy, J. O., et al. 1985). However, the results in mice are not that clear. In 1984 it was shown that no significant differences on lifespan were found in mice that had free access to running-wheels at senescence (Samorajski, T., et al. 1985).

In 2004, it was revealed that moderate exercise provided by weekly treadmill training (10, 15, and 20 cm x s<sup>-1</sup>, for 5 minutes each, every 7 days) starting at 28 weeks of age, increased CD-1 mice survival (median lifespan was increased by 19% and maximal lifespan was increased by 15–21% in males) (Navarro, A., et al. 2004). Our data is not in accordance with these results, but this may be due to different experimental conditions. For instance, we used C57BL/6J mice (which do not gain weight with age) whereas CD-1 mice and Wistar rats do. We believe that C57BL/6J mice are more adequate to study exercise and aging because the effects are free from the confounding factor of the exercise-induced loss of weight that may occur in animals that become obese with aging. In 2003, Bronikowski and coworkers, using lines of outbred genetically heterogeneous mice selectively bred for high voluntary exercise, found that exercise increased median (17%), but not maximum lifespan in rodents (Bronikowski, A. M., et al. 2003). Again our results are not in accordance with those reported by Bronikowski and coworkers. In this case, differences not only in the strain but in the number of Kilometers run per day between their animals and ours could explain these differences. They reported an average of 4.8 Km x day<sup>-1</sup> in 20 month-old animals while in our experiment the animals run 1 Km x day<sup>-1</sup> at the same age.

We chose the C57BL/6J mouse as the strain for our model for three main reasons. First, the C57BL/6J strain has been shown to perform well in a voluntary exercise paradigm (Lerman, I., et al. 2002). Second, by using an inbred strain, we intended all animals to begin with a nearly identical genotype (99.9% genetically identical), thereby increasing the probability that any phenotypic variation would be strictly due to environmental

influences. Finally (unlike rats or humans) C57BL/6J mice do not gain weight as they age and exercise does not cause a weight loss in these animals. Thus, because the level of voluntary exercise was the only known variable between groups, any differences would be related to spontaneous exercise.

The negative results in terms of lifespan led us to focus our study on healthspan. Nascher, the founder of the clinical field of geriatrics in the US, described the concept of healthspan (without using the term) as a goal of being productive and happy for an individual's entire lifespan, rather than seeking longevity despite severely hindering impairments of body and mind (Nascher, I. L., et al. 1919, Goetzl, E. J. 2011).

On top of the individual wellness, the necessity of the societies to minimize the costs of the increasingly expensive medical care make necessary the research for interventions that not only successfully increase survival but also enhance function, delay dependency and can be translated into clinical application (Skalicky, M., et al. 1996, Kirkland, J. L., et al. 2009). Physical exercise has become one of the key issues for the prevention of functional impairment and some chronic, degenerative diseases among elderly people, who increase both in number and age in Western societies (Pedersen, B. K., et al. 2006, Manini, T. M., et al. 2010).

Frailty is a geriatric syndrome with a tremendous impact on the older individual, their family, and society as a whole. The components of frailty are a mix of physiological, psychological, social, and environmental factors (e.g., sarcopenia, functional impairment, cognitive impairment, and depression). Physical exercise may affect all these factors. Thus, we aimed to determine whether life-long spontaneous exercise was a good strategy to

prevent frailty in a mouse model. Our major problem was the lack of a test for frailty in experimental animals. Although the clinical interest in frailty has grown in recent years (Gill et al. 2010), research in experimental animal models of frailty is very scarce. Only two models have been reported in the literature (Walston, J., et al. 2008, Parks, R. J., et al. 2011), but these models suffer from a lack of clear correlation with the clinical aspects of frailty. Thus, we had to develop a new test to determine frailty in experimental animals that we have named “Valencia Test”. There is not yet a standardized and valid method of clinically screening for frailty in humans. The most commonly test for frailty is that of Linda Fried (Fried, L. P., et al. 2001). Others include the frailty index (Rockwood, K., et al. 2007), the classification of frailty and vigorousness (Speechley, M., et al. 1991), and the Edmonton frail scale (Rolfson, D. B., et al. 2006). In the study by Linda Fried and co-workers it was concluded that frailty is a combination of five components: unintentional weight loss, exhaustion, weakness, slow running speed, and a decrease in the physical activity. Based on this work we developed the “Valencia Test” adapting Fried’s test to experimental animals (See Table 5.1).

We found that, as the animals grew old, they showed poorer results in the tests that determined the five components of frailty: weight loss (Figure 5.3.), grip strength (Figure 5.4.), endurance and slowness (Figure 5.5.1 and 5.5.2.), and motor coordination (Figure 5.6.).

Mice that had free access to running wheels performed in all the tests significantly better than the sedentary animals. One of the main adaptations to exercise training in skeletal muscle is the induction of mitochondrial biogenesis (Holloszy, J. O. 1967). A functional muscle that has not lost the



capacity to synthesize healthy mitochondria is an important contributor to the prevention of frailty (Fiatarone, M. A., et al. 1994, Gill, T. M., et al. 2010). Thus, we determined two relevant proteins involved in mitochondrial biogenesis in skeletal muscle, PGC-1 $\alpha$  and cytochrome C. Recently we have shown that ageing causes a lack of response of PGC-1 $\alpha$  to various stimuli (Derbre, F., et al. 2011). We hypothesized that life-long spontaneous exercise could prevent the lack of reactivity of PGC-1 $\alpha$  in the aging muscle and that turned to be the case (See Figure 5.8.). We estimated the mitochondrial content measuring cytochrome C protein levels (Gomez-Cabrera, M. C., et al. 2008). Spontaneous exercise resulted in a significantly higher level of this protein at 26 and 28 months of age when compared to the sedentary animals (See Figure 5.9.). PGC-1 $\alpha$  protects against skeletal muscle atrophy (Sandri, M., et al. 2006) and, very recently, it has been shown to be required for training-induced prevention of age associated decline in mitochondria (Leick, L., et al. 2010). Moreover relevance of PGC-1 $\alpha$  in sarcopenia and metabolic diseases during aging has been also suggested (Wenz, T., et al. 2009). The beneficial effects of exercise found in our study could be explained by the training-induced maintenance of the mitochondrial content in skeletal muscle.

Elderly individuals often say they would rather keep on feeling healthy than merely live longer (Kirkland, J. L., et al. 2009). This is the reason why we have focused our study both on health span and on lifespan. In this study we have shown that life-long spontaneous exercise does not prolong lifespan but prevents age-associated frailty in mice (See Figure 5.7), providing an animal model of frailty and a way to measure it in non-human experimental models.

### **Neurotrophic factors and frailty. Role of spontaneous exercise.**

Neurotrophic factors are a family of proteins responsible of growth, differentiation and survival of neurons (Reichardt, L. F. 2006). Brain Derived Neurotrophic Factor is the most prevalent growth factor in the central nervous system and its modulation by exercise (chronic or acute) has been extensively described both in animals and in humans (Klein, A. B., et al. 2011). It was first described in 1995 by Rosenfeld (Rosenfeld, R. D., et al. 1995, Erickson, K. I., et al. 2011). Brain Derived Neurotrophic Factor is originated in the brain and is remarkably important in the regulation, maintenance and survival of neurons; having a significant role in learning and memory (Rasmussen, P., et al. 2009, Erickson, K. I., et al. 2011).

Brain Derived Neurotrophic Factor has been related to neuroprotection in a series of central nervous system diseases in older age. Coelho and co-workers recently described a relationship between the low levels of BDNF and the prevalence of the frailty syndrome in women (Coelho, F. M., et al. 2011), as well as the positive affect of exercise on restoring BDNF.

As it may be seen in Figure 5.10, we found a decrease in the levels of BDNF in cortex as age increases in both experimental groups, being more significant in sedentary mice. This is in keeping with the data found in the literature on the effect of physical exercise in the induction of BDNF in the brain (Neeper, S. A., et al. 1995, Sartori, C. R., et al. 2011). The biggest difference of the BDNF levels is seen at the 20 months of age between the sedentary group and the wheel-running group, being higher in the most active group. This finding is probably due to the fact that the exercise group has been more active all through their lives. As the mice grew older, they

reduced the amount of exercise done and therefore the differences between both groups were reduced considerably. This can be easily seen in figure 5.2.

In this PhD thesis we did not find a correlation between frailty and low BDNF levels, but we do observe the positive effect of exercise mentioned before.

### **Oxidative stress and longevity. Role of spontaneous exercise.**

Fifty years ago it was said that free radicals were the main actors involved in the ageing process (Harman, D. 1956, Harman, D. 1965, Harman, D. 1981, Pacifici, R. E., et al. 1991, Bondy, S. C. 1992, Krajcovicova-Kudlackova, M., et al. 2008). During periods of oxidative stress, pro-oxidants overwhelm the antioxidant defenses in cells and damage cellular constituents (Sies, H. 1985). Thus, oxidative stress in biological systems is often characterized by the following parameters: 1) increase in the formation of radicals and other oxidants, 2) decrease in small-molecular-weight and/or lipid-soluble antioxidants, 3) disturbance in cellular redox balance, and 4) oxidative damage to cellular components (i.e., lipids, proteins, and/or DNA) (Powers, S. K., et al. 2008).

In this PhD thesis we have evaluated systemic oxidative damage to macromolecules (plasma lipid and protein oxidation) and the induction of the liver antioxidant enzymes Mn-SOD and GPx.

Regarding oxidative stress we did not find a significant increase in plasma carbonylated proteins as the mice become older (see figure 5.11.). Moreover, we did not find differences between the sedentary and the wheel-running group in this oxidative stress marker. On the contrary, lipid

peroxidation (estimated as MDA) was significantly increased as mice grew older (see figure 5.12.1. and 5.12.2.). Twenty-eight month old mice almost doubled the MDA levels found in the twenty month-old ones (see figure 5.12.).

These results are in accordance with previous works in which it has been shown that aging increases oxidative stress (Miquel, J., et al. 1980, Andziak, B., et al. 2006, Hekimi, S., et al. 2011). Exercise can also result in damage to cells. Numerous studies have demonstrated an increase in ROS or their by products with exercise (Davies, K. J., et al. 1982, Sastre, J., et al. 1992). Thus, it is not clear whether aged individuals are more susceptible to some of the harmful effects of rigorous exercise (Ji, L. L. 2001). Research evidence indicates that old organisms are more susceptible to oxidative stress during exercise because of the age-related ultrastructural and biochemical changes that facilitate the formation of ROS (Ji, L. L. 2001). Conflicting results can be found in the literature. Bejma and co-workers found in 2000 a lack of prevention in the oxidative stress with exercise in old animals (Bejma, J., et al. 2000). However, more recently it has been shown that chronic exercise decreases (10-20%) the mitochondrial content of TBARS and protein carbonyls in brain, liver, heart, and kidney after 24 weeks of training in old animals (Boveris, A., et al. 2008).

In this PhD thesis we did not find significant differences between the sedentary and the wheel-running mice either in MDA or in protein carbonyls, at any time point. The fact that the spontaneous wheel-running does not alleviate the aging-induced oxidative stress could be explained because the rodents ran progressively less as they grew older (even reaching the point where they hardly ran at all, as shown in figure 5.2). We have

previously shown that exercise intensity is very important in the regulation of skeletal muscle adaptations to exercise (Vina, J., et al. 2012).

In order to keep up with the objectives proposed in this PhD thesis, the study of the induction of the antioxidant enzymes was carried out by two different techniques (RT-PCR and quantification of their enzymatic activity). If we base on the idea that the antioxidant enzymes are the first line of defense against free radicals, it might be possible to think that exercise can increase the mechanisms inducing these effects. In fact, several research groups, including ours, have shown that with strenuous exercise, the expression of MnSOD and GPx are increased (Ji, L. L. 1993, Gomez-Cabrera, M. C., et al. 2005). The study of these antioxidant enzymes is of the utmost importance in this PhD thesis because they are considered longevity genes (Vina, J., et al. 2010). Longevity genes are a family of genes involved in the modulation of the organism's ability to withstand a stressful environment (excessive heat, fasting, water or food shortage) (Sinclair, D. A., et al. 2006). If longevity genes keep activated during enough time, these genes maximize the individual's chances for survival by optimizing the body's functioning.

Working skeletal muscle is clearly the organ most directly affected during physical activity. However, the metabolic adaptations to exercise are not restricted to the working muscle; exercise is also a major challenge to other organs such as cardiac muscle, stomach or brain (Radak, Z., et al. 2001, Rasmussen, P., et al. 2009, Cakir, B., et al. 2010). This is particularly relevant to the liver due to its central role in the maintenance of energy supply to the exercising muscle (Hoene, M., et al. 2010). Studies aiming to evaluate the effects of the acute exercise on oxidative stress in the liver have shown

increased lipid peroxidation (Gul, M., et al. 2002) and protein carbonylation (Korivi, M., et al. 2012). As mentioned before, the overall cellular oxidative stress during aging is determined not only by ROS generation but also by the defense capacity of antioxidant systems. While different studies have investigated the response of the working skeletal muscle to acute exercise and training, considerably less is known about liver adaptations during and after increased physical activity (Lima, F. D., et al. 2013). Liver plays an important role during exercise through glucose release to the bloodstream and gluconeogenesis. Therefore, we aimed to study the impact of life-long spontaneous exercise on mice liver antioxidant enzymes modulation.

We found hardly any change in the liver MnSOD mRNA levels along time. Figure 5.13 shows a significant increase in the MnSOD levels only in the sedentary group when comparing 20 month to 28 month-old. When looking at the liver MnSOD enzyme activity, both groups showed a statistically significant increase as the mice grew older. Moreover, the wheel-running group showed statistically significant differences when compared to the sedentary one at the age of 28 month-old (See Figure 5.14).

Regarding GPx we also found discrepancies when comparing the mRNA levels to the activity of the enzyme (See figures 5.15 and 5.16). We did not find any effect of either spontaneous exercise or aging in the liver GPx mRNA levels along the longevity curve (figure 5.15). When looking at the GPx activity, as found with the MnSOD, it tended to increase as the mice grew older (figure 5.16).

It has been well documented that skeletal muscle and liver increase antioxidant enzyme activities as they age. Oh-Ishi *et al.* reported that 24-

month-old rats had higher activities of CuZn-SOD and Mn-SOD in soleus muscle compared with 4 month-old rats (Oh-Ishi, S., et al. 1995). However, no significant changes were noticed in the relative abundance of mRNA for both SOD isozymes. This study suggested that age-related increases in SOD activity were not caused by enhanced gene expression. To further investigate age responses of muscle antioxidant enzymes, professor Ji and co-workers measured gene expression products of SOD in various muscle fibers of old (25 month-old) vs adult (8 month-old) rats. A significant increase in MnSOD activity in gastrocnemius and soleus muscles was found in old rats, whereas no significant age difference was found in MnSOD protein (Hollander, J., et al. 2000). Furthermore, MnSOD mRNA abundance was decreased with age in all types of muscles examined. Interestingly, binding of NF- $\kappa$ B to corresponding oligonucleotide sequences present in the MnSOD gene was decreased in aging. A decrease in the binding of this nuclear factor despite increased ROS generation observed in aged muscles suggest that molecular signaling of antioxidant gene expression is retarded due to aging.

