



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Fisiología

Programa de Doctorado en Fisiología

**IMPACTO DEL EJERCICIO FÍSICO A LARGO PLAZO
EN LA NEUROPROTECCIÓN DE SUJETOS DE
MEDIANA EDAD: ESTUDIO DE LOS MECANISMOS
MOLECULARES INVOLUCRADOS**

TESIS DOCTORAL presentada por:

Adrián Marcel De la Rosa González

Supervisada por:

Prof. D. José Viña Ribes

Prof. Dña. Mari Carmen Gómez Cabrera

Prof. Dña. Coral Sanfeliu Pujol

—Valencia, abril de 2020—

Prof. D. **José Viña Ribes**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València

Prof. Dña. **Mari Carmen Gómez Cabrera**, Catedrática del Departamento de Fisiología de la Universitat de València

Prof. Dña. **Coral Sanfeliu Pujol**, Investigadora científica del CSIC, Instituto de investigaciones Biomédicas de Barcelona.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “**Impacto del ejercicio físico a largo plazo en la neuroprotección de sujetos de mediana edad: Estudio de los mecanismos moleculares involucrados**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. **Adrián Marcel De la Rosa González**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 10 de abril de 2020.



Fdo. D. J. Viña.



Fdo. Dña. M.C. Gómez Cabrera



Fdo. Dña. Coral Sanfeliu Pujol

*La ciencia es como una persona caprichosa
a la que hay que dedicar tiempo y conquistar cada día.
Si lo haces, no tengas dudas de que te dará muchas
alegrías.*

ADRIÁN DE LA ROSA G.

AGRADECIMIENTOS

Al lector, quiero decirle que acaba de llegar al apartado más importante de este libro. Tal vez no para la ciencia, pero sí para quien lo escribe. Sin duda ha sido la sección más difícil de escribir. No porque faltaran los motivos, sino porque no quería fallar en usar palabras que no fueran las precisas.

En esta sección dejaré de lado lo molecular para permitirle, a usted, conocer, a grandes rasgos a algunas de las personas que me ayudaron para que este sueño se materializara. Eso sí, tenga presente que el orden en el que me refiero a las personas aquí, no es ni jerárquico, ni afectivo, ni mucho menos de conveniencia.

Al final de esta sección usted podrá entender que hacer un Doctorado no es nada difícil, si ha estado rodeado de las personas correctas, y el coronavirus no ha hecho que cierren la facultad 15 días antes de depositar la tesis.

Ahora si, como dijo Andrea: “Al toro”

De ti no solo recuerdo esos dichos particulares, Andrea. Recuerdo que fuiste la primera persona de la que tuve que aprender lo experimental y a cómo “moverme” en el laboratorio. Fuiste alguien muy importante en este largo proceso, y por eso te agradezco la nobleza, paciencia y el

cariño al momento de enseñarme. Te deseo muchos éxitos en Berkeley junto a Brooks y felicidad junto a Jose. Aun no sé cómo puedes hacer para vivir sin WhatsApp, Facebook ni “*followers*” en Instagram.

A ti, Mari Carmen, quiero darte gracias por recibirme en tu grupo de investigación y “enseñarme a pensar”. Porque siempre recibiste bien mis preguntas, mis dudas y mis propuestas sin importar el momento del día.

Gracias porque, a pesar de mi inexperiencia en el laboratorio, siempre pusiste en mis manos responsabilidades que en varias oportunidades pensé que serían superiores a mí, pero tú siempre confiaste. Gracias por darme cierta “libertad” para pensar, medir, observar, comprar (mejor en letra pequeña), proponer, experimentar, refutar y, sobre todo, sentir la ciencia.

Gracias por siempre ser tan comprensiva y oportuna. Has sido parte fundamental en este lindo proceso de la tesis y solo espero que, a mi regreso a Colombia, podamos seguir en contacto y ojalá trabajando juntos. Gracias por verme llorar y verme feliz. Gracias porque con tu ejemplo me enseñaste a ser mejor ser humano.

Al Dr. Viña, siempre estaré agradecido por recibirme en el grupo de investigación y enseñarme a que constantemente debemos cuestionarnos sobre los fenómenos de la

fisiología. Eso de que “debemos trabajar en un tema que nos desvele”, lo entendí muy bien en estos cuatro años. Admiro su dedicación a la ciencia y el amor por lo que hace. Siempre recordaré esa frase: “chato, necesito algo más molecular”.

A Coral Sanfeliu, gracias por permitirme hacer parte de este proyecto y orientarme desde el primer momento. Los encuentros por Skype y mi viaje a Barcelona bastaron para darme cuenta de su calidez humana, y su participación en este proyecto fue suficiente para conocer su jerarquía como investigadora.

A María Isabel Blanch de S...XD, la mejor secretaria de todas las facultades de medicina de España, con promedio de almuerzo diario de 57 minutos, gracias por tu alegría, tu ayuda desinteresada e incondicional y, sobretodo, tu amistad. Valoro mucho cada una de las cosas que hiciste por mí, y solo espero que no pase mucho tiempo antes de que nos volvamos a ver, porque te extrañaré mucho. Tu amistad es de las cosas más lindas que me llevo de Valencia.

A Eva Serna, gracias por tu amistad y nuestras conversaciones sobre endotelio (suena como a un señor de la tercera edad). Gracias por el tiempo que siempre has dedicado para responder cada una de mis preguntas

moleculares, sin importar que poco tiempo después te las vuelva a hacer. Esta educación física....

A Ana y Eva, las veterinarias, gracias por su valiosa ayuda y enseñanzas durante mis experimentos con ratones. Ana, gracias por facilitarme el trabajo en el animalario, y siempre confiar en mí. No tengo dudas de que tu profesionalismo es directamente proporcional a tu carisma y sencillez.

A Gloria, gracias por tu amistad y las enseñanzas durante las reuniones de grupo. Eres de esas personas que siempre da gusto tener al lado, no solo por tu capacidad intelectual y todo lo que de ti se puede aprender, sino por tu calidez humana y tu prudencia.

A Lucía, gracias por tus enseñanzas, tu sonrisa de siempre tanto el lunes como el viernes, tus tartas inigualables y tu linda amistad. Hubiéramos podido ser una bonita pareja, pero seguro que las palomas de tu padre me dan alergia.

A Cristina, la chata, gracias por tu amistad, enseñanzas, días de fiesta y consejos en aquellos momentos que los necesité. Eres una gran trabajadora, y no tengo la menor duda de que tendrás una gran carrera en la ciencia.

A Jorge, quiero agradecerte las largas jornadas que de forma desinteresada pasaste junto a mí, mientras me ayudabas a sembrar los islotes en el "seahorse". Gracias, también, por compartir conmigo tantos momentos de

análisis, reflexión y razonamiento sobre la fisiología. Aunque encontrar respuestas a los fenómenos fisiológicos siempre llena de alegría, creo que generar más preguntas es lo que nos apasiona. Gracias por ayudar a transversalizar el conocimiento.

A Fercho, gracias por tu amistad, tus chistes flojos, la risa, tu tortilla de patata, las idas al Mestalla y las reflexiones políticas, científicas y deportivas en nuestros almuerzos y comidas interminables. Gracias por tu apoyo durante los días difíciles, porque es ahí cuando se conocen los amigos. Estoy seguro de que contigo, aquí he hecho un amigo de por vida.

A Elisa, muchas gracias siempre por tu amistad, tu sonrisa y por acoger a Fernando. La vida te sabrá recompensar este sacrificio. Están invitadísimos a Colombia.

A Dani, mi hermano de torrellano, gracias por hacerme un hueco en tu casa cuando lo necesité. Gracias por dejar de hacer tus cosas por un momento, para atender a mis dudas y preguntas científicas. Eres un gran científico y una gran persona, por lo que no tengo la menor duda de que serás un referente en tu área. ¿Cuál era? Te quiero mucho, y espero que esta amistad perdure por siempre. Cuídate la sarcopenia, por favor.

A Aitor, mi zenzei, el embajador español de chupachups y el químico del grupo, gracias por todos los favores moleculares, medio moleculares y no moleculares que me hiciste en estos años. Es difícil encontrar personas tan buenas como tú en el plano laboral y personal, que además siempre estén dispuestas a ayudar a esta “raza inferior” de educadores físicos con cosas tan complicadas como las diluciones $1/3$ y $1/5$, o la forma tan compleja de determinar una molaridad.

A María del Mar, la predoc más sexy de la universidad de Valencia, gracias por recordarme el uso de la bata cuando esporádicamente lo olvidé, y motivarme a arreglar mi desorden cuando ocasionalmente lo formé. Recuerda que siempre va a ser un buen día para la ciencia.

A Aurora, gracias por tu amistad y por regalarme siempre tantos actos de sinceridad y espontaneidad con los que me reí, y a veces me identifiqué, un montón. Recuerda que las verduras son importantes...

A Esther, gracias por permitirme conocerte y compartir tantos pensamientos similares contigo en cuanto a religión, ciencia, y ejercicio. Te admiro bastante tanto por tu capacidad de reflexión y tu intelecto, como por esa habilidad única que tienes de girar la cabeza de repente, y darle en la cara al que tienes al lado con tus 8 kg de pelo. Creo que con profesionales como tú va a estar garantizada

la educación de calidad para los futuros estudiantes de FCAFE. Echaré de menos nuestras largas conversaciones, nuestros juegos de vóley y tu risa de 100 decibeles.

A Elena y Saúl, mis compañeros de piso, gracias por haber compartido conmigo mi último año de Doctorado. Me han hecho sentir como en casa y eso lo valoro demasiado. A Elena, gracias por enseñarme esa parte tan importante de la cultura española que no se cuenta en los libros, pero que gracias a personas como tú hoy sigue intacta, y de seguro perdurará en el tiempo. Claro, hablo de enseñarme quiénes son la Pantoja y Chavelita, y de hablarme del “sálvame” y “supervivientes”. Te quiero un montón, y sé que siempre voy a tener un espacio en tu casa. A Saúl, el chef de la casa, gracias por tenerme paciencia en la cocina y ayudarme a levantar mi nivel culinario, pese a que Elena nunca me lo reconoció. Te deseo muchos éxitos en tu vida aquí en España, y espero que algún día podamos volver a viajar juntos (ahí vamos viendo si le contamos a Elena). Te quiero, bro...