Our results in liver partially support those reported by Li Li Ji in skeletal muscle (Hollander, J., et al. 2000). We found discrepancies between the relative abundance of mRNA and the activity of the antioxidant enzymes (See Figure 5.13, 5.14, 5.15 and 5.16). Our results suggest that age-related increase in MnSOD and GPx activities was not caused by enhanced gene expression but by a posttranslational modification (activation) of the enzyme molecules in aged liver.

Regarding the role of MnSOD and GPx as longevity genes our results do not match those found by Page and co-workers (Page, M. M., et al. 2010) . They

reported a positive correlation between maximum life span and the activity levels of MnSOD in liver. Cutler, in 1991, found a clear linear correlation between SOD activity and the maximal life span potential of various species ranging from mice to monkeys, chimpanzees, and humans (Cutler, R. G. 1991). The tools of molecular biology allowed researchers to construct animals with genetically altered levels of antioxidant defence enzymes and test their life span. An important impetus to this line of work came from work by Orr and Sohal (Orr, W. C., et al. 1994) in which they showed that over-expression of SOD and catalase could increase life span of *Drosophila melanogaster*. In our laboratory we have observed that females in many species, like rats or humans, live longer than males because estrogens stimulate the over-expression of glutathione peroxidase and manganese superoxide dismutase (Borras, C., et al. 2003). As previously discussed we did not find differences in average or maximal lifespan between the sedentary and the wheel-running groups despite the differences found in their MnSOD enzymatic liver activities. Thus, our results do not support the Free Radical Theory of Aging. A lack of correlation is not strong proof or disproof of a theory, but in any case the results reported in this PhD thesis certainly do not support the free radical theory of aging. In his seminal paper, Denham Harman stated that “aging and the degenerative diseases associated with it are attributed basically to the deleterious side attacks of free radicals on cell constituents and on the connected tissues”(Harman, D. 1956). In all pureness, the free radical theory of aging postulates that aging itself is mediated by ROS. If this were the case, when antioxidant enzymes are up-regulated, longevity should be promoted, either average life span or maximal life span. But we have found that when C57BL/6J mice are allowed to run continuously throughout their life time, MnSOD is activated but no



changes in longevity occur. Thus we have found increasing defense against ROS without any modification in longevity when animals perform spontaneous exercise throughout their life.

### **Plasma metabolic responses in mice after spontaneous wheel-running.**

Exercise has been unequivocally associated with several beneficial effects (Goodrick, C. L. 1980, Holloszy, J. O., et al. 1985). However, no studies have been carried out to determine the metabolic responses in a long term spontaneous exercise intervention in combination with relevant performance parameters such as  $VO_2$ max. In 2002, it was demonstrated that each 1-MET increase in exercise capacity confer a 12% improvement in survival among healthy men (Myers, J., et al. 2002).

Apart from the performance-training effects, we have found a significant impact of exercise on metabolism. Exhaustive exercise is related to acute metabolic alterations which include increased anaerobic breakdown of pyruvate, production of lactate and depletion of phosphocreatine. However, the global metabolic effect induced by long term voluntary exercise has been largely unknown. Our metabolic profiling by NMR reveal that spontaneous exercise induces sustained higher plasma levels of free fatty acids and glycerol in C57BL/6J mice (Figure 5.17.). In 1939, Christensen and Hansen (Christensen, E. H., et al. 1939) observed that endurance training reduced the respiratory exchange ratio during strenuous exercise, indicative of a decrease in carbohydrate oxidation and a corresponding increase in fatty acid oxidation (Coggan, A. R. 1997). Basal whole body lipid kinetics has been evaluated in control and endurance-trained cyclists and it has been demonstrated that the rate of appearance of glycerol (whole body lipolysis)

and the rate of appearance of palmitate (index of fatty acid release) were two- to three fold higher in athletes than in untrained control subjects in resting conditions (Romijn, J. A., et al. 1993).

Regarding glucose metabolism, in our study we found lower levels of circulating lactate in the group of wheel-runners. This finding could be explained by a reduction in the anaerobic glycolysis, although we cannot exclude increased hepatic uptake of lactate to be used as a gluconeogenic precursor by the liver. Another relevant gluconeogenic precursor is alanine, which is also significantly decreased in the group of mice with free access to the running wheel. Alanine plays an important role in alanine-glucose cycle in exercise and a decrease in alanine serum levels has been previously reported in metabolomic studies after an exercise training period (Yan, B., et al. 2009). The significant decrease in both plasma lactate and alanine in our study may be explained by an increase in glycogenesis in liver as previously reported in a similar model (Huang, C. C., et al. 2010). Recent studies in rodents have demonstrated that quantitatively liver glycogen may be more important than muscle glycogen for sustaining exercise (Pederson, B. A., et al. 2005). In fact, Muoio et al. (Goodrick, C. L. 1980) have noted that when mice are made to run to exhaustion on a treadmill under low intensity exercise conditions, fatigue correlates with liver rather than muscle glycogen depletion (Muoio, D. M., et al. 2002). An increase in glycogenesis in the group of wheel-runners could therefore have relevant implication in our mice.

Compared to sedentary mice, the wheel-runners exhibited a significant increase in the plasma levels of the TCA cycle intermediate, citrate. The serum endogenous concentrations of citric acid have been reported to be

significantly decreased in professional rowers (Yan, B., et al. 2009). However the effects of exercise training on this metabolite are not completely clear (Yan, B., et al. 2009).

Tyrosine is a precursor of neurotransmitters and hormones. Mammals synthesize tyrosine from the essential amino acid phenylalanine. In the adrenal medulla, tyrosine is converted into the catecholamine hormones norepinephrine and epinephrine, both released by the adrenal glands in response to stress. Recent studies suggest that long term voluntary exercise in mice induces complex adaptative changes in the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level (Droste, S. K., et al. 2007). We have found that runners exhibit increased levels of tyrosine and phenylalanine. This may indicate that synthesis of catecholamines produced in the adrenal glands is affected by long term voluntary exercise.

Interestingly, Fattor et al. reported that, in moderate-intensity exercise, high levels of lactate attenuate the catecholamine response to exercise-induced stress (Fattor, J. A., et al. 2005). In our study, the decreased levels of lactate produced by the long term spontaneous exercise preclude this attenuation. Therefore, the increased levels of tyrosine and its precursor phenylalanine found in the wheel running group may indicate an increased production of norepinephrine and epinephrine. The fluctuations of these aminoacids, phenylalanine and tyrosine, could also reflect an alteration of their metabolism in our animals (Yan, B., et al. 2009).

All the metabolic modifications reported could be explained by a training-induced increase in glucocorticoids. Glucocorticoids play an important role in the movilization of energy reserves during physical activity by stimulating

gluconeogenesis, promoting lipolysis of blood lipids and increasing protein catabolism(Girard, I., et al. 2002). It has been generally established that the glucocorticoid levels rise with moderate to exhaustive exercise and that higher exercise intensity elicit greater hormonal response (Girard, I., et al. 2002). However, the effect of exercise training on the glucocorticoid response is less clear. Although it could be argued that voluntary and presumably stress-free running behaviour should not have any effect on glucocorticoid release, it has been demonstrated that this type of training regimens induce chronic increase in basal glucocorticoid secretion in hamsters (Borer, K. T., et al. 1992) and in mice (Girard, I., et al. 2002). Other enzymes such as glucagon, catecholamines and growth hormone or the secretion of endogenous opioids(Borer, K. T., et al. 1992) could be involved in the metabolic modifications associated to this type of exercise. However, more research is needed to elucidate the relationship between the metabolic changes and the hormonal secretion during spontaneous exercise.

Creatine is an organic acid also related to energy metabolism, especially in skeletal muscle. Creatine, synthesized mostly in liver and kidney, but not in muscle, is transported through the blood and taken up by tissues with high energy demands via an active transport system (Fitch, C. D., et al. 1968). The energy sources in exercise include ATP, carbohydrates, lipids, and proteins. Creatine phosphate is the fastest source for ATP resynthesis during exercise.

In our study, long term spontaneous exercise decreases total creatine in plasma. Lower circulating creatine may indicate either lower substrate availability or increased usage. Creatine exported from the liver and transported through the blood may be taken up by creatine-requiring tissues. In skeletal muscles, a large pool of phosphocreatine is available for

immediate regeneration of ATP hydrolyzed during short periods of intense work. The concentration of total creatine in muscle tissue seems to parallel the muscle glycolytic capacity and is one hundred times larger than that in blood (Wyss, M., et al. 2000). As a consequence, creatine transfer from blood to the muscle tissue works against a large concentration gradient from the blood. The lower levels of creatine found in the runners group may reflect an increased phosphocreatine pool built over time, an enhanced phosphocreatine storage capability and better readiness for fast energy production in the skeletal muscle.

Phosphocholine is an intermediate in the synthesis of phosphatidylcholine. Phosphatidylcholine is a major constituent of the phospholipid monolayer part of lipoproteins. Choline-containing lipids account for 75% of serum phospholipids. The correlation of serum phospholipids and cholesterol is well established and known (Gertler, M. M., et al. 1950). In addition, circulating choline in lipids increases with age in healthy people consuming a mixed diet (Cherednichenko, G., et al. 2004). These changes in phospholipids are similar (but of lesser magnitude) to the known age-sex related variations for cholesterol. We detect a statistically significant decrease in phosphocholine and choline in lipids in plasma of wheel running mice. However, this is not accompanied by a parallel variation in circulating cholesterol or in lipoprotein composition (Figure 5.17). This suggests that long term spontaneous exercise enhances phospholipid metabolism to a point equivalent to that of younger population. This effect seems unrelated to other cholesterol-mediated beneficial effects.



## *7. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES*





## 7.1 Conclusions

In light of these results, we can draw the following conclusions:

1. Life-long spontaneous exercise does not prolong lifespan but prevents frailty in mice. Moreover, we have shown for the first time in a controlled population of animals that physical inactivity is a significant contributing factor to age-related frailty and that sedentary animals can be considered as a model for frailty.
2. We have developed a new test to determine frailty in experimental animals and have called it the “Valencia Test”.
3. A sedentary lifestyle is associated with a decrease in mitochondriogenesis during aging in skeletal muscle. Spontaneous exercise causes a significant increase in PGC-1 $\alpha$  and cytochrome C, especially in the later stages of life.
4. Life-long spontaneous exercise is capable of increasing BDNF in mouse brain. BDNF expression in brain can carry out an important role in the up-regulation of cognitive functions.
5. Aging is associated with a significant increase in plasma lipid peroxidation determined as MDA. Spontaneous wheel-running does not prevent the aging-associated increase in oxidative stress.

6. Aging is associated with a significant increase in the activity of the antioxidant enzymes Mn-SOD and GPx in liver. However, the age-related increase in Mn-SOD and GPx activities are not caused by an enhanced gene expression but by a posttranslational modification of the enzymes.
  
7. Life-long spontaneous exercise was associated with significant differences in the circulating metabolome. Lactate, alanine, and glucose were lower in those mice that had free access to the running wheels than in the sedentary mice. On the contrary, plasma glycerol, citrate and fatty acids were higher in the plasma of the active mice when compared to the inactive ones. These differences indicate a better metabolic health in the physically active than in inactive mice.

The sum of these changes in aging leads to decreased overall physical functioning and physical activity, increased fragility, falls risk, and power for activities of daily living. Studying and investigating all of this could open a great area in investigation in improving life quality in humans.

## 7.2 Conclusiones

A la luz de los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El ejercicio físico espontáneo no alarga la vida pero retrasa la fragilidad en un modelo animal. Por otro parte, hemos demostrado por primera vez en una población controlada de animales, que la inactividad física es un factor significativo que contribuye a la fragilidad y que los ratones sedentarios pueden ser considerados como un modelo de fragilidad.
2. Se ha descrito una nueva prueba para determinar la fragilidad en animales de experimentación denominada “Valencia Test”.
3. Un estilo de vida sedentario se asocia con una disminución en la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético con el envejecimiento. El ejercicio físico espontáneo provoca un aumento significativo en el coactivador PGC-1 $\alpha$  y en la proteína Citocromo C, especialmente en las últimas etapas de la vida.
4. El ejercicio espontáneo a lo largo de la vida es capaz de aumentar los niveles de BDNF en el cerebro de los ratones. La expresión de BDNF en el cerebro puede desempeñar un papel importante en la regulación de las funciones cognitivas.
5. El envejecimiento se asocia con un incremento significativo de la peroxidación lipídica determinada mediante la cuantificación de

los niveles de MDA en plasma. El ejercicio físico espontáneo no previno el incremento de estrés oxidativo asociado a la edad.

6. El envejecimiento se asocia con un aumento significativo en la actividad de las enzimas antioxidantes Mn-SOD y GPx en el hígado. Sin embargo, el aumento relacionado con la edad en las actividades mencionadas no se debe a una mayor expresión de los genes, sino a una modificación post-traducciona l de las enzimas.
  
7. El ejercicio espontáneo durante toda la vida se asocia con diferencias significativas en el metaboloma circulante. El lactato, la alanina y la glucosa plasmáticas fueron menores en los ratones que tenían acceso libre a la rueda comparado con los sedentarios. Por el contrario, el glicerol, el citrato y los ácidos grasos en plasma fueron más altos en los ratones activos en comparación con los inactivos. Estas diferencias indican una mejor salud metabólica en los ratones activos frente a los inactivos.

La suma de cambios producidos en el envejecimiento conduce a la disminución de la funcionalidad y de la actividad física. Del mismo modo supone un aumento de la fragilidad, del riesgo de caídas y de la incapacidad para el desarrollo de actividades de la vida diaria. Los estudios en este ámbito podrían abrir nuevas áreas de investigación centradas en la mejora de la calidad de vida de los seres humanos.

## 8. *BIBLIOGRAFÍA*



- Abbas, A. K., J. Lohr, B. Knoechel and V. Nagabhushanam (2004). "*T cell tolerance and autoimmunity*" **Autoimmun Rev** 3 (7-8): 471-5.
- Abbott, R. D., L. R. White, G. W. Ross, K. H. Masaki, J. D. Curb and H. Petrovitch (2004). "*Walking and dementia in physically capable elderly men*" **JAMA** 292 (12): 1447-53.
- Abizanda, P., López-Torres Hidalgo J., Romero Rizos L., López Jiménez M., Manuel Sánchez Jurado P., Atienzar Núñez P., Esquinas Requen J.L., García Nogueras I., Hernández Zegarrea P., Bardales Mas Y., Campos Rosa R., Martínez Peñalver M., de la Osa Nieto E., Carión González M., Ruiz Gómez Á., Aguilar Cantos C., M. D. P. and O. C. J. L. (2011). "*Fragilidad y dependencia en Albacete (estudio FRADEA): razonamiento, diseño y metodología*" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 46 (2): 81-88.
- Abizanda, P., L. Romero and C. Luengo (2005). "*Uso apropiado del término de fragilidad*" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 40 58-59.
- Abizanda, P., P. M. Sanchez-Jurado, L. Romero, G. Paterna, E. Martinez-Sanchez and P. Atienzar-Nunez (2011). "*Prevalence of frailty in a Spanish elderly population: the Frailty and Dependence in Albacete study*" **J Am Geriatr Soc** 59 (7): 1356-9.
- Afilalo, J. (2011). "*Frailty in Patients with Cardiovascular Disease: Why, When, and How to Measure*" **Curr Cardiovasc Risk Rep** 5 (5): 467-472.
- Al Snih, S., K. S. Markides, K. J. Ottenbacher and M. A. Raji (2004). "*Hand grip strength and incident ADL disability in elderly Mexican Americans over a seven-year period*" **Aging Clin Exp Res** 16 (6): 481-6.
- Ala-Korpela, M. (2007). "*Potential role of body fluid 1H NMR metabonomics as a prognostic and diagnostic tool*" **Expert Rev Mol Diagn** 7 (6): 761-73.
- Albertini, R., S. Rindi, A. Passi, A. Bardoni, R. Salvini, G. Pallavicini and G. De Luca (1996). "*The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation*" **Arch Biochem Biophys** 327 (2): 209-14.
- Alvarado, B. E., M. V. Zunzunegui, F. Beland and J. M. Bamvita (2008). "*Life course social and health conditions linked to frailty in Latin American older men and women*" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 63 (12): 1399-406.
- Ames, B. N. (1983). "*Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases*" **Science** 221 (4617): 1256-64.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga and T. M. Hagen (1993). "*Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 90 (17): 7915-22.
- Andziak, B. and R. Buffenstein (2006). "*Disparate patterns of age-related changes in lipid peroxidation in long-*

*lived naked mole-rats and shorter-lived mice*" **Aging Cell** 5 (6): 525-32.

Armstrong, R. B., R. W. Ogilvie and J. A. Schwane (1983). "Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle" **J Appl Physiol** 54 (1): 80-93.

Asensi, M., J. Sastre, F. V. Pallardo, J. M. Estrela and J. Vina (1994). "Determination of oxidized glutathione in blood: high-performance liquid chromatography" **Methods Enzymol** 234 367-71.

Austad, S. N. (1997). "Comparative aging and life histories in mammals" **Exp Gerontol** 32 (1-2): 23-38.

Barde, Y. A., D. Edgar and H. Thoenen (1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain" **EMBO J** 1 (5): 549-53.

Barzilay, J. I., C. Blaum, T. Moore, Q. L. Xue, C. H. Hirsch, J. D. Walston and L. P. Fried (2007). "Insulin resistance and inflammation as precursors of frailty: the Cardiovascular Health Study" **Arch Intern Med** 167 (7): 635-41.

Baylis, D., D. B. Bartlett, H. E. Syddall, G. Ntani, C. R. Gale, C. Cooper, J. M. Lord and A. A. Sayer (2012). "Immune-endocrine biomarkers as predictors of frailty and mortality: a 10-year longitudinal study in community-dwelling older people" **Age (Dordr)**

Baztán Cortés, J. J. (2006). "Función y fragilidad: ¿qué tenemos que medir?"

**Rev Esp Geriatr Gerontol** 41 ((supl 1)): 36-42.

Bejma, J., P. Ramires and L. L. Ji (2000). "Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver" **Acta Physiol Scand** 169 (4): 343-51.

Benzie, I. F. (2000). "Evolution of antioxidant defence mechanisms" **Eur J Nutr** 39 (2): 53-61.

Berlin, J. A. and G. A. Colditz (1990). "A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease" **Am J Epidemiol** 132 (4): 612-28.

Bird, R. P. and H. H. Draper (1984). "Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination" **Methods Enzymol** 105 299-305.

Bjorksten, J. (1976). "The crosslinkage theory of aging: clinical implications" **Compr Ther** 2 (2): 65-74.

Blair, S. N., Y. Cheng and J. S. Holder (2001). "Is physical activity or physical fitness more important in defining health benefits?" **Med Sci Sports Exerc** 33 (6 Suppl): S379-99; discussion S419-20.

Ble, A., A. Cherubini, S. Volpato, B. Bartali, J. D. Walston, B. G. Windham, S. Bandinelli, F. Lauretani, J. M. Guralnik and L. Ferrucci (2006). "Lower plasma vitamin E levels are associated with the frailty syndrome:



the InCHIANTI study" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 61 (3): 278-83.

Bondy, S. C. (1992). "Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage" **Neurotoxicology** 13 (1): 87-100.

Borel, P., P. Grolier, Y. Boirie, L. Simonet, E. Verdier, Y. Rochette, M. C. Alexandre-Gouabau, B. Beaufriere, D. Lairon and V. Azais-Braesco (1998). "Oxidative stress status and antioxidant status are apparently not related to carotenoid status in healthy subjects" **J Lab Clin Med** 132 (1): 61-6.

Borer, K. T., L. L. Bestervelt, M. Mannheim, M. B. Brosamer, M. Thompson, U. Swamy and W. N. Piper (1992). "Stimulation by voluntary exercise of adrenal glucocorticoid secretion in mature female hamsters" **Physiol Behav** 51 (4): 713-8.

Borras, C., J. Sastre, D. Garcia-Sala, A. Lloret, F. V. Pallardo and J. Vina (2003). "Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males" **Free Radic Biol Med** 34 (5): 546-52.

Bortz, W. M., 2nd (2002). "A conceptual framework of frailty: a review" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 57 (5): M283-8.

Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General

properties and effect of hyperbaric oxygen" **Biochem J** 134 (3): 707-16.

Boveris, A. and A. Navarro (2008). "Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents" **Free Radic Biol Med** 44 (2): 224-9.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" **Anal Biochem** 72 248-54.

Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA" **Free Radic Biol Med** 18 (6): 1033-77.

Bronikowski, A. M., P. A. Carter, T. J. Morgan, T. Garland, Jr., N. Ung, T. D. Pugh, R. Weindruch and T. A. Prolla (2003). "Lifelong voluntary exercise in the mouse prevents age-related alterations in gene expression in the heart" **Physiol Genomics** 12 (2): 129-38.

Byers, J. F. (1993). "The use of aspirin in cardiovascular disease" **J Cardiovasc Nurs** 8 (1): 1-18.

Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging" **Free Radic Biol Med** 29 (3-4): 222-30.

Cakir, B., O. Kasimay, M. Kolgazi, Y. Ersoy, F. Ercan and B. C. Yegen (2010). "Stress-induced multiple organ damage in rats is ameliorated by the antioxidant and anxiolytic

*effects of regular exercise*" **Cell Biochem Funct** 28 (6): 469-79.

Coelho, F. M., D. S. Pereira, L. P. Lustosa, J. P. Silva, J. M. Dias, R. C. Dias, B. Z. Queiroz, A. L. Teixeira, M. M. Teixeira and L. S. Pereira (2011). "Physical therapy intervention (PTI) increases plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in non-frail and pre-frail elderly women" **Arch Gerontol Geriatr**

Coggan, A. R. (1997). "Plasma glucose metabolism during exercise: effect of endurance training in humans" **Med Sci Sports Exerc** 29 (5): 620-7.

Colcombe, S. J., A. F. Kramer, K. I. Erickson, P. Scalf, E. McAuley, N. J. Cohen, A. Webb, G. J. Jerome, D. X. Marquez and S. Elavsky (2004). "Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging" **Proc Natl Acad Sci U S A** 101 (9): 3316-21.

Commoner, B., J. Townsend and G. E. Pake (1954). "Free radicals in biological materials" **Nature** 174 (4432): 689-91.

Connor, B., D. Young, Q. Yan, R. L. Faull, B. Synek and M. Dragunow (1997). "Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease" **Brain Res Mol Brain Res** 49 (1-2): 71-81.

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

Cotman, C. W. and C. Engesser-Cesar (2002). "Exercise enhances and protects brain function" **Exerc Sport Sci Rev** 30 (2): 75-9.

Crabbe, J. C., C. J. Cotnam, A. J. Cameron, J. P. Schlumbohm, J. S. Rhodes, P. Metten and D. Wahlsten (2003). "Strain differences in three measures of ethanol intoxication in mice: the screen, dowel and grip strength tests" **Genes Brain Behav** 2 (4): 201-13.

Cross, A. J., P. Slater, M. Simpson, C. Royston, J. F. Deakin, R. H. Perry and E. K. Perry (1987). "Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases" **Neurosci Lett** 79 (1-2): 213-7.

Cruz-Jentoft, A. J., J. P. Baeyens, J. M. Bauer, Y. Boirie, T. Cederholm, F. Landi, F. C. Martin, J. P. Michel, Y. Rolland, S. M. Schneider, E. Topinkova, M. Vandewoude and M. Zamboni (2010). "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People" **Age Ageing** 39 (4): 412-23.

Cutler, R. G. (1991). "Antioxidants and aging" **Am J Clin Nutr** 53 (1 Suppl): 373S-379S.

Chance, B., B. Schoener, R. Oshino, F. Itshak and Y. Nakase (1979). "Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein

- fluorescence signals*" **J Biol Chem** 254 (11): 4764-71.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry" **Br Med Bull** 49 (3): 481-93.
- Cherednichenko, G., A. V. Zima, W. Feng, S. Schaefer, L. A. Blatter and I. N. Pessah (2004). "NADH oxidase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum regulates calcium-induced calcium release" **Circ Res** 94 (4): 478-86.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction" **Anal Biochem** 162 (1): 156-9.
- Christensen, E. H. and O. Hansen (1939). "Respiratorscher Quotient and =2-Aufnahme" **Skand Arch Physiol** 81 180-189.
- Chung, H. Y., H. J. Kim, J. W. Kim and B. P. Yu (2001). "The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction" **Ann N Y Acad Sci** 928 327-35.
- Davidson, S. R., M. Burnett and L. Hoffman-Goetz (2006). "Training effects in mice after long-term voluntary exercise" **Med Sci Sports Exerc** 38 (2): 250-5.
- Davies, K. J. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects" **J Biol Chem** 262 (20): 9895-901.
- Davies, K. J., A. T. Quintanilha, G. A. Brooks and L. Packer (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise" **Biochem Biophys Res Commun** 107 (4): 1198-205.
- Davies, K. J., A. Sevanian, S. F. Muakkassah-Kelly and P. Hochstein (1986). "Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid" **Biochem J** 235 (3): 747-54.
- de la Asuncion, J. G., A. Millan, R. Pla, L. Bruseghini, A. Esteras, F. V. Pallardo, J. Sastre and J. Vina (1996). "Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA" **FASEB J** 10 (2): 333-8.
- De Lepeleire, J., J. Degryse, S. Illiffe, E. Mann and F. Buntinx (2008). "Family physicians need easy instruments for frailty" **Age Ageing** 37 (4): 484; author reply 484-5.
- De Lepeleire, J., S. Illiffe, E. Mann and J. M. Degryse (2009). "Frailty: an emerging concept for general practice" **Br J Gen Pract** 59 (562): e177-82.
- Dean, R. T., S. Giese and M. J. Davies (1993). "Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins" **Trends Biochem Sci** 18 (11): 437-41.
- Derbre, F., M. C. Gomez-Cabrera, A. L. Nascimento, F. Sanchis-Gomar, V. E. Martinez-Bello, J. A. Tresguerres, T. Fuentes, A. Gratas-Delamarche, M. Monsalve and J. Vina (2011). "Age

*associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1alpha to exercise training" Age (Dordr)*

Dodge, H. H., Y. Katsumata, H. Todoriki, S. Yasura, D. C. Willcox, G. L. Bowman, B. Willcox, S. Leonard, A. Clemons, B. S. Oken, J. A. Kaye and M. G. Traber (2010). "Comparisons of plasma/serum micronutrients between Okinawan and Oregonian elders: a pilot study" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 65 (10): 1060-7.

Doroshov, J. H. and K. J. Davies (1983). "Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide, and neocarzinostatin" **Biochem Pharmacol** 32 (19): 2935-9.

Droste, S. K., Y. Chandramohan, L. E. Hill, A. C. Linthorst and J. M. Reul (2007). "Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level" **Neuroendocrinology** 86 (1): 26-37.

Dunn, W. B., D. I. Broadhurst, H. J. Atherton, R. Goodacre and J. L. Griffin (2010). "Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy" **Chem Soc Rev** 40 (1): 387-426.

Eckman, M. H., R. Wise, A. C. Leonard, E. Dixon, C. Burrows, F. Khan and E. Warm (2012). "Impact of health literacy on outcomes and effectiveness of an educational

*intervention in patients with chronic diseases" Patient Educ Couns* 87 (2): 143-51.

Ensrud, K. E., S. K. Ewing, P. M. Cawthon, H. A. Fink, B. C. Taylor, J. A. Cauley, T. T. Dam, L. M. Marshall, E. S. Orwoll and S. R. Cummings (2009). "A comparison of frailty indexes for the prediction of falls, disability, fractures, and mortality in older men" **J Am Geriatr Soc** 57 (3): 492-8.

Erickson, K. I., R. S. Prakash, M. W. Voss, L. Chaddock, S. Heo, M. McLaren, B. D. Pence, S. A. Martin, V. J. Vieira, J. A. Woods, E. McAuley and A. F. Kramer (2010). "Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume" **J Neurosci** 30 (15): 5368-75.

Erickson, K. I., M. W. Voss, R. S. Prakash, C. Basak, A. Szabo, L. Chaddock, J. S. Kim, S. Heo, H. Alves, S. M. White, T. R. Wojcicki, E. Mailey, V. J. Vieira, S. A. Martin, B. D. Pence, J. A. Woods, E. McAuley and A. F. Kramer (2011). "Exercise training increases size of hippocampus and improves memory" **Proc Natl Acad Sci U S A** 108 (7): 3017-22.

Ershler, W. B. (2007). "A gripping reality: oxidative stress, inflammation, and the pathway to frailty" **J Appl Physiol** 103 (1): 3-5.

Esterbauer, H., R. J. Schaur and H. Zollner (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes" **Free Radic Biol Med** 11 (1): 81-128.

- Estrada, D., E. Pujol, L. Jimenez, M. Salamero and A. de la Sierra (2012). "[Effectiveness of an educational intervention on hypertension directed at elderly hypertensive patients]" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 47 (2): 62-6.
- Fattor, J. A., B. F. Miller, K. A. Jacobs and G. A. Brooks (2005). "Catecholamine response is attenuated during moderate-intensity exercise in response to the "lactate clamp"" **Am J Physiol Endocrinol Metab** 288 (1): E143-7.
- Fenton (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron" **J. Chem. Soc. Trans** 65 899-910.
- Ferrucci, L., B. W. Penninx, S. Volpato, T. B. Harris, K. Bandeen-Roche, J. Balfour, S. G. Leveille, L. P. Fried and J. M. Md (2002). "Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels" **J Am Geriatr Soc** 50 (12): 1947-54.
- Fiatarone, M. A., E. F. O'Neill, N. D. Ryan, K. M. Clements, G. R. Solares, M. E. Nelson, S. B. Roberts, J. J. Kehayias, L. A. Lipsitz and W. J. Evans (1994). "Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people" **N Engl J Med** 330 (25): 1769-75.
- Fiehn, O. (2002). "Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes" **Plant Mol Biol** 48 (1-2): 155-71.
- Figueiredo, P. A., S. K. Powers, R. M. Ferreira, F. Amado, H. J. Appell and J. A. Duarte (2009). "Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 64 (9): 927-39.
- Fitch, C. D., R. P. Shields, W. F. Payne and J. M. Dacus (1968). "Creatine metabolism in skeletal muscle. 3. Specificity of the creatine entry process" **J Biol Chem** 243 (8): 2024-7.
- Flodin, N. W. (1984). "The senescence of postmitotic mammalian cells: a cell-clock hypothesis" **Mech Ageing Dev** 27 (1): 15-27.
- Flohe, L. and W. A. Gunzler (1984). "Assays of glutathione peroxidase" **Methods Enzymol** 105 114-21.
- Folstein, M. F., S. E. Folstein and P. R. McHugh (1975). "'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician" **J Psychiatr Res** 12 (3): 189-98.
- Forbes, S. C., J. P. Little and D. G. Candow (2012). "Exercise and nutritional interventions for improving aging muscle health" **Endocrine**
- Freeman, B. A. and J. D. Crapo (1982). "Biology of disease: free radicals and tissue injury" **Lab Invest** 47 (5): 412-26.
- Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action" **Am J Med** 97 (3A): 5S-13S; discussion 22S-28S.