A Rachel Blot, gracias por estos casi 5 años de bonita amistad, desde el máster, y por aguantar mis tonterías. Me pone triste el saber que ya no veré tu cara después 3 Turias y un chupito.

A Ángela, joder, tío macho, quiero decirte que te admiro por tu inteligencia, capacidad de trabajo y compromiso con la

ciencia. Estás hecha para esto, aunque el otro día varios ratones me dijeron lo contrario después del test de insulina. Gracias por tu linda amistad, y por nunca enfadarte con mis tonterías. Ya me contarás qué pasa con Pablo.

A tortuga y Paloma, gracias por la amistad y enseñanzas de neurología y estadística, respectivamente. Las dos son unas cracks.

A Martha, gracias por el cariño y el afecto que siempre me demostraste. Juan se ganó la lotería contigo. Espero verte algún día en Colombia.

A Coralie, mi compañera de bancada durante estos últimos 3 años, pero además mi compañera de viajes, running, series, cocina y mi compañera sentimental, gracias por tu apoyo incondicional en los momentos que más lo necesité. Porque cuando creí que no podía, tú estuviste ahí con tus palabras de aliento: “no pasa nada, todo va a estar bien”.

Gracias porque, aunque soy tu antítesis, siempre has sido comprensiva y te has llenado de paciencia con mis pequeños defectos. Esos que para otros son grandes, pero que tú no los ves así. Gracias porque me has ayudado a sacar lo mejor de mí en cada carrera, en cada experimento y en cada momento de esta aventura llamada Doctorado. Gracias por brindarme tu tiempo y permitirme entender que el corazón no sabe de costumbres ni idiomas, y el

estómago no distingue entre la soja y el pollo cuando está enamorado.

Gracias por llenar mis momentos de alegría y mi estómago de tartas. Creo que Dios ha sido muy bueno conmigo por ponerte en mi camino, y a ti te está poniendo a prueba. Te quiero un montón.

A mi madre y mi hermana quiero dedicarles este pequeño triunfo. Quiero darles las gracias por ser mi sostén a la distancia, y por confiar en este hombre que se olvida de todo, menos de donde viene. Las quiero demasiado.

A Dios le agradezco la oportunidad de reinventarme cada día de estos cuatro años, y regalarme la oportunidad de conocer y compartir con gente maravillosa a diez mil kilómetros de distancia de mi hogar, pero sobre todo por hacerme feliz. Gracias porque vi el cumplimiento de varias de tus promesas, y porque entendí que tu acento es el mismo en Colombia que España. Gracias por enseñarme a ser feliz con poco, y ahora con mucho.

Día 6 de la cuarentena... parece que por fin he terminado la tesis.

RESUMEN

Introducción: El ejercicio físico es un agente modulador de cambios relacionados con la salud en el ser humano, que participa en el mantenimiento de ésta y en la prevención de distintas enfermedades. A causa de esto, cada vez más se utiliza como herramienta para prevenir y tratar diferentes patologías.

En la actualidad hay amplia evidencia que indica que la práctica de ejercicio físico, de manera regular, mejora la salud y reduce el riesgo de enfermedades relacionadas con la edad. Así mismo, ha sido establecida la relación inversa entre una vida físicamente activa y el riesgo de sufrir decline cognitivo, siendo la inactividad física uno de los principales factores de riesgo para padecer Alzheimer, lo que a su vez indica que podría ser prevenido.

Aunque los mecanismos exactos por los cuales el ejercicio físico tiene efectos positivos a nivel cognitivo no se conocen completamente, se sabe que la síntesis y la liberación de factores neurotróficos y citocinas, a nivel cerebral y periférico, juegan un papel importante en la activación de las vías de señalización encargadas de regular la cognición.

Entre los factores tróficos y biomarcadores relacionados con la función cognitiva, el factor neurotrófico derivado del

cerebro (BDNF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la Catepsina B (CTSB) y las sirtuínas (SIRT1, SIRT2, SIRT3 y SIRT6) han sido medidos en la presente tesis. Estos factores juegan un papel importante en distintos procesos relacionados con la neurogénesis hipocampal, sinaptogénesis, mantenimiento y diferenciación neuronal, axogénesis, dendrogénesis y angiogénesis, lo que a su vez permite que sean potenciadoras de eventos complejos como el aprendizaje, la memoria y la plasticidad cerebral.

Objetivos: Nuestro objetivo principal fue determinar si la práctica, a largo plazo (35 ± 15 años), de un deporte de equipo como el rugby promueve el mantenimiento de la memoria en hombres de mediana edad. De igual forma, quisimos caracterizar los cambios en los factores tróficos y marcadores de inflamación, defensa antioxidante y daño oxidativo a nivel periférico, en sujetos sedentarios y activos, tanto jóvenes como de mediana edad.