- Fresno, M., R. Alvarez and N. Cuesta (2011). "Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity" **Arch Physiol Biochem** 117 (3): 151-64.
- Fridovich, I. (1978). "Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical" **Ciba Found Symp** (65): 77-93.
- Fried, L. P., C. M. Tangen, J. Walston, A. B. Newman, C. Hirsch, J. Gottdiener, T. Seeman, R. Tracy, W. J. Kop, G. Burke and M. A. McBurnie (2001). "Frailty in older adults: evidence for a phenotype" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 56 (3): M146-56.
- Fries, J. F. (1980). "Aging, natural death, and the compression of morbidity" **N Engl J Med** 303 (3): 130-5.
- Fries, J. F. (2002). "Successful aging--an emerging paradigm of gerontology" **Clin Geriatr Med** 18 (3): 371-82.
- Furukawa, S., T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda and I. Shimomura (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome" **J Clin Invest** 114 (12): 1752-61.
- Fuss, J., N. M. Ben Abdallah, M. A. Vogt, C. Touma, P. G. Pacifici, R. Palme, V. Witzemann, R. Hellweg and P. Gass (2009). "Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis" **Hippocampus** 20 (3): 364-76.
- García-García, F. J. and A. Alfaro Acha (2010). "[Frailty: from the epidemiology to the clinic]" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 45 (5): 250-1.
- García-García, F. J., J. L. Larrion Zugasti and L. Rodríguez Manas (2011). "[Frailty: a phenotype under review]" **Gac Sanit** 25 Suppl 2 51-8.
- García González J.V, Díaz Palacios E., Salamea García A., Cabrera González D., Menéndez Caicoya A., Fernández Sánchez A. and Acebal García V. (1999). "Evaluación de la fiabilidad y validez de una escalade valoración social en el anciano" **Aten Primaria** 23 434-440.
- Gerschman, R., D. L. Gilbert, S. W. Nye, P. Dwyer and W. O. Fenn (1954). "Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common" **Science** 119 (3097): 623-6.
- Gertler, M. M., S. M. Garn and J. Lerman (1950). "The interrelationships of serum cholesterol, cholesterol esters and phospholipids in health and in coronary artery disease" **Circulation** 2 (2): 205-14.
- Gielen, E., S. Verschueren, T. W. O'Neill, S. R. Pye, M. D. O'Connell, D. M. Lee, R. Ravindrarajah, F. Claessens, M. Laurent, K. Milisen, J. Tournoy, M. Dejaeger, F. C. Wu, D. Vanderschueren and S. Boonen (2012). "Musculoskeletal Frailty: A Geriatric Syndrome at the Core of

*Fracture Occurrence in Older Age"*  
**Calcif Tissue Int**

Gill, T. M., D. I. Baker, M. Gottschalk, P. N. Peduzzi, H. Allore and A. Byers (2002). "A program to prevent functional decline in physically frail, elderly persons who live at home" **N Engl J Med** 347 (14): 1068-74.

Gill, T. M., E. A. Gahbauer, L. Han and H. G. Allore (2010). "Trajectories of disability in the last year of life" **N Engl J Med** 362 (13): 1173-80.

Girard, I. and T. Garland, Jr. (2002). "Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice" **J Appl Physiol** 92 (4): 1553-61.

Giulivi, C. and K. J. Davies (1990). "A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin" **J Biol Chem** 265 (32): 19453-60.

Goetzl, E. J. (2011). "Is aging a drug target?" **FASEB J** 25 (8): 2509-11.

Gomez-Cabrera, M. C., C. Borrás, F. V. Pallardo, J. Sastre, L. L. Ji and J. Vina (2005). "Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats" **J Physiol** 567 (Pt 1): 113-20.

Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech, M. Romagnoli, A. Arduini, C. Borrás, F. V. Pallardo, J. Sastre and J. Vina (2008). "Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and

hampers training-induced adaptations in endurance performance" **Am J Clin Nutr** 87 (1): 142-9.

Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech and J. Vina (2008). "Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training" **Free Radic Biol Med** 44 (2): 126-31.

Goodrick, C. L. (1980). "Effects of long-term voluntary wheel exercise on male and female Wistar rats. I. Longevity, body weight, and metabolic rate" **Gerontology** 26 (1): 22-33.

Grau Fibla, G., P. Eiroa Patino and A. Cayuela Dominguez (1996). "[Spanish version of the OARS Multidimensional Functional Assessment Questionnaire: cross-cultural adaptation and validity measurement]" **Aten Primaria** 17 (8): 486-95.

Gul, M., D. E. Laaksonen, M. Atalay, L. Vider and O. Hanninen (2002). "Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats" **Scand J Med Sci Sports** 12 (3): 163-70.

Haber F., a. W. J. (1934). "The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts" **Proc R. Soc. London**. 147 332-351.

Hageman, J. J., A. Bast and N. P. Vermeulen (1992). "Monitoring of oxidative free radical damage in vivo:

*analytical aspects*" **Chem Biol Interact** 82 (3): 243-93.

Halliwell, B. (1996). "*Antioxidants in human health and disease*" **Annu Rev Nutr** 16 33-50.

Halliwell, B. (2007). "*Biochemistry of oxidative stress*" **Biochem Soc Trans** 35 (Pt 5): 1147-50.

Halliwell, B. (1994). "*Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?*" **Lancet** 344 (8924): 721-4.

Halliwell, B. (1991). "*Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease*" **Am J Med** 91 (3C): 14S-22S.

Halliwell, B., R. Aeschbach, J. Loliger and O. I. Aruoma (1995). "*The characterization of antioxidants*" **Food Chem Toxicol** 33 (7): 601-17.

Halliwell, B. and O. I. Aruoma (1991). "*DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems*" **FEBS Lett** 281 (1-2): 9-19.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1986). "*Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts*" **Arch Biochem Biophys** 246 (2): 501-14.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "*Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*" **Methods Enzymol** 186 1-85.

Hamerman, D. (1999). "*Toward an understanding of frailty*" **Ann Intern Med** 130 (11): 945-50.

Han, D., F. Antunes, R. Canali, D. Rettori and E. Cadenas (2003). "*Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol*" **J Biol Chem** 278 (8): 5557-63.

Harman, D. (1981). "*The aging process*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 78 (11): 7124-8.

Harman, D. (1956). "*Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*" **J Gerontol** 11 (3): 298-300.

Harman, D. (1998). "*Extending functional life span*" **Exp Gerontol** 33 (1-2): 95-112.

Harman, D. (1965). "*The Free Radical Theory of Aging: Effect of Age on Serum Copper Levels*" **J Gerontol** 20 151-3.

Hassan, H. M. (1989). "*Microbial superoxide dismutases*" **Adv Genet** 26 65-97.

Hassan, H. M. and I. Fridovich (1977). "*Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in Escherichia coli. Induction by methyl viologen*" **J Biol Chem** 252 (21): 7667-72.

Hayflick, L. (1980). "*The cell biology of human aging*" **Sci Am** 242 (1): 58-65.



- Hayflick, L. (1980). "Recent advances in the cell biology of aging" **Mech Ageing Dev** 14 (1-2): 59-79.
- Hekimi, S., J. Lapointe and Y. Wen (2011). "Taking a "good" look at free radicals in the aging process" **Trends Cell Biol** 21 (10): 569-76.
- Herder, R. and B. Demmig-Adams (2004). "The power of a balanced diet and lifestyle in preventing cardiovascular disease" **Nutr Clin Care** 7 (2): 46-55.
- Higuchi, M., L. J. Cartier, M. Chen and J. O. Holloszy (1985). "Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise" **J Gerontol** 40 (3): 281-6.
- Ho, Y. Y., A. M. Matteini, B. Beamer, L. Fried, Q. L. Xue, D. E. Arking, A. Chakravarti, M. D. Fallin and J. Walston (2011). "Exploring biologically relevant pathways in frailty" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 66 (9): 975-9.
- Hoene, M. and C. Weigert (2010). "The stress response of the liver to physical exercise" **Exerc Immunol Rev** 16 163-83.
- Holanda, C. M., R. O. Guerra, P. V. Nobrega, H. F. Costa, M. R. Piuvezam and A. C. Maciel (2012). "Salivary cortisol and frailty syndrome in elderly residents of long-stay institutions: A cross-sectional study" **Arch Gerontol Geriatr** 54 (2): e146-51.
- Hollander, J., J. Bejma, T. Ookawara, H. Ohno and L. L. Ji (2000). "Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age" **Mech Ageing Dev** 116 (1): 33-45.
- Holloszy, J. O. (1967). "Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle" **J Biol Chem** 242 (9): 2278-82.
- Holloszy, J. O. (1992). "Exercise and food restriction in rats" **J Nutr** 122 (3 Suppl): 774-7.
- Holloszy, J. O. (1998). "Longevity of exercising male rats: effect of an antioxidant supplemented diet" **Mech Ageing Dev** 100 (3): 211-9.
- Holloszy, J. O. (1997). "Mortality rate and longevity of food-restricted exercising male rats: a reevaluation" **J Appl Physiol** 82 (2): 399-403.
- Holloszy, J. O., E. K. Smith, M. Vining and S. Adams (1985). "Effect of voluntary exercise on longevity of rats" **J Appl Physiol** 59 (3): 826-31.
- Hood, D. A. (2001). "Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle" **J Appl Physiol** 90 (3): 1137-57.
- Hood, D. A., I. Irrcher, V. Ljubicic and A. M. Joseph (2006). "Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle" **J Exp Biol** 209 (Pt 12): 2265-75.

- Horning, E. C. (1968). "Use of combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry for clinical problems." **Clin. Chem.** 14 777.
- Howard, C., L. Ferrucci, K. Sun, L. P. Fried, J. Walston, R. Varadhan, J. M. Guralnik and R. D. Semba (2007). "Oxidative protein damage is associated with poor grip strength among older women living in the community" **J Appl Physiol** 103 (1): 17-20.
- Howells, D. W., M. J. Porritt, J. Y. Wong, P. E. Batchelor, R. Kalnins, A. J. Hughes and G. A. Donnan (2000). "Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra" **Exp Neurol** 166 (1): 127-35.
- Huang, C. C., W. T. Lin, F. L. Hsu, P. W. Tsai and C. C. Hou (2010). "Metabolomics investigation of exercise-modulated changes in metabolism in rat liver after exhaustive and endurance exercises" **Eur J Appl Physiol** 108 (3): 557-66.
- Hubbard, R. E., I. A. Lang, D. J. Llewellyn and K. Rockwood (2010). "Frailty, body mass index, and abdominal obesity in older people" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 65 (4): 377-81.
- Hubbard, R. E. and K. W. Woodhouse (2010). "Frailty, inflammation and the elderly" **Biogerontology** 11 (5): 635-41.
- Hyde, Z., L. Flicker, O. P. Almeida, G. J. Hankey, K. A. McCaul, S. A. Chubb and B. B. Yeap (2010). "Low free testosterone predicts frailty in older men: the health in men study" **J Clin Endocrinol Metab** 95 (7): 3165-72.
- Ingram, D. K. (1983). "Toward the behavioral assessment of biological aging in the laboratory mouse: concepts, terminology, and objectives" **Exp Aging Res** 9 (4): 225-38.
- Isaacs, B. and A. J. Akhtar (1972). "The set test: a rapid test of mental function in old people" **Age Ageing** 1 (4): 222-6.
- Jackson, M. J. (1987). "Muscle damage during exercise: possible role of free radicals and protective effect of vitamin E" **Proc Nutr Soc** 46 (1): 77-80.
- Ji, L. L. (1993). "Antioxidant enzyme response to exercise and aging" **Med Sci Sports Exerc** 25 (2): 225-31.
- Ji, L. L. (2001). "Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress?" **Ann N Y Acad Sci** 928 236-47.
- Karege, F., G. Perret, G. Bondolfi, M. Schwald, G. Bertschy and J. M. Aubry (2002). "Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients" **Psychiatry Res** 109 (2): 143-8.
- Karvonen, M. J., H. Klemola, J. Virkajarvi and A. Kekkonen (1974). "Longevity of endurance skiers" **Med Sci Sports** 6 (1): 49-51.

- Katz, S., A. B. Ford, R. W. Moskowitz, B. A. Jackson and M. W. Jaffe (1963). "*Studies of Illness in the Aged. The Index of Adl: A Standardized Measure of Biological and Psychosocial Function*" **JAMA** 185 914-9.
- Kelly, D. P. (2011). "*Cell biology: Ageing theories unified*" **Nature** 470 (7334): 342-3.
- Kemnitz, J. W., E. B. Roecker, R. Weindruch, D. F. Elson, S. T. Baum and R. N. Bergman (1994). "*Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys*" **Am J Physiol** 266 (4 Pt 1): E540-7.
- Kerschensteiner, M., E. Gallmeier, L. Behrens, V. V. Leal, T. Misgeld, W. E. Klinkert, R. Kolbeck, E. Hoppe, R. L. Oropeza-Wekerle, I. Bartke, C. Stadelmann, H. Lassmann, H. Wekerle and R. Hohlfeld (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 (5): 865-70.
- Ketterer, B. (1986). "*Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases*" **Xenobiotica** 16 (10-11): 957-73.
- Kirkland, J. L. and C. Peterson (2009). "*Healthspan, translation, and new outcomes for animal studies of aging*" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 64 (2): 209-12.
- Klein, A. B., R. Williamson, M. A. Santini, C. Clemmensen, A. Ettrup, M. Rios, G. M. Knudsen and S. Aznar (2011). "*Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species*" **Int J Neuropsychopharmacol** 14 (3): 347-53.
- Knez, W. L., J. S. Coombes and D. G. Jenkins (2006). "*Ultra-endurance exercise and oxidative damage : implications for cardiovascular health*" **Sports Med** 36 (5): 429-41.
- Knight, J. A., S. E. Smith, V. E. Kinder and R. K. Pieper (1988). "*Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography, and determination of reference values for adults*" **Clin Chem** 34 (6): 1107-10.
- Ko, F., Q. Yu, Q. L. Xue, W. Yao, C. Brayton, H. Yang, N. Fedarko and J. Walston (2011). "*Inflammation and mortality in a frail mouse model*" **Age (Dordr)**
- Kohl, H. W., 3rd (2001). "*Physical activity and cardiovascular disease: evidence for a dose response*" **Med Sci Sports Exerc** 33 (6 Suppl): S472-83; discussion S493-4.
- Korivi, M., C. W. Hou, C. Y. Huang, S. D. Lee, M. F. Hsu, S. H. Yu, C. Y. Chen, Y. Y. Liu and C. H. Kuo (2012). "*Ginsenoside-Rg1 Protects the Liver against Exhaustive Exercise-Induced Oxidative Stress in Rats*" **Evid Based Complement Alternat Med** 2012 932165.

- Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1978). "*The glutathione status of cells*" **Int Rev Cytol** 54 109-60.
- Krajcovicova-Kudlackova, M., M. Valachovicova, V. Paukova and M. Dusinska (2008). "*Effects of diet and age on oxidative damage products in healthy subjects*" **Physiol Res** 57 (4): 647-51.
- Kvaavik, E., G. D. Batty, G. Ursin, R. Huxley and C. R. Gale "*Influence of individual and combined health behaviors on total and cause-specific mortality in men and women: the United Kingdom health and lifestyle survey*" **Arch Intern Med** 170 (8): 711-8.
- LaFrance, W. C., Jr., K. Leaver, E. G. Stopa, G. D. Papandonatos and A. S. Blum (2010). "*Decreased serum BDNF levels in patients with epileptic and psychogenic nonepileptic seizures*" **Neurology** 75 (14): 1285-91.
- Lakka, T. A., D. E. Laaksonen, H. M. Lakka, N. Mannikko, L. K. Niskanen, R. Rauramaa and J. T. Salonen (2003). "*Sedentary lifestyle, poor cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome*" **Med Sci Sports Exerc** 35 (8): 1279-86.
- Lang, T., T. Streeper, P. Cawthon, K. Baldwin, D. R. Taaffe and T. B. Harris (2010). "*Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment*" **Osteoporos Int** 21 (4): 543-59.
- Lapvetelainen, T., M. M. Hyttinen, A. M. Saamanen, T. Langsjo, J. Sahlman, S. Felszeghy, E. Vuorio and H. J. Helminen (2002). "*Lifelong voluntary joint loading increases osteoarthritis in mice housing a deletion mutation in type II procollagen gene, and slightly also in non-transgenic mice*" **Ann Rheum Dis** 61 (9): 810-7.
- Larson, E. B., L. Wang, J. D. Bowen, W. C. McCormick, L. Teri, P. Crane and W. Kukull (2006). "*Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older*" **Ann Intern Med** 144 (2): 73-81.
- Laske, C., E. Stransky, T. Leyhe, G. W. Eschweiler, A. Wittorf, E. Richartz, M. Bartels, G. Buchkremer and K. Schott (2006). "*Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease*" **J Neural Transm** 113 (9): 1217-24.
- Lauretani, F., C. R. Russo, S. Bandinelli, B. Bartali, C. Cavazzini, A. Di Iorio, A. M. Corsi, T. Rantanen, J. M. Guralnik and L. Ferrucci (2003). "*Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia*" **J Appl Physiol** 95 (5): 1851-60.
- Lawton, M. P. (1975). "*The Philadelphia Geriatric Center Morale Scale: a revision*" **J Gerontol** 30 (1): 85-9.
- Lawton, M. P. and E. M. Brody (1969). "*Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living*" **Gerontologist** 9 (3): 179-86.

- Lee, I. M., C. C. Hsieh and R. S. Paffenbarger, Jr. (1995). "Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study" **Jama** 273 (15): 1179-84.
- Lee, I. M. and P. J. Skerrett (2001). "Physical activity and all-cause mortality: what is the dose-response relation?" **Med Sci Sports Exerc** 33 (6 Suppl): S459-71; discussion S493-4.
- Leick, L., S. S. Lyngby, J. F. Wojtasewski and H. Pilegaard (2010). "PGC-1alpha is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle" **Exp Gerontol** 45 (5): 336-42.
- Lerman, I., B. C. Harrison, K. Freeman, T. E. Hewett, D. L. Allen, J. Robbins and L. A. Leinwand (2002). "Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains" **J Appl Physiol** 92 (6): 2245-55.
- Lewis, S. A. and R. L. Levine (1995). "Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis" **Anal Biochem** 231 (2): 440-6.
- Libby, P. (2003). "Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art" **Am J Cardiol** 91 (3A): 3A-6A.
- Lima, F. D., D. N. Stamm, I. D. Della-Pace, F. Dobrachinski, N. R. de Carvalho, L. F. Royes, F. A. Soares, J. B. Rocha, J. Gonzalez-Gallego and G. Bresciani (2013). "Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts" **PLoS One** 8 (2): e55668.
- Lin, Y. T., L. S. Ro, H. L. Wang and J. C. Chen (2011). "Up-regulation of dorsal root ganglia BDNF and trkB receptor in inflammatory pain: an in vivo and in vitro study" **J Neuroinflammation** 8 126.
- Lippman, R. D. (1985). "Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man" **Exp Gerontol** 20 (1): 1-5.
- Lopez-Torres, M., R. Perez-Campo and G. Barja de Quiroga (1991). "Effect of natural ageing and antioxidant inhibition on liver antioxidant enzymes, glutathione system, peroxidation, and oxygen consumption in *Rana perezi*" **J Comp Physiol B** 160 (6): 655-61.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent" **J Biol Chem** 193 (1): 265-75.
- Mahoney, F. I. and D. W. Barthel (1965). "Functional Evaluation: The Barthel Index" **Md State Med J** 14 61-5.
- Manini, T. M., A. B. Newman, R. Fielding, S. N. Blair, M. G. Perri, S. D. Anton, B. C. Goodpaster, J. A. Katula, W. J. Rejeski, S. B. Kritchevsky, F. C. Hsu and M. Pahor (2010). "Effects of exercise on mobility in obese and nonobese older adults" **Obesity (Silver Spring)** 18 (6): 1168-75.

- Marcus, B. H., P. M. Dubbert, L. H. Forsyth, T. L. McKenzie, E. J. Stone, A. L. Dunn and S. N. Blair (2000). "Physical activity behavior change: issues in adoption and maintenance" **Health Psychol** 19 (1 Suppl): 32-41.
- Marin, R. V., M. A. Pedrosa, L. D. Moreira-Pfrimer, S. M. Matsudo and M. Lazaretti-Castro (2010). "Association between lean mass and handgrip strength with bone mineral density in physically active postmenopausal women" **J Clin Densitom** 13 (1): 96-101.
- Matheu, A., A. Maraver, P. Klatt, I. Flores, I. Garcia-Cao, C. Borrás, J. M. Flores, J. Vina, M. A. Blasco and M. Serrano (2007). "Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway" **Nature** 448 (7151): 375-9.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)" **J Biol Chem** 244 (22): 6049-55.
- McCord, J. M., B. B. Keele, Jr. and I. Fridovich (1971). "An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase" **Proc Natl Acad Sci U S A** 68 (5): 1024-7.
- Miquel, J. and M. Blasco (1978). "A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor" **Exp Gerontol** 13 (6): 389-96.
- Miquel, J., A. C. Economos, J. Fleming and J. E. Johnson, Jr. (1980). "Mitochondrial role in cell aging" **Exp Gerontol** 15 (6): 575-91.
- Monleon, D., J. M. Morales, A. Barrasa, J. A. Lopez, C. Vazquez and B. Celda (2009). "Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer" **NMR Biomed** 22 (3): 342-8.
- Monleon, D., J. M. Morales, J. Gonzalez-Darder, F. Talamantes, O. Cortes, R. Gil-Benso, C. Lopez-Gines, M. Cerda-Nicolas and B. Celda (2008). "Benign and atypical meningioma metabolic signatures by high-resolution magic-angle spinning molecular profiling" **J Proteome Res** 7 (7): 2882-8.
- Moore, A. Z., M. L. Biggs, A. Matteini, A. O'Connor, S. McGuire, B. A. Beamer, M. D. Fallin, L. P. Fried, J. Walston, A. Chakravarti and D. E. Arking (2011). "Polymorphisms in the mitochondrial DNA control region and frailty in older adults" **PLoS ONE** 5 (6): e11069.
- Morris, J. N., J. A. Heady, P. A. Raffle, C. G. Roberts and J. W. Parks (1953). "Coronary heart-disease and physical activity of work" **Lancet** 265 (6795): 1053-7; contd.
- Muoio, D. M., P. S. MacLean, D. B. Lang, S. Li, J. A. Houmard, J. M. Way, D. A. Winegar, J. C. Corton, G. L. Dohm and W. E. Kraus (2002). "Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-

*activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta*" **J Biol Chem** 277 (29): 26089-97.

Myers, J., A. Kaykha, S. George, J. Abella, N. Zaheer, S. Lear, T. Yamazaki and V. Froelicher (2004). "Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men" **Am J Med** 117 (12): 912-8.

Myers, J., M. Prakash, V. Froelicher, D. Do, S. Partington and J. E. Atwood (2002). "Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing" **N Engl J Med** 346 (11): 793-801.

Nascimento Ordoneza, T., S. S. Tavares Batistonib and M. Cachionic (2011). "Síntomas depresivos en adultos mayores participantes de una universidad abierta a la tercera edad" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 46 (5): 250-255.

Navarro, A., C. Gomez, J. M. Lopez-Cepero and A. Boveris (2004). "Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer" **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 286 (3): R505-11.

Neeper, S. A., F. Gomez-Pinilla, J. Choi and C. Cotman (1995). "Exercise and brain neurotrophins" **Nature** 373 (6510): 109.

Neeper, S. A., F. Gomez-Pinilla, J. Choi and C. W. Cotman (1996). "Physical

*activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain*" **Brain Res** 726 (1-2): 49-56.

Nicholson, J. K., J. Connelly, J. C. Lindon and E. Holmes (2002). "Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function" **Nat Rev Drug Discov** 1 (2): 153-61.

Nicholson, J. K. and J. C. Lindon (2008). "Systems biology: Metabonomics" **Nature** 455 (7216): 1054-6.

Niki, E. and M. G. Traber (2012). "A history of vitamin e" **Ann Nutr Metab** 61 (3): 207-12.

Oh-Ishi, S., T. Kizaki, H. Yamashita, N. Nagata, K. Suzuki, N. Taniguchi and H. Ohno (1995). "Alterations of superoxide dismutase iso-enzyme activity, content, and mRNA expression with aging in rat skeletal muscle" **Mech Ageing Dev** 84 (1): 65-76.

Oldridge, N. (2003). "Physical activity in primary and secondary prevention - there is a treatment gap" **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil** 10 (5): 317-8.

Oliver, C. N., B. W. Ahn, E. J. Moerman, S. Goldstein and E. R. Stadtman (1987). "Age-related changes in oxidized proteins" **J Biol Chem** 262 (12): 5488-91.

Olmos, Y., I. Valle, S. Borniquel, A. Tierrez, E. Soria, S. Lamas and M.

- Monsalve (2009). "Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1alpha in the induction of oxidative stress genes" **J Biol Chem** 284 (21): 14476-84.
- Orgel, L. E. (1965). "The chemical basis of mutation" **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol** 27 289-346.
- Orr, W. C. and R. S. Sohal (1994). "Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*" **Science** 263 (5150): 1128-30.
- Ortega, E., M. A. Forner, J. J. Garcia, A. B. Rodriguez and C. Barriga (1999). "Enhanced chemotaxis of macrophages by strenuous exercise in trained mice: thyroid hormones as possible mediators" **Mol Cell Biochem** 201 (1-2): 41-7.
- Otero, A., M. V. Castell and M. C. de Hoyos (2011). "[Frailty screening in primary care]" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 46 (5): 239-40.
- Pacifici, R. E. and K. J. Davies (1991). "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited" **Gerontology** 37 (1-3): 166-80.
- Paffenbarger, R. S. and W. E. Hale (1975). "Work activity and coronary heart mortality" **N Engl J Med** 292 (11): 545-50.
- Paffenbarger, R. S., Jr., R. J. Brand, R. I. Sholtz and D. L. Jung (1978). "Energy expenditure, cigarette smoking, and blood pressure level as related to death from specific diseases" **Am J Epidemiol** 108 (1): 12-8.
- Paffenbarger, R. S., Jr., R. T. Hyde, A. L. Wing and C. C. Hsieh (1986). "Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni" **N Engl J Med** 314 (10): 605-13.
- Paffenbarger, R. S., Jr., R. T. Hyde, A. L. Wing, I. M. Lee, D. L. Jung and J. B. Kampert (1993). "The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men" **N Engl J Med** 328 (8): 538-45.
- Page, M. M., J. Richardson, B. E. Wiens, E. Tiedtke, C. W. Peters, P. A. Faure, G. Burness and J. A. Stuart (2010). "Antioxidant enzyme activities are not broadly correlated with longevity in 14 vertebrate endotherm species" **Age (Dordr)** 32 (2): 255-70.
- Pappas, P., P. Stephanou, V. Vasiliou and M. Marselos (1998). "Zoxazolamine-induced paralysis in two rat substrains: differences in hepatic drug metabolism" **Eur J Drug Metab Pharmacokinet** 23 (4): 461-7.
- Parks, R. J., E. Fares, J. K. Macdonald, M. C. Ernst, C. J. Sinal, K. Rockwood and S. E. Howlett (2011). "A Procedure for Creating a Frailty Index Based on Deficit Accumulation in Aging Mice" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**
- Parks, R. J., E. Fares, J. K. Macdonald, M. C. Ernst, C. J. Sinal, K. Rockwood



- and S. E. Howlett (2011). "A procedure for creating a frailty index based on deficit accumulation in aging mice" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 67 (3): 217-27.
- Pate, R. R., M. Pratt, S. N. Blair, W. L. Haskell, C. A. Macera, C. Bouchard, D. Buchner, W. Ettinger, G. W. Heath, A. C. King and et al. (1995). "Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine" **JAMA** 273 (5): 402-7.
- Pauling, L., A. B. Robinson, R. Teranishi and P. Cary (1971). "Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography" **Proc Natl Acad Sci U S A** 68 (10): 2374-6.
- Pedersen, B. K. and B. Saltin (2006). "Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease" **Scand J Med Sci Sports** 16 Suppl 1 3-63.
- Pederson, B. A., C. R. Cope, J. M. Schroeder, M. W. Smith, J. M. Irimia, B. L. Thurberg, A. A. DePaoli-Roach and P. J. Roach (2005). "Exercise capacity of mice genetically lacking muscle glycogen synthase: in mice, muscle glycogen is not essential for exercise" **J Biol Chem** 280 (17): 17260-5.
- Peeters, A. C., M. G. Netea, M. C. Janssen, B. J. Kullberg, J. W. Van der Meer and T. Thien (2001). "Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension" **Eur J Clin Invest** 31 (1): 31-6.
- Pendergast, D. R., N. M. Fisher and E. Calkins (1993). "Cardiovascular, neuromuscular, and metabolic alterations with age leading to frailty" **J Gerontol** 48 Spec No 61-7.
- Perlado, F. (2001). "Valoración geriátrica" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 36 (Supl.5): 25-31.
- Peterson, G. L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable" **Anal Biochem** 83 (2): 346-56.
- Pfeiffer, E. (1975). "A short portable mental status questionnaire for the assessment of organic brain deficit in elderly patients" **J Am Geriatr Soc** 23 (10): 433-41.
- Plutchik, R., H. Conte, M. Lieberman, M. Bakur, J. Grossman and N. Lehrman (1970). "Reliability and validity of a scale for assessing the functioning of geriatric patients" **J Am Geriatr Soc** 18 (6): 491-500.
- Powell, K. E., P. D. Thompson, C. J. Caspersen and J. S. Kendrick (1987). "Physical activity and the incidence of coronary heart disease" **Annu Rev Public Health** 8 253-87.
- Powers, S. K. and M. J. Jackson (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production" **Physiol Rev** 88 (4): 1243-76.
- Powers, S. K., A. N. Kavazis and J. M. McClung (2007). "Oxidative stress

and disuse muscle atrophy" **J Appl Physiol** 102 (6): 2389-97.