Metodología: Inicialmente reclutamos 60 voluntarios sanos entre 17 y 68 años de edad. Los sujetos fueron asignados a tres grupos diferentes: **MSG** [Middle-Aged Sedentary Group (Grupo sedentario de mediana edad), entre 47 y 67 años de edad; $n = 25$]; **MTG** [Middle-Aged Trained Group (Grupo Entrenado de Mediana edad), entre 46 y 68 años de edad; $n = 24$] y **YSG** [Young Sedentary

Group (Grupo Sedentario Joven), entre 17 y 21 años de edad; n = 21]. Sin embargo, tras los análisis de expresión génica decidimos reclutar un cuarto grupo que pensamos podría aportar información relevante, para compararla con los demás grupos experimentales: **YTG** [Young Trained Group (Grupo Entrenado Joven), entre 18 y 25 años de edad; n = 16]. Los años de educación, el hábito tabáquico y la hiperglicemia fueron considerados al momento del reclutamiento para controlar el sesgo entre los grupos entrenados y sedentarios.

Todos los participantes en el MTG eran jugadores de rugby aficionados que lo habían estado practicando durante 35 ± 15 años, mientras que los sujetos de YTG se ejercitaron regularmente durante los últimos siete años, aunque la frecuencia, duración e intensidad de su ejercicio fueron variadas. Los deportes practicados por el YTG incluyeron tenis, atletismo, fútbol y/o taekwondo.

Resultados: El análisis neuropsicológico mostró mejoras significativas en la memoria a través de las pruebas de Recuerdo Inmediato Libre y Facilitado, en MTG en comparación MSG.

A nivel de expresión génica encontramos mayores niveles de las enzimas Catalasa y SOD1, así como de SIRT1 y SIRT3 en MTG respecto a MSG. De igual forma, MTG

presento menor expresión de la citocina pro-inflamatoria IL-6 que MSG y YSG.

Por otra parte, encontramos menores niveles séricos de BDNF y plasmáticos de CTSB, en reposo, en los grupos entrenados respecto a los sedentarios. Los niveles de BDNF y CTSB se correlacionaron inversamente con las horas semanales de ejercicio físico ($r = -0.32$; $p < 0.05$ y $r = -0.41$; $p < 0.01$, respectivamente). También encontramos menores niveles de peroxidación lipídica en los grupos MTG y YTG respecto a MSG y YSG.

Conclusiones: El ejercicio físico a largo plazo tiene un impacto positivo en sujetos de mediana edad, al retrasar el inicio de la pérdida de memoria fisiológica y modular al alza la expresión de genes asociados con la defensa antioxidante endógena, el envejecimiento y la inflamación, a nivel periférico. De igual forma, tanto en la mediana edad como en la edad joven, la práctica regular de ejercicio físico modifica los niveles periféricos basales de BDNF y CTSB y protege contra el daño oxidativo, lo cual sugiere la efectividad del ejercicio como estrategia preventiva contra la pérdida de memoria relacionada con la edad y la mejora del estado redox.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. EJERCICIO FÍSICO Y SALUD.....	13
1.2. FUNCIÓN COGNITIVA	14
1.2.1. Enfermedad de Alzheimer	15
1.2.2. Fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer	17
1.2.3. Ejercicio físico y función cognitiva.....	20
1.2.4. Flujo sanguíneo cerebral y ejercicio físico	24
1.2.5. β -amiloide, proteína Tau y ejercicio	29
1.2.6. Inflamación y ejercicio.....	31
1.3. PROTEÍNAS MODULADORAS DE LA FUNCIÓN COGNITIVA	35
1.3.1. Sirtuínas (SIRT)	35
1.3.1.1. SIRT1	38

1.3.1.2. SIRT3	40
1.3.2. Catepsina B	44
1.3.3. Factores neurotróficos (FNs)	45
1.3.3.1. Neurotrofinas (NTs)	49
1.3.3.2. BDNF	50
1.3.4. Receptores de neurotrofinas.....	53
1.3.4.1. Receptores Trk	53
1.3.4.2. Receptor p75	56
1.4. BDNF, FUNCIÓN COGNITIVA Y EJERCICIO FÍSICO	57
1.5. ESTRÉS OXIDATIVO	61
1.5.1. Definición	61
1.5.2. Moléculas pro-oxidantes	62
1.5.2.1. Radicales libres	62
1.5.2.2. Clasificación desde el punto de vista bioquímico	63
1.5.2.3. Fuentes de producción de radicales libres	65
1.5.3. Daño oxidativo a macromoléculas y ácidos nucleicos.....	68

1.5.3.1. Lípidos	68
1.5.3.2. Proteínas	69
1.5.3.3. Carbohidratos	70
1.5.3.4. Ácidos nucleicos	71
1.5.4. Sistemas de defensa antioxidante	72
1.5.4.1. Antioxidantes enzimáticos.	73
2. OBJETIVOS	77
2.1. OBJETIVO GENERAL	79
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	79
3. MATERIALES Y MÉTODOS	81
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y PARTICIPANTES.....	83
3.1.1. Características de los participantes	83
3.1.2. Recogida de información y criterios de exclusión de los participantes	87
3.1.3. Comité ético.....	88
3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	88
3.2.1. Obtención de plasma sanguíneo	89
3.2.2. Obtención de suero sanguíneo	89