Pryor, W. A., G. L. Squadrito and M. Friedman (1995). "A new mechanism for the toxicity of ozone" **Toxicol Lett** 82-83 287-93.

Puts, M. T., M. Visser, J. W. Twisk, D. J. Deeg and P. Lips (2005). "Endocrine and inflammatory markers as predictors of frailty" **Clin Endocrinol (Oxf)** 63 (4): 403-11.

Quinn, T. J., H. A. Sprague, W. D. Van Huss and H. W. Olson (1990). "Caloric expenditure, life status, and disease in former male athletes and non-athletes" **Med Sci Sports Exerc** 22 (6): 742-50.

Radak, Z., T. Kaneko, S. Tahara, H. Nakamoto, J. Pucso, M. Sasvari, C. Nyakas and S. Goto (2001). "Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain" **Neurochem Int** 38 (1): 17-23.

Ranieri, P., R. Rozzini, S. Franzoni, P. Barbisoni and M. Trabucchi (1998). "Serum cholesterol levels as a measure of frailty in elderly patients" **Exp Aging Res** 24 (2): 169-79.

Rasmussen, P., P. Brassard, H. Adser, M. V. Pedersen, L. Leick, E. Hart, N. H. Secher, B. K. Pedersen and H. Pilegaard (2009). "Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise" **Exp Physiol** 94 (10): 1062-9.

Reichardt, L. F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways" **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 361 (1473): 1545-64.

Roberts, C. K. and R. J. Barnard (2005). "Effects of exercise and diet on chronic disease" **J Appl Physiol** 98 (1): 3-30.

Robles Agudo, F. and J. M. López Arrieta (2012). "Fragilidad, una oportunidad para prevenir la dependencia" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 19-13.

Rock, C. L., R. A. Jacob and P. E. Bowen (1996). "Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids" **J Am Diet Assoc** 96 (7): 693-702; quiz 703-4.

Rockwood, K. (2005). "Frailty and its definition: a worthy challenge" **J Am Geriatr Soc** 53 (6): 1069-70.

Rockwood, K. and A. Mitnitski (2011). "Frailty defined by deficit accumulation and geriatric medicine defined by frailty" **Clin Geriatr Med** 27 (1): 17-26.

Rockwood, K. and A. Mitnitski (2007). "Frailty in relation to the accumulation of deficits" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 62 (7): 722-7.

Rockwood, K., X. Song, C. MacKnight, H. Bergman, D. B. Hogan, I. McDowell and A. Mitnitski (2005). "A global clinical measure of fitness and frailty

in elderly people" **CMAJ** 173 (5): 489-95.

Rodriguez-Manas, L., C. Feart, G. Mann, J. Vina, S. Chatterji, W. Chodzko-Zajko, M. Gonzalez-Colaco Harmand, H. Bergman, L. Carcaillon, C. Nicholson, A. Scuteri, A. Sinclair, M. Pelaez, T. Van der Cammen, F. Beland, J. Bickenbach, P. Delamarche, L. Ferrucci, L. P. Fried, L. M. Gutierrez-Robledo, K. Rockwood, F. Rodriguez Artalejo, G. Serviddio and E. Vega (2012). "Searching for an Operational Definition of Frailty: A Delphi Method Based Consensus Statement. The Frailty Operative Definition-Consensus Conference Project" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**

Rodriguez, A. M., P. M. Carrico, J. E. Mazurkiewicz and J. A. Melendez (2000). "Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>" **Free Radic Biol Med** 29 (9): 801-13.

Rodriguez Mañas L and Alonso Bouzon C (2009). "Enfermedad cardiovascular subclínica y fragilidad" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 10

Rolfson, D. B., S. R. Majumdar, R. T. Tsuyuki, A. Tahir and K. Rockwood (2006). "Validity and reliability of the Edmonton Frail Scale" **Age Ageing** 35 (5): 526-9.

Romero Ortuno, R. (2011). "[The Frailty Instrument for primary care of

the Survey of Health, Ageing and Retirement in Europe (SHARE-FI): results of the Spanish sample]" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 46 (5): 243-9.

Romijn, J. A., S. Klein, E. F. Coyle, L. S. Sidossis and R. R. Wolfe (1993). "Strenuous endurance training increases lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling at rest" **J Appl Physiol** 75 (1): 108-13.

Rosenfeld, R. D., L. Zeni, M. Haniu, J. Talvenheimo, S. F. Radka, L. Bennett, J. A. Miller and A. A. Welcher (1995). "Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum" **Protein Expr Purif** 6 (4): 465-71.

Rouault, T. A. and R. D. Klausner (1996). "The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism" **EXS** 77 183-97.

Roubenoff, R. (2000). "Sarcopenia: a major modifiable cause of frailty in the elderly" **J Nutr Health Aging** 4 (3): 140-2.

Rubenstein, L. Z. (1987). "Geriatric assessment: an overview of its impacts" **Clin Geriatr Med** 3 (1): 1-15.

Ruiperez Cantera, I. (2011). "[Is it appropriate to reduce hospital admissions in institutionalised patients?]" **Rev Esp Geriatr Gerontol** 46 (5): 241-2.

Sacheck, J. M., P. E. Milbury, J. G. Cannon, R. Roubenoff and J. B. Blumberg (2003). "Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected

biomarkers of oxidative stress in young and elderly men" **Free Radic Biol Med** 34 (12): 1575-88.

Samorajski, T., C. Delaney, L. Durham, J. M. Ordy, J. A. Johnson and W. P. Dunlap (1985). "Effect of exercise on longevity, body weight, locomotor performance, and passive-avoidance memory of C57BL/6J mice" **Neurobiol Aging** 6 (1): 17-24.

Sanchez-Quesada, J. L., R. Homs-Serradesanferm, J. Serrat-Serrat, J. R. Serra-Grima, F. Gonzalez-Sastre and J. Ordonez-Llanos (1995). "Increase of LDL susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration aerobic exercise" **Atherosclerosis** 118 (2): 297-305.

Sanchis-Gomar, F., G. Olaso-Gonzalez, D. Corella, M. C. Gomez-Cabrera and J. Vina (2011). "Increased average longevity among the "Tour de France" cyclists" **Int J Sports Med** 32 (8): 644-7.

Sandri, M., J. Lin, C. Handschin, W. Yang, Z. P. Arany, S. H. Lecker, A. L. Goldberg and B. M. Spiegelman (2006). "PGC-1 $\alpha$  protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription" **Proc Natl Acad Sci U S A** 103 (44): 16260-5.

Sartori, C. R., A. S. Vieira, E. M. Ferrari, F. Langone, E. Tongiorgi and C. A. Parada (2011). "The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF, and proBDNF

proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA" **Neuroscience** 180 9-18.

Sastre, J., M. Asensi, E. Gasco, F. V. Pallardo, J. A. Ferrero, T. Furukawa and J. Vina (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration" **Am J Physiol** 263 (5 Pt 2): R992-5.

Sastre, J., F. V. Pallardo, R. Pla, A. Pellin, G. Juan, J. E. O'Connor, J. M. Estrela, J. Miquel and J. Vina (1996). "Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes" **Hepatology** 24 (5): 1199-205.

Sastre, J., J. V. Rodriguez, F. V. Pallardo, E. Gasco, M. Asensi, J. V. Ferrer, J. Miquel and J. Vina (1992). "Effect of aging on metabolic zonation in rat liver: acinar distribution of GSH metabolism" **Mech Ageing Dev** 62 (2): 181-90.

Schalk, B. W., M. Visser, D. J. Deeg and L. M. Bouter (2004). "Lower levels of serum albumin and total cholesterol and future decline in functional performance in older persons: the Longitudinal Aging Study Amsterdam" **Age Ageing** 33 (3): 266-72.

Schlecht, S., H. Mossmann, K. H. Wiesmuller, G. Jung and W. G. Bessler (1996). "Protection against bacterial infection by urea extracts from Salmonella" **Zentralbl Bakteriol** 284 (4): 559-64.

- Seeman, T. E., S. S. Merkin, E. M. Crimmins and A. S. Karlamangla (2010). "Disability trends among older Americans: National Health And Nutrition Examination Surveys, 1988-1994 and 1999-2004" **Am J Public Health** 100 (1): 100-7.
- Semba, R. D., L. Ferrucci, K. Sun, J. Walston, R. Varadhan, J. M. Guralnik and L. P. Fried (2007). "Oxidative stress and severe walking disability among older women" **Am J Med** 120 (12): 1084-9.
- Serviddio, G., A. D. Romano, A. Greco, T. Rollo, F. Bellanti, E. Altomare and G. Vendemiale (2009). "Frailty syndrome is associated with altered circulating redox balance and increased markers of oxidative stress" **Int J Immunopathol Pharmacol** 22 (3): 819-27.
- Shardell, M., C. D'Adamo, D. E. Alley, R. R. Miller, G. E. Hicks, Y. Milaneschi, R. D. Semba, A. Cherubini, S. Bandinelli and L. Ferrucci (2012). "Serum 25-hydroxyvitamin d, transitions between frailty States, and mortality in older adults: the *invecchiare in chianti* study" **J Am Geriatr Soc** 60 (2): 256-64.
- Shephard, R. J. (2001). "Absolute versus relative intensity of physical activity in a dose-response context" **Med Sci Sports Exerc** 33 (6 Suppl): S400-18; discussion S419-20.
- Shigenaga, M. K., T. M. Hagen and B. N. Ames (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging" **Proc Natl Acad Sci U S A** 91 (23): 10771-8.
- Sies, H. (1985). "Oxidative stress: introductory remarks" (Ed.). **Oxidative Sress. London. Academic.** 1-7.
- Sies, H. (1986). "Biochemistry of Oxidative Stress" **Angewandte Chemie International Edition in English** 25 (12): 1058-1071.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense" **Eur J Biochem** 215 (2): 213-9.
- Sinclair, D. A. and L. Guarente (2006). "Unlocking the secrets of longevity genes" **Sci Am** 294 (3): 48-51, 54-7.
- Skalicky, M., H. Bubna-Littitz and A. Viidik (1996). "Influence of physical exercise on aging rats: I. Life-long exercise preserves patterns of spontaneous activity" **Mech Ageing Dev** 87 (2): 127-39.
- Skulachev, V. P. (1996). "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants" **Q Rev Biophys** 29 (2): 169-202.
- Slade, R., K. Crissman, J. Norwood and G. Hatch (1993). "Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats" **Exp Lung Res** 19 (4): 469-84.
- Smilkstein, G. (1978). "The family APGAR: a proposal for a family

*function test and its use by physicians*" **J Fam Pract** 6 (6): 1231-9.

Smilkstein, G., C. Ashworth and D. Montano (1982). "*Validity and reliability of the family APGAR as a test of family function*" **J Fam Pract** 15 (2): 303-11.

Sohal, R. S., S. Agarwal, A. Dubey and W. C. Orr (1993). "*Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies*" **Proc Natl Acad Sci U S A** 90 (15): 7255-9.

Sohal, R. S., B. H. Sohal and U. T. Brunk (1990). "*Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species*" **Mech Ageing Dev** 53 (3): 217-27.

Sohal, R. S. and R. Weindruch (1996). "*Oxidative stress, caloric restriction, and aging*" **Science** 273 (5271): 59-63.

Solomon, P. R. and W. W. Pendlebury (1998). "*Recognition of Alzheimer's disease: the 7 Minute Screen*" **Fam Med** 30 (4): 265-71.

Sorensen, T. I. (2000). "*The changing lifestyle in the world. Body weight and what else?*" **Diabetes Care** 23 Suppl 2 B1-4.

Speechley, M. and M. Tinetti (1991). "*Falls and injuries in frail and vigorous community elderly persons*" **J Am Geriatr Soc** 39 (1): 46-52.

Stadtman, E. R. (1992). "*Protein oxidation and aging*" **Science** 257 (5074): 1220-4.

Stankiewicz, W. and A. Stasiak-Barmuta (2011). "*[Aging of the immune system]*" **Pol Merkur Lekarski** 30 (179): 377-80.

Strandberg, T. E. and K. H. Pitkala (2007). "*Frailty in elderly people*" **Lancet** 369 (9570): 1328-9.

Sun, Q., M. K. Townsend, O. I. Okereke, O. H. Franco, F. B. Hu and F. Grodstein (2010). "*Physical activity at midlife in relation to successful survival in women at age 70 years or older*" **Arch Intern Med** 170 (2): 194-201.

Sunderland, T., J. L. Hill, A. M. Mellow, B. A. Lawlor, J. Gundersheimer, P. A. Newhouse and J. H. Grafman (1989). "*Clock drawing in Alzheimer's disease. A novel measure of dementia severity*" **J Am Geriatr Soc** 37 (8): 725-9.

Swan, P. B. (1997). "*To live longer, eat less! (McCay, 1934-1939)*" **J Nutr** 127 (5 Suppl): 1039S-1041S.

Taekema, D. G., J. Gussekloo, A. B. Maier, R. G. Westendorp and A. J. de Craen (2010). "*Handgrip strength as a predictor of functional, psychological and social health. A prospective population-based study among the oldest old*" **Age Ageing** 39 (3): 331-7.

Tartar, J. L., C. P. Ward, J. W. Cordeira, S. L. Legare, A. J. Blanchette, R. W. McCarley and R. E. Strecker (2009). "*Experimental sleep fragmentation and sleep deprivation in rats increases exploration in an*

*open field test of anxiety while increasing plasma corticosterone levels*" **Behav Brain Res** 197 (2): 450-3.

Taylor, B. S., M. E. de Vera, R. W. Ganster, Q. Wang, R. A. Shapiro, S. M. Morris, Jr., T. R. Billiar and D. A. Geller (1998). "*Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene*" **J Biol Chem** 273 (24): 15148-56.

Theou, O., L. Stathokostas, K. P. Roland, J. M. Jakobi, C. Patterson, A. A. Vandervoort and G. R. Jones (2011). "*The effectiveness of exercise interventions for the management of frailty: a systematic review*" **J Aging Res** 2011 569194.

Tiidus, P. M., J. Pushkarenko and M. E. Houston (1996). "*Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle*" **Am J Physiol** 271 (4 Pt 2): R832-6.

Tolbert, N. E. and E. Essner (1981). "*Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes*" **J Cell Biol** 91 (3 Pt 2): 271s-283s.

Tomas-Loba, A., I. Flores, P. J. Fernandez-Marcos, M. L. Cayuela, A. Maraver, A. Tejera, C. Borrás, A. Matheu, P. Klatt, J. M. Flores, J. Vina, M. Serrano and M. A. Blasco (2008). "*Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice*" **Cell** 135 (4): 609-22.

Traber, M. G., B. Frei and J. S. Beckman (2008). "*Vitamin E revisited:*

*do new data validate benefits for chronic disease prevention?*" **Curr Opin Lipidol** 19 (1): 30-8.

Troen, B. R. (2003). "*The biology of aging*" **Mt Sinai J Med** 70 (1): 3-22.

Trush, M. A., E. G. Mimnaugh and T. E. Gram (1982). "*Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity*" **Biochem Pharmacol** 31 (21): 3335-46.

Turrens, J. F. (2003). "*Mitochondrial formation of reactive oxygen species*" **J Physiol** 552 (Pt 2): 335-44.