3.2.3. Obtención de sangre para ARN	90
3.2.4. Obtención de sangre para ADN	90
3.3. CUESTIONARIOS DE ACTIVIDAD FÍSICA Y ESTILO DE VIDA	91
3.4. TEST NEUROPSICOLÓGICOS.....	93
3.5. CUESTIONARIOS PSICOLÓGICOS	97
3.6. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS....	99
3.6.1. Extracción y análisis del ARN	99
3.6.2. Extracción y análisis del ADN	102
3.6.3. Determinación de BDNF por ELISA.....	102
3.6.4. Determinación de Catepsina B por ELISA	106
3.6.5. Determinación de IL1 β por ELISA	109
3.6.6. Cuantificación de proteínas por el método Lowry	112
3.6.7. Determinación de los niveles de Malondialdehído (MDA) por HPLC	115
3.6.8. Determinación de los niveles de proteínas carboniladas por Western blotting	117
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	121

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	125
4.1. EXPRESIÓN DE GENES EN SANGRE TOTAL .	127
4.1.1. Expresión de genes y factores de transcripción relacionados con la función cognitiva, la plasticidad y el trofismo neuronal	127
4.1.2. Expresión génica de sirtuínas	131
4.1.3. Expresión de genes antioxidantes	137
4.1.4 Expresión de genes relacionados con la inflamación, y concentración de IL1 β	143
4.2. CARACTERIZACIÓN NEUROPSICOLÓGICA ...	146
4.3. CORRELACIONES ESTADÍSTICAS	149
4.4. EL ENTRENAMIENTO FÍSICO A LARGO PLAZO SE ASOCIA CON MEJOR FUNCIÓN DE LA MEMORIA EN JUGADORES DE RUGBY DE MEDIANA EDAD .	160
4.5. EL ENTRENAMIENTO FÍSICO A LARGO PLAZO DISMINUYE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN PLASMA EN LOS GRUPOS ENTRENADOS JOVEN Y DE MEDIANA EDAD.....	166
4.6. LOS NIVELES SÉRICOS EN REPOSO DE BDNF SON MODULADOS TANTO POR UN PROLONGADO	

PERÍODO DE ENTRENAMIENTO FÍSICO, COMO POR LA EDAD EN HUMANOS	170
4.7. LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CATEPSINA B SON MODULADOS POR UN PERÍODO PROLONGADO DE ENTRENAMIENTO FÍSICO EN SUJETOS JÓVENES Y DE MEDIANA EDAD	180
5. CONCLUSIONES.....	185
6. REFERENCIAS	189
7. ANEXOS	239
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y CAPÍTULOS DE LIBRO DEL DOCTORANDO.....	241

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína kinasa B
AMPK	Proteína kinasa activada por AMP
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Aβ	Beta amiloide
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Albúmina de suero bovino
CANTAB	Batería automatizada de evaluación neuropsicológica de Cambridge
CAT	Catalasa
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP
CTSB	Catepsina B
Cu/ZnSOD	Superóxido Dismutasa dependiente de cobre y zinc (SOD1)
EA	Enfermedad de Alzheimer
EF	Ejercicio Físico

ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK	Kinasa regulada por señal extracelular
FCSRT	Prueba de recuerdo selectivo libre y facilitado (Free and Cued Selective Reminding Test)
FNs	Factores Neurotróficos
GDNF	Factor neurotrófico derivado de las células gliales
GPX	Glutación Peroxidasa
GS	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRP	Peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (insulin-like growth factor 1)

IL6	Interleuquina 6
IMC	Índice de masa corporal
IP3	Inositol trifosfato
IPAQ	Cuestionario internacional de actividad física (International physical activity questionnaire)
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MDA	Malondialdehído
MET	Equivalente metabólico (<i>metabolic equivalent of task</i>)
MLTPAQ	Cuestionario de actividad física en el tiempo libre de Minnesota (Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire)
MnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD2)
MPO	Mieloperoxidas
MSG	Grupo sedentario de mediana edad (Middle-aged Sedentary Group)

MSP	Proteína estimuladora de macrófagos
MTG	Grupo entrenado de mediana edad (Middle-aged Trained Group)
NFE2L2	Factor nuclear relacionado al factor eritroide 2
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NO•	Óxido nítrico
NT3	Neurotrofina 3
NT4/5	Neurotrofina 4 o 5
NTRK2	Receptor de tirosina quinasa tipo B
O•-	radical superóxido
OH•	radical hidroxilo
ONFs	Ovillos neurofibrilares
ONOO-	Peroxinitrito
PAL	Aprendizaje de Asociación Pareada (Paired association learning)
PGC-1α	Coactivador-1 α del receptor activado de proliferación de los peroxisomas gamma
PLCγ	Fosfolipasa C gama

PVDF	Polifluoruro de vinilideno (Polyvinylidene fluoride)
P75NTR	Receptor de baja afinidad para las neurotrofinas
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Quantitative polymerase chain reaction)
RLs	Radicales libres
RPV	Procesamiento Rápido de información Visual (Rapid visual information Processing)
SDS	Dodecilsulfato sódico (Sodium dodecyl sulfate)
SIRT	Sirtuína
SNC	Sistema nervioso central
SWM	Memoria de trabajo espacial (Spatial working memory)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEMED	N, N, N, N'-tetrametilnetilendiamina
TNF	Factor de necrosis tumoral
Trk (A, B C)	Tirosina quinasa tipo A, B o C

VEGF	Factor de crecimiento endothelial vascular (vascular endothelial growth factor)
YSG	Grupo sedentario joven (Young Sedentary Group)
YTG	Grupo entrenado joven (Young Trained Group)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.2. Lista de los principales ERO y ERN	64
Tabla 3.1. Parámetros sociodemográficos y del estado de salud.....	85
Tabla 3.2. Parámetros de Actividad Física	86
Tabla 3.3. Sondas usadas para medir los niveles de ARNm por RT-qPCR.....	100
Tabla 4.1. Pruebas neuropsicológicas.....	147
Tabla 4.2. Batería de pruebas neuropsicológicas automatizada de Cambridge (CANTAB).....	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Proporción de personas con EA en los Estados Unidos por edad, para el año 2020	17
Figura 1.2. FSC por grupos de edad (con intervalo de 5 años), medida mediante MRI	25
Figura 1.3. Esquema de reacciones catalizadas por sirtuinas.....	36
Figura 1.4. SIRT1 modula múltiples vías que ajustan la producción de A β	39
Figura 1.5. Esquema representativo de la acción de SIRT3 a nivel del músculo esquelético.....	42
Figura 1.6. Familia de las neurotrofinas y su interacción con receptores Trk y p75.....	54
Figura 1.7. Transporte retrógado de las neurotrofinas ...	55
Figura 1.8. Formación de Radicales libres y especies reactivas a partir del oxígeno molecular	67
Figura 3.1. Pasos para desarrollar el método ELISA	103
Figura 3.2. Diluciones seriadas a partir de una concentración conocida de BDNF	105

Figura 3.3. Diluciones seriadas a partir de una concentración conocida de Catepsina B	108
Figura 4.1. Expresión de genes relacionados con la función cognitiva, la plasticidad y el trofismo neuronal en sangre periférica de sujetos jóvenes y de mediana edad.....	128
Figura 4.2. Expresión de sirtuínas en sangre periférica de sujetos jóvenes y de mediana edad	133
Figura 4.3. Expresión de genes relacionados con la defensa antioxidante endógena en sangre periférica de sujetos jóvenes y de mediana edad	138
Figura 4.4. Expresión de genes relacionados con la inflamación en sangre periférica, y concentración de IL1 β en plasma de sujetos jóvenes y de mediana edad.....	144
Figura 4.5. <i>Heat map de las correlaciones significativas entre los genes estudiados y distintos parámetros relacionados con la salud y la práctica de actividad física, en MSG, MTG y YSG</i>	150
Figura 4.6. Heat map de las correlaciones significativas entre los genes estudiados y los resultados de las pruebas cognitivas en MSG y MTG.....	153
Figura 4.7. <i>Heat map de las correlaciones significativas entre los parámetros neuropsicológicos evaluados en los</i>	

grupos de mediana edad (MSG y MTG) y aspectos demográficos, de dieta saludable y actividad física obtenidos mediante cuestionarios estandarizados.....156

Figura 4.8. Pruebas de recuerdo selectivo libre y facilitado en sujetos de mediana edad162

Figura 4.9. Daño oxidativo en sujetos jóvenes y de mediana edad. Efecto del entrenamiento físico a largo plazo.....167

Figura 4.10. Niveles séricos de BDNF y su correlación con el malondialdehído y el número de horas semanales de ejercicio físico realizado en sujetos de mediana edad y jóvenes.....172

Figura 4.11. Niveles plasmáticos de Cathepsin B y su correlación con malondialdehído y el número de horas de ejercicio físico semanal, en sujetos jóvenes y de mediana edad.181

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EJERCICIO FÍSICO Y SALUD

La práctica regular de ejercicio físico (EF) genera varios beneficios a nivel sistémico. A nivel muscular induce mejoras en la homeostasis de la glucosa y un aumento en la sensibilidad a la insulina¹⁻⁴, aumenta la capilarización⁵, la biogénesis mitocondrial⁶, la defensa antioxidante endógena^{7,8} y estimula la hipertrofia muscular⁹. Así mismo, genera efectos positivos a nivel cardiovascular a causa de una mejora en la función endotelial¹⁰ y el flujo sanguíneo coronario¹¹. Sus efectos también son positivos en la función cognitiva¹², la composición corporal¹³, el perfil lipídico¹⁴, la inflamación sistémica¹⁵, y la disminución de la pérdida de la densidad mineral ósea propia del envejecimiento¹⁶.