Valle, I., A. Alvarez-Barrientos, E. Arza, S. Lamas and M. Monsalve (2005). "*PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells*" **Cardiovasc Res** 66 (3): 562-73.

Van Kan G.A., Rolland Y., Bergman H., Morley J.E., Kritchevsky S.B. and V. B. (2008). "*The I.A.N.A. Task force on frailty assessment of older people in clinical practice*" **The Journal of Nutrition, Health & Aging** 12 (1): 29-36.

van Praag, H., P. M. Qu, R. C. Elliott, H. Wu, C. F. Dreyfus and I. B. Black (1998). "*Unilateral hippocampal lesions in newborn and adult rats: effects on spatial memory and BDNF gene expression*" **Behav Brain Res** 92 (1): 21-30.

Vanitallie, T. B. (2003). "*Frailty in the elderly: contributions of sarcopenia*

*and visceral protein depletion*" **Metabolism** 52 (10 Suppl 2): 22-6.

Vellas, B. J., S. J. Wayne, L. Romero, R. N. Baumgartner, L. Z. Rubenstein and P. J. Garry (1997). "*One-leg balance is an important predictor of injurious falls in older persons*" **J Am Geriatr Soc** 45 (6): 735-8.

Verbrugghe, E., F. Boyen, W. Gaastra, L. Bekhuis, B. Leyman, A. Van Parys, F. Haesebrouck and F. Pasmans (2011). "*The complex interplay between stress and bacterial infections in animals*" **Vet Microbiol** 155 (2-4): 115-27.

Vianna, D., G. F. Resende, F. L. Torres-Leal, L. C. Pantaleao, J. Donato, Jr. and J. Tirapegui (2012). "*Long-term leucine supplementation reduces fat mass gain without changing body protein status of aging rats*" **Nutrition** 28 (2): 182-9.

Vina, J. and C. Borras (2010). "*Women live longer than men: understanding molecular mechanisms offers opportunities to intervene by using estrogenic compounds*" **Antioxid Redox Signal** 13 (3): 269-78.

Vina, J., M. C. Gomez-Cabrera, A. Lloret, R. Marquez, J. B. Minana, F. V. Pallardo and J. Sastre (2000). "*Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants*" **IUBMB Life** 50 (4-5): 271-7.

Vina, J., R. Hems and H. A. Krebs (1978). "*Reaction of formiminoglutamate with liver*

*glutamate dehydrogenase*" **Biochem J** 170 (3): 711-3.

Vina, J., F. Sanchis-Gomar, V. Martinez-Bello and M. C. Gomez-Cabrera (2012). "*Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise*" **Br J Pharmacol** 167 (1): 1-12.

Vina, J., J. Sastre, V. Anton, L. Bruseghini, A. Esteras and M. Asensi (1992). "*Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants*" **EXS** 62 136-44.

Vina, J., J. Sastre, F. Pallardo and C. Borras (2003). "*Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males*" **Antioxid Redox Signal** 5 (5): 549-56.

Viña, J. (1990). "*Glutathione: Metabolism and physiological functions*" **CRC press, Boca Raton, Florida**

Volkert, D. (2011). "*The role of nutrition in the prevention of sarcopenia*" **Wien Med Wochenschr** 161 (17-18): 409-15.

von Sonntag, C. (1994). "*Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research*" **Int J Radiat Biol** 65 (1): 19-26.

Walford, R. L., L. Weber and S. Panov (1995). "*Caloric restriction and aging as viewed from Biosphere 2*" **Receptor** 5 (1): 29-33.



- Walston, J., N. Fedarko, H. Yang, S. Leng, B. Beamer, S. Espinoza, A. Lipton, H. Zheng and K. Becker (2008). "The physical and biological characterization of a frail mouse model" **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 63 (4): 391-8.
- Walston, J., E. C. Hadley, L. Ferrucci, J. M. Guralnik, A. B. Newman, S. A. Studenski, W. B. Ershler, T. Harris and L. P. Fried (2006). "Research agenda for frailty in older adults: toward a better understanding of physiology and etiology: summary from the American Geriatrics Society/National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults" **J Am Geriatr Soc** 54 (6): 991-1001.
- Walston, J., M. A. McBurnie, A. Newman, R. P. Tracy, W. J. Kop, C. H. Hirsch, J. Gottdiener and L. P. Fried (2002). "Frailty and activation of the inflammation and coagulation systems with and without clinical comorbidities: results from the Cardiovascular Health Study" **Arch Intern Med** 162 (20): 2333-41.
- Walston, J., Q. Xue, R. D. Semba, L. Ferrucci, A. R. Cappola, M. Ricks, J. Guralnik and L. P. Fried (2006). "Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women" **Am J Epidemiol** 163 (1): 18-26.
- Wannamethee, S. G., A. G. Shaper and M. Walker (1998). "Changes in physical activity, mortality, and incidence of coronary heart disease in older men" **Lancet** 351 (9116): 1603-8.
- Warburton, D. E., C. W. Nicol and S. S. Bredin (2006). "Health benefits of physical activity: the evidence" **Cmaj** 174 (6): 801-9.
- Warburton, D. E., C. W. Nicol and S. S. Bredin (2006). "Prescribing exercise as preventive therapy" **Cmaj** 174 (7): 961-74.
- Wenz, T., S. G. Rossi, R. L. Rotundo, B. M. Spiegelman and C. T. Moraes (2009). "Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging" **Proc Natl Acad Sci U S A** 106 (48): 20405-10.
- Wess, L., M. A. Eastwood, C. A. Edwards, A. Busuttill and A. Miller (1996). "Collagen alteration in an animal model of colonic diverticulosis" **Gut** 38 (5): 701-6.
- Whitfield, C. W., A. M. Cziko and G. E. Robinson (2003). "Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees" **Science** 302 (5643): 296-9.
- Wilhelm-Leen, E. R., Y. N. Hall, I. H. Deboer and G. M. Chertow (2010). "Vitamin D deficiency and frailty in older Americans" **J Intern Med** 268 (2): 171-80.
- Williams, G. C. (1957). "Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence" **Sci. Aging Knowl.** 11 (4): 13.
- Wong, S. H., J. A. Knight, S. M. Hopfer, O. Zaharia, C. N. Leach, Jr. and F. W. Sunderman, Jr. (1987).

"Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct" **Clin Chem** 33 (2 Pt 1): 214-20.

Woods, N. F., A. Z. LaCroix, S. L. Gray, A. Aragaki, B. B. Cochrane, R. L. Brunner, K. Masaki, A. Murray and A. B. Newman (2005). "Frailty: emergence and consequences in women aged 65 and older in the Women's Health Initiative Observational Study" **J Am Geriatr Soc** 53 (8): 1321-30.

Wu, I. C., S. C. Shiesh, P. H. Kuo and X. Z. Lin (2009). "High oxidative stress is correlated with frailty in elderly chinese" **J Am Geriatr Soc** 57 (9): 1666-71.

Wyss, M. and R. Kaddurah-Daouk (2000). "Creatine and creatinine metabolism" **Physiol Rev** 80 (3): 1107-213.

Yamamoto, Y. and R. B. Gaynor (2001). "Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer" **J Clin Invest** 107 (2): 135-42.

Yan, B., J. A. G. Wang, H. Lu, X. Huang, Y. Liu, W. Zha, H. Hao, Y. Zhang, L. Liu, S. Gu, Q. Huang, Y. Zheng and J. Sun (2009). "Metabolomic investigation into variation of endogenous metabolites in professional athletes subject to strength-endurance training" **J Appl Physiol** 106 (2): 531-8.

Zoladz, J. A. and A. Pilc (2010). "The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies" **J Physiol Pharmacol** 61 (5): 533-41.

## 9. *ANEXOS*



## 9.1 Acrónimos y Abreviaturas

| <b>NOMENCLATURA<br/>(Castellano)</b>         | <b>SÍMBOLO</b>       | <b>NOMENCLATURE<br/>(English)</b>       |
|--|----------------------|---|
| Ascorbato                                    | <b>A<sup>-</sup></b> | Ascorbate                               |
| 8 -hidroxi-2-deoxiGuanosina                  | <b>8-OHdG</b>        | 8 -hydroxy-2-deoxyGuanosine             |
| Aminoácidos                                  | <b>AA</b>            | Amino acids                             |
| Aminoácidos ramificados                      | <b>AAR</b>           | Branched chain amino acids              |
| Actividades avanzadas de la vida diaria      | <b>AAVD</b>          | Advanced activites of daily living      |
| Absorbancia                                  | <b>Abs</b>           | Absrobance                              |
| Actividades básicas de la vida diaria        | <b>ABVD</b>          | Basic activities of daily living        |
| Análisis de Componentes Principales          | <b>ACP - PCA</b>     | Principal Components Analysis           |
| Colegio americano de Medicina del deporte    | <b>ACSM</b>          | American College of Sports Medicine     |
| Adenosín-5´-difosfato                        | <b>ADP</b>           | Adenosin-5´-diphosphate                 |
| Actividades instrumentales de la vida diaria | <b>AIVD</b>          | Instrumental activities of daily living |
| Adenosín-5´-monofosfato                      | <b>AMP</b>           | Adenosin-5´-monophosphate               |
| Análisis de la varianza                      | <b>ANOVA</b>         | Analysis of variance                    |
| Persulfato Amónico                           | <b>APS</b>           | Ammonium persulphate                    |
| Ácido Ribonucleico                           | <b>ARN-RNA</b>       | Ribonucleic acid                        |
| Aspartato amino transferasa                  | <b>AST</b>           | Aspartate aminotransferase              |
| Ácido Tricloroacético                        | <b>ATC / TCA</b>     | Trichloroacetic acid                    |
| Adenosín-5´-trifosfato                       | <b>ATP</b>           | Adenosin-5´-triphosphate                |
| Factor neurotrófico derivado del cerebro     | <b>BDNF</b>          | Brain-derived neurotrophic factor       |
| Ácido batofenantrolindisulfónico             | <b>BPDS</b>          | Bathophenanthroline disulfonic acid     |
| Suero bovino albúmina                        | <b>BSA</b>           | Bovine Serum Albumin                    |
| Cloro dinitrobenceno                         | <b>CDNB</b>          | Chloro Dinitrobenzene                   |
| Estudio de la salud cardiovascular           | <b>CHS</b>           | Cardiovascular health study             |
| Creatin kinasa                               | <b>CK</b>            | Creatin kinase                          |
| Coenzima A                                   | <b>CoA</b>           | Coenzyme A                              |

|   |                   |   |
|---|-------------------|---|
| Citocromo oxidasa   | <b>COX</b>        | Cytochrome oxidase  |
| Citrato sintasa   | <b>CS</b>         | Citrate Syntase   |
| Cuestionario Portátil Breve del Estado Mental /Escala de Pfeiffer         | <b>CSEM/SPMSQ</b> | Short Portable Mental State Questionnaire de Pfeiffer                 |
| Estudio canadiense de salud y envejecimiento                              | <b>CSHA</b>       | Canadian Study of Health and Aging                                    |
| Ciclo Umbral  | <b>Ct</b>         | Threshold cycle   |
| Cu/Zn Superóxido dismutasa  | <b>Cu,Zn-SOD</b>  | Cu/Zn superoxide dismutase  |
| Diethylpirocarbonato  | <b>DEPC</b>       | Diethyl Pyrocarbonate   |
| Absometría radiológica de doble energía                                   | <b>DEXA</b>       | Dual-energy x-ray absorptiometry                                      |
| Dehidroepiandrosterona  | <b>DHEA</b>       | Dehydroepiandrosterone  |
| Dehidroepiandrosterona sulfato  | <b>DHEA-S</b>     | Dehydroepiandrosterone sulfate  |
| Dimetil sulfóxido   | <b>DMSO</b>       | Dimethyl Sulfoxide  |
| Ácido desoxirribonucleico   | <b>DNA</b>        | Deoxyribonucleic acid   |
| DNA mitocondrial  | <b>DNAm</b>       | Mitochondrial DNA   |
| 2,4-dinitrofenilhidrazina   | <b>DNPH</b>       | 2 4-dinitrophenylhydrazine  |
| Desoxinucleótidos   | <b>dNTPs</b>      | Deoxynucleotides  |
| Desoxicolato  | <b>DOC</b>        | Deoxycholate  |
| Encuesta de Discapacidad, Autonomía personal y situaciones de Dependencia | <b>EDAD</b>       | Survey on disability, personal independence and dependence situations |
| Encuesta sobre Discapacidad, Deficiencias y Minusvalías                   | <b>EDDM</b>       | Survey on disability, deficiencies and handicaps                      |
| Encuesta sobre Discapacidad, Deficiencias y Estado de Salud               | <b>EDDS</b>       | Survey on disability, deficiencies and state of health                |
| Ácido etilendiaminetetraacético   | <b>EDTA</b>       | Ethylenediaminetetraacetic acid                                       |
| Etileno glico-bis (aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetracético            | <b>EGTA</b>       | Ethylene glycol tetraacetic acid                                      |
| Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas                               | <b>ELISA</b>      | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay                                     |
| Estudio Toledo para un Envejecimiento Saludable                           | <b>ETES</b>       | Toledo study for healthy aging  |
| Flavín adenín dinucleótido  | <b>FAD</b>        | Flavin adenine dinucleotide   |
| 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno   | <b>FDNB</b>       | 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene   |

| Federación de asociaciones científicas europeas de animales de laboratorio | <b>FELASA</b>   | <b>Federation of European laboratory animal science associations</b> |
|--|-----------------|--|
| Fe Superóxido dismutasa  | <b>Fe-SOD</b>   | Fe superoxide dismutase  |
| Caída libre de inducción   | <b>FID</b>      | Free induction decay   |
| Gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa                                     | <b>GAPDH</b>    | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase                             |
| Glutámico-oxalacético-transaminasa   | <b>GOT</b>      | Glutamic oxaloacetic transaminase                                    |
| Glutación peroxidasa   | <b>GPx</b>      | Glutathione peroxidase   |
| Glutación Disulfuro Reductasa  | <b>GR</b>       | Glutathione disulfide reductase                                      |
| Glutación reducido   | <b>GSH</b>      | Reduced Glutathione  |
| Glutación oxidado  | <b>GSSG</b>     | Oxidized glutathione   |
| Acido 4-(2- Hidroxietil)-1-Pireraciniil-Etanosulfónico                     | <b>HEPES</b>    | 4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic acid                   |
| 4-hidroxi-2,3-nonenal  | <b>HNE</b>      | 4-hydroxi-2,3-nonenal  |
| Cromatografía líquida de alta resolución                                   | <b>HPLC</b>     | High-performance liquid chromatography                               |
| Factor de crecimiento insulínico tipo 1                                    | <b>IGF-1</b>    | Insulin-like growth factor 1   |
| Interleuquina- 10  | <b>IL-10</b>    | Interleukine-10  |
| Interleuquina- 4   | <b>IL-4</b>     | Interleukine-4   |
| Interleuquina- 6   | <b>IL-6</b>     | Interleukine-6   |
| Instituto de investigación de animales de laboratorio                      | <b>ILAR</b>     | Institute for Laboratory Animal Research                             |
| Índice de masa corporal  | <b>IMC -BMI</b> | Body Mass Index  |
| Instituto Nacional de Estadística  | <b>INE</b>      | National Statistics Institute  |
| Lactato deshidrogenasa   | <b>LDH</b>      | Lactate dehydrogenase  |
| Lipoproteínas de baja densidad   | <b>LDL</b>      | Low density lipoprotein  |
| Proteínquinas activadas por mitógenos                                      | <b>MAPK</b>     | Mitogen-activated protein kinase                                     |
| Malondialdehído  | <b>MDA</b>      | Malondialdehyde  |
| Mini-examen del estado mental  | <b>MMSE</b>     | Mini-mental state examination  |
| Manganeso superóxido dismutasa   | <b>MnSOD</b>    | Manganese Superoxide Dismutase                                       |
| Transcriptasa reversa MultiScribe™   | <b>MsRT</b>     | MultiScribe™ Reverse Transcriptase                                   |
| Nicotinamida adenina dinucleótido  | <b>NADH</b>     | Reduced Nicotine Adenine Dinucleotide                                |