Todo lo anterior indica que el EF es un agente modulador de cambios relacionados con la salud en el ser humano, que participa en el mantenimiento de ésta y en la prevención de distintas enfermedades. A causa de esto, cada vez más se utiliza como mecanismo profiláctico y como herramienta para tratar diferentes patologías. Al respecto, Saltin y Pedersen (2015)¹⁷ revisaron los efectos del EF en 26 enfermedades crónicas de tipo psiquiátrico, neurológico, metabólico, cardiovascular, pulmonar, en trastornos músculo esqueléticos y cáncer, lo cual demuestra que los efectos beneficiosos de la práctica de EF no se circunscriben a un sistema biológico en particular.

1. Introducción

En la presente tesis nos centraremos, principalmente, en abordar algunos de los mecanismos moleculares subyacentes a la práctica de EF de manera regular, que podrían derivar en la mejora de la función cognitiva y la prevención de la sintomatología asociada a la enfermedad de Alzheimer. Para tal fin, empezaremos por dar algunas aproximaciones del significado de la función cognitiva y de la fisiopatología de esta enfermedad.

1.2. FUNCIÓN COGNITIVA

En la actualidad no hay un consenso sobre el significado del término función cognitiva, con lo cual la literatura nos ofrece varias aportaciones como la realizada por Eysenck M (1990)¹⁸, quien la define como “el conjunto de operaciones usadas para el procesamiento de la información por el sistema nervioso central, las cuales incluyen la memoria, la atención, la percepción, la vigilancia, la resolución de problemas, el tiempo de reacción y el tiempo de movimiento”.

Para Benjafiel, Smilek, & Kingstone (2010)¹⁹, la función cognitiva es “el resultado de procesos mentales internos como percibir, recordar, hablar, pensar, tomar decisiones y resolver problemas”.

Más recientemente, Jiawei Zhang (2019)²⁰ definió la función cognitiva como “el conjunto de procesos mentales que nos permite recibir, seleccionar, almacenar transformar, desarrollar y recuperar información procedente de estímulos externos”.

Las aportaciones anteriores nos permiten concluir que cuando hablamos de función cognitiva, implica al sistema nervioso central para el procesamiento de distintos tipos de información, con el objetivo de almacenarla o emitir una respuesta para resolver un problema.

Por otra parte, las funciones ejecutivas son el conjunto de capacidades cognitivas esenciales que están involucradas en la planificación, organización, regulación y monitorización del comportamiento dirigido a realizar la mayor parte de actividades diarias del ser humano. Entre estas capacidades se incluyen la inhibición, la memoria, la atención, la flexibilidad, la planificación y la resolución de problemas^{21,22}.

1.2.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común y una de las patologías neurodegenerativas más frecuentes en personas mayores, constituyendo alrededor del 90% de los casos de demencia en esta

1. Introducción

población. La EA se caracteriza por su irreversibilidad y progresiva pérdida funcional, conductual y cognitiva, generalmente acompañada de distintos trastornos cerebrales como amnesia, agnosia, apraxia y afasia²³⁻²⁵.

En la actualidad, cerca de 24 millones de personas en el mundo padecen de EA y se espera que para el 2050 esta cifra se cuadruplique²⁶. Solo en Estados Unidos hoy ocurre un nuevo caso cada 65 segundos, y para el año 2050 se prevé que haya un enfermo cada 33 segundos²⁷. Estas cifras son alarmantes si se tiene en consideración que para el 2050, se estima que la población mayor de 65 años se triplique con relación a la existente en el 2010, llegando a cerca de 1.5 mil millones de personas²⁸.

Un aumento en el número de personas con EA elevaría de forma considerable el gasto sanitario. Sólo en 2017, el coste anual por atención a un paciente mayor de 65 años con EA, u otro tipo de demencia en Estados Unidos, fue de 48028 \$. Es decir, 3.5 veces más que una persona sin ningún tipo de demencia²⁷.

Hebert y colaboradores (2013)²⁹ estimaron que para el año 2020, en los Estados Unidos, 5.8 millones de personas padecerían de EA, de las cuales el 83% serían de 75 años o mayores, tal como lo indica la figura 1.1

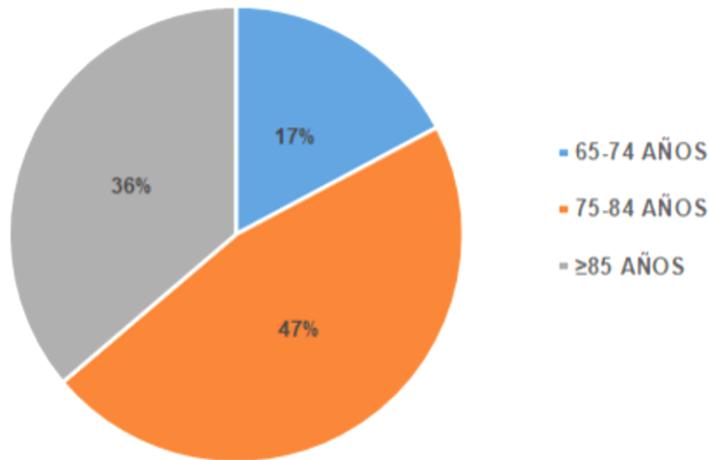


Figura 1.1. Proporción de personas con EA en los Estados Unidos por edad, para el año 2020. Creado a partir de datos de Hebert y colaboradores²⁹.