|  |                                 |  |
|--|---------------------------------|--|
| Nicotiamida adenín dinucleótido fosfato oxidado  | <b>NADP<sup>+</sup></b>         | Oxidized Nicotine Adenine Dinucleotide Phosphate                     |
| Nicotiamida adenín dinucleótido fosfato reducido   | <b>NADPH</b>                    | Reduced Nicotine Adenine Dinucleotide Phosphate                      |
| N-etilmaleimida  | <b>NEM</b>                      | N-ethylmaleimide   |
| Facto nuclear kappa B  | <b>NFkB</b>                     | Nuclear factor kappa B   |
| Factor de crecimiento nervioso   | <b>NGF</b>                      | Nerve growth factor  |
| Resonancia magnética nuclear   | <b>NMR</b>                      | Nuclear Magnetic Resonance   |
| Óxido nítrico sintasa  | <b>NOS</b>                      | Nitric oxide synthase  |
| Factor de respiración nuclear 1  | <b>NRF-1</b>                    | Nuclear respiratory factor 1   |
| Neurotrofina 4/5   | <b>NT- 4/5</b>                  | Neurotrophin-4/5   |
| Neurotrofina-3   | <b>NT-3</b>                     | Neurotrophin-3   |
| Escala de recursos Sociales  | <b>OARS</b>                     | Social Resource Scale  |
| Organización mundial de la salud   | <b>OMS</b>                      | World Health Organization  |
| Óxidoreductasa   | <b>OR</b>                       | Oxidoreductase   |
| Escala de Actividad Física para la Tercera Edad  | <b>PASE</b>                     | Physical activity scale for the elderly                              |
| Fosfato tampón salino  | <b>PBS</b>                      | Phosphate buffered <i>saline</i>                                     |
| Tampón fosfato salino-Tween  | <b>PBS-T</b>                    | Phosphate buffered saline_Tween                                      |
| Ácido perclórico   | <b>PCA</b>                      | Perchloric acid  |
| Proteína C reactiva  | <b>PCR-CRP</b>                  | C-reactive protein   |
| Coactivador-1 $\alpha$ del receptor- $\gamma$ activado por proliferación del peroxisoma, PPAR $\gamma$ | <b>PGC-1<math>\alpha</math></b> | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha |
| Polifluoruro de vinilideno o Fluoruro de polivinilideno  | <b>PVDF</b>                     | Polivinil Difluoride   |
| Red temática de investigación en envejecimiento y fragilidad   | <b>RETICEF</b>                  | Network for research in aging and frailty                            |
| Resonancia magnetica cluclear  | <b>RMN - NMR</b>                | Nuclear magnetic resonance   |
| Ácido Ribonucleico mensajero   | <b>mRNA</b>                     | Messenger RNA  |
| Ribonucleasa   | <b>RNAsas</b>                   | Ribonuclease   |
| Especies reactivas de nitrógeno  | <b>RNS</b>                      | Reactive nitrogen species  |
| Retrotranscripción   | <b>RT</b>                       | Retrotranscription   |
| Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa   | <b>RT-PCR</b>                   | Reverse transcription polymerase chain reaction                      |
| Desviación típica  | <b>SD</b>                       | Standard deviation   |
| Sodio dodecil sulfato  | <b>SDS</b>                      | sodium dodecyl sulfate   |



|  |                                    |   |
|--|------------------------------------|---|
| Sociedad española de geriatría y gerontología    | <b>SEGG</b>                        | Spanish Society for Geriatrics and Gerontology    |
| Sociedad española de medicina geriátrica         | <b>SEMEG</b>                       | Spanish Society for Geriatric Medicine            |
| Servicio de salud de Castilla la Mancha          | <b>SESCAM</b>                      | Castilla la Mancha Health Service                 |
| Polimorfismo de nucleótido simple                | <b>SNPs</b>                        | Single Nucleotide Polymorphism                    |
| Superóxido dismutasa                             | <b>SOD</b>                         | Superoxide dismutase                              |
| Zona libre de patógenos                          | <b>SPF</b>                         | Space patogenous free                             |
| Paquete estadístico para las Ciencias Sociales   | <b>SPSS</b>                        | Statistical Package for the Social Sciences       |
| Ácido tiobarbitúrico                             | <b>TBA</b>                         | <i>Thio-barbituric acid</i>                       |
| Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico     | <b>TBARS</b>                       | Thiobarbituric acid reactive substances           |
| Tris tampón salino                               | <b>TBS</b>                         | Tris buffered saline                              |
| Tris Tampón salino con tween                     | <b>TBS-T</b>                       | Tris buffered saline-tween                        |
| Ácido tricloroacético                            | <b>TCA</b>                         | Trichloroacetic acid                              |
| N,N,N,N'-tetrametilnetilenodiamina               | <b>TEMED</b>                       | Tetramethylethylenediamine                        |
| Factor de transcripción mitochondrial A          | <b>Tfam</b>                        | Mitochondrial transcription factor A              |
| 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina                    | <b>TMB</b>                         | 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine                    |
| Factor de Necrosis tumoral $\alpha$              | <b>TNF-<math>\alpha</math></b>     | Tumor necrosis factor-alpha                       |
| 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol         | <b>TRIS</b>                        | Tris(hidroximetil)aminometano                     |
| Receptor tirosin kinasa A,B,C (TrkA, TrkB, TrkC) | <b>Trk (A,B,C)</b>                 | Tyrosine kinase receptor A,B,C (TrkA, TrkB, TrkC) |
| Unidades arbitrarias                             | <b>u.a.</b>                        | Arbitrary Units                                   |
| Unidades Internacionales                         | <b>UI</b>                          | International Units                               |
| Volumen/volumen                                  | <b>v/v</b>                         | Volume/ volume                                    |
| Valoración geriátrica integral                   | <b>VGI</b>                         | Integral geriatric valuation                      |
| Consumo máximo de oxígeno                        | <b>VO<sub>2</sub>máx</b>           | Maximal oxygen uptake                             |
| Xantina oxidasa                                  | <b>XO</b>                          | Xantine oxidase                                   |
| $\gamma$ -Glutamilglutamato                      | <b><math>\gamma</math>-Glu-Glu</b> | $\gamma$ -Glutamyl-glutamate                      |

## 9.2 Especies Químicas

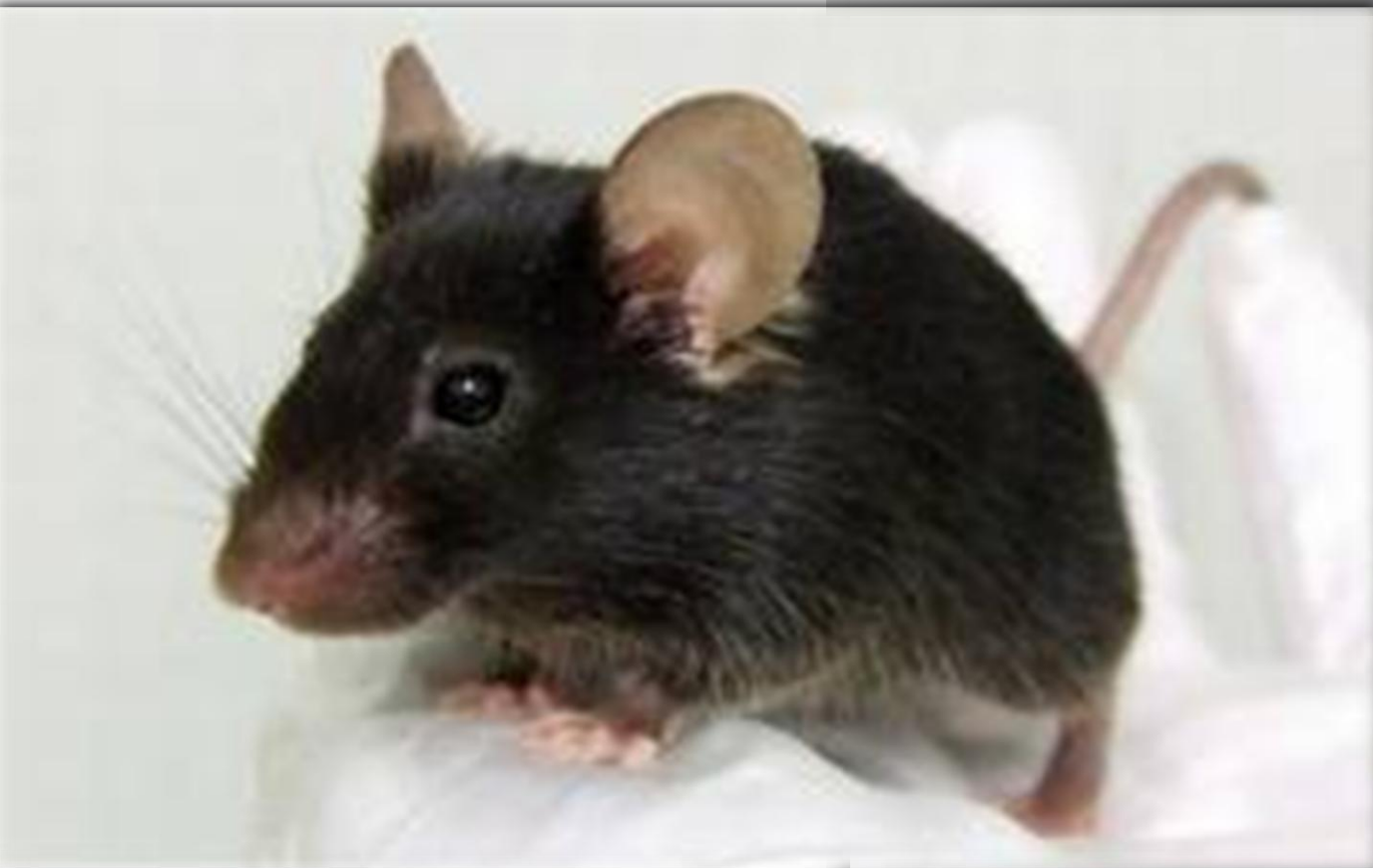
| <b>NOMENCLATURA<br/>(Castellano)</b> | <b>FÓRMULA</b>                      | <b>NOMENCLATURE<br/>(English)</b> |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Calcio                               | <b>Ca</b>                           | Calcium                           |
| Agua                                 | <b>H<sub>2</sub>O</b>               | Water                             |
| Peróxido de hidrógeno                | <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>   | Hydrogen Peroxide                 |
| Ácido clorídrico                     | <b>HCl</b>                          | Chloride acid                     |
| Hidrogenofosfato potásico            | <b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | Potassium hydrogen phosphate      |
| Dihidrogenofosfato potásico          | <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | Potassium dihydrogen phosphate    |
| Fluoruro de Sodio                    | <b>NaF</b>                          | Sodium fluoride                   |
| Bicarbonato sódico                   | <b>NaHCO<sub>3</sub></b>            | Sodium bicarbonate                |
| Hidróxido de sodio                   | <b>NaOH</b>                         | Sodium hydroxide                  |
| Óxido nítrico                        | <b>NO·</b>                          | Nitric oxide                      |
| Dióxido de nitrógeno                 | <b>NO<sub>2</sub>·</b>              | Nitric dioxide                    |
| Oxígeno singlete                     | <b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>    | Singlet oxygen                    |
| Anión superóxido                     | <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>    | Superoxide anion                  |
| Peroxinitrito                        | <b>ONOO<sup>-</sup></b>             | peroxynitrite                     |
| Radical Hidroxilo                    | <b>OH·</b>                          | hydroxyl radical                  |
| Radical Peroxinitrilo                | <b>ONNOO·</b>                       | Peroxynitryl Radical              |
| Radical carboxilo                    | <b>R-COO●</b>                       | Carboxyl Radical                  |
| Radical Alcóxilo                     | <b>RO·</b>                          | Alkoxy Radical                    |
| Alcohol                              | <b>ROH</b>                          | Alcohol                           |
| Radical Peróxilo                     | <b>ROO·</b>                         | Peroxyl Radical                   |
| Hidroperóxido                        | <b>ROOH</b>                         | Hydroperoxide                     |
| Especies Reactivas de Oxígeno        | <b>ROS</b>                          | Reactive oxygen species           |
| Radical hidroxilo                    | <b>HO·</b>                          | Hydroxyl radical                  |
| Cobre                                | <b>Cu</b>                           | Copper                            |
| Zinc                                 | <b>Zn</b>                           | Zinc                              |
| Hierro                               | <b>Fe</b>                           | Iron                              |

### 9.3 Magnitudes Físicas y Unidades de medida

| <b>Magnitud<br/>(Castellano)</b>  | <b>Magnitude<br/>(English)</b>  | <b>FÓRMULA</b> | <b>Unidades<br/>utilizadas en la<br/>Tesis</b>                  |
|---|---|----------------|---|
| Longitud de Onda  | Wavelength  | $\lambda$      | Nanómetros(nm)  |
| Energía   | Energy  | E              | Kilocalorías<br>(Kcal)  |
| Peso molecular  | Molecular<br>Weight   | PM             | Kilodaltons<br>(KDa)  |
| Concentración   | Concentration   | [ ]            | Milimolar<br>(mM)   |
| Masa  | Mass  | m              | Nanomolar<br>(nM)   |
| Masa  | Mass  | m              | Kilogramos<br>(Kg)  |
| Masa  | Mass  | m              | Gramos<br>(g)   |
| Masa  | Mass  | m              | Miligramos<br>(mg)  |
| Masa  | Mass  | m              | Picogramos<br>(pg)  |
| Velocidad angular   | Rotational speed  | $\omega$       | rpm<br>(Revoluciones por<br>minuto / Revolutions<br>per minute) |
| Fuerza Centrifuga<br>Relativa (FCR)   | Relative<br>Centrifugal<br>Force (RCF)                                    | g              | Gravedades<br>(g)   |
| Potencia  | Potence   | Wattios<br>(W) | Wattios<br>(W)  |
| Consumo de oxígeno,<br>en un adulto, de<br>aproximadamente 3,5<br>mL por Kg de peso y<br>por minuto o 1kcal por<br>Kg y por hora. | Metabolic<br>equivalent tasks<br>/The standard<br>metabolic<br>equivalent | Kcal/kg*h      | 1 MET   |



# **EFFECT OF SPONTANEOUS EXERCISE IN LONGEVITY AND FRAILITY IN C57BL/6J MICE.**



Presented by:

**Rebeca García Vallés**



Directed by:

**Prof. D. José Viña Ribes**

**Prof. Dña. Mari Carmen  
Gómez Cabrera**

Valencia, 2013