Varias investigaciones han identificado algunos factores de riesgo asociados a la EA, como: la edad, el bajo nivel educativo, la diabetes, la genética, el grupo étnico, la dieta, lesiones cerebrales previas, trastorno del sueño y bajo nivel de actividad física³⁰⁻³⁸.

1.2.2. Fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer

La EA se caracteriza por la pérdida de sinápsis neuronales y neuronas piramidales acompañada de una neurodegeneración cognitiva progresiva³⁹. Las regiones del cerebro asociadas a las funciones cerebrales más

1. Introducción

complejas como el hipocampo y el neocortex son las más afectadas.

Aunque son varias las hipótesis que se manejan para dar explicación al origen de la EA, las dos principales características neuropatológicas incluyen la acumulación extracelular de placas seniles alrededor de las neuronas y la glía, y la formación intracelular de ovillos neurofibrilares (ONFs).

Las placas seniles son formadas principalmente por la acumulación de proteína Beta-amiloide ($A\beta$) insoluble, en especial de su isoforma $A\beta_{42}$, la cual es formada por la escisión enzimática de APP (*del inglés Amyloid precursor protein*) por la vía amiloidogénica mediante la acción enzimática de la β - y γ -secretasas^{40,41}. En condiciones fisiológicas, APP se hidroliza mayoritariamente por la alfa secretasa (vía no amiloidogénica).

Por su parte, los ONFs son formados a partir de la fosforilación anormal (hiperfosforilación) de la proteína Tau, cuya función principal es la de estabilizar los microtúbulos para que se conecten con otros elementos del citoesqueleto neuronal, tales como los neurofilamentos y la actina⁴².

Sin embargo, existe una tercera característica propia de la EA que podría relacionar las dos hipótesis anteriores, la

cual tiene que ver con la respuesta inflamatoria a nivel cerebral.

La microglía está formada por las células inmunes residentes en el sistema nervioso central (SNC)⁴³. Para generar un balance entre el depósito y el aclaramiento de A β , la microglía ejerce un papel fundamental al engullir los depósitos insolubles de este péptido gracias a la activación de receptores que promueven la acción fagocítica, como CD36 y RAGE (del inglés *receptor for advanced-glycosylation endproducts*)^{44,45}. Por el contrario, para eliminar los depósitos solubles de A β (más resistentes a la degradación enzimática), la microglía se vale de proteasas extracelulares como la neprilisina, la IDE (del inglés *insulin-degrading enzyme*), ECE1 (del inglés *endothelin converting enzyme 1*), ACE (del inglés *angiotensin converting enzyme*), MMP9 (del inglés *plasmin, matrix metalloprotease 9*) y la PreP (del inglés *presequence peptidase*)⁴⁶⁻⁴⁸.

Aunque ha sido demostrado que en estadios tempranos de la EA la respuesta inmune resulta en una remoción del A β , y con ello una mejora en los síntomas de la enfermedad en modelos murinos^{49,50}, durante etapas avanzadas de la enfermedad se produce una prolongada estimulación de la respuesta inmune a causa del A β , lo cual producirá una disminución en la eficiencia de la microglía para

1. Introducción

degradarlo⁵¹. A su vez, esto conllevará a la liberación de varios productos tóxicos y proinflamatorios como citoquinas y especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) encargadas de aumentar la producción de A β y la hiperfosforilación de Tau, generando más daño y muerte neuronal⁵²⁻⁵⁴, lo cual contribuye a aumentar el declive cognitivo y el desarrollo de la enfermedad.

1.2.3. Ejercicio físico y función cognitiva

Al hablar de EF y función cognitiva, distintas investigaciones emergen al respecto para establecer la capacidad de éste de inducir una cascada de procesos celulares y moleculares, que promueven distintos fenómenos fisiológicos entre los que se encuentran la angiogénesis, neurogénesis y sinaptogénesis⁵⁵⁻⁵⁸, los cuales permiten potenciar eventos no menos complejos como el aprendizaje, la memoria y la plasticidad cerebral⁵⁹⁻⁶².

La evidencia actual ha establecido que desde el inicio de la tercera década de vida, se produce una disminución del volumen cerebral. De esta forma, el promedio de pérdida es estimado en aproximadamente un 14% para la corteza cerebral, 26% para la materia blanca cerebral y 35% para la materia gris hipocampal entre los 30 y los 90 años de

edad, con predisposición a altas pérdidas en las cortezas parietal y temporal⁶³. Paralelo a ello, el aprendizaje, la memoria y la neurogénesis hipocampal adulta también disminuyen con el envejecimiento^{64,65}.

Como alternativa a estos cambios estructurales y fisiológicos propios del envejecimiento, varias investigaciones han encontrado que las personas físicamente activas tienen un menor riesgo de padecer deterioro cognitivo que las sedentarias, podrían retrasar la pérdida de la función cognitiva propia de la edad^{12,32,37,66,67}, y aumentar el volumen de materia gris en varias áreas del cerebro como la corteza frontal^{68,69}, el hipocampo⁷⁰⁻⁷² y el núcleo caudado⁷³.

Esto fue demostrado por Erickson y colaboradores (2011)⁷⁰, cuando estudiaron los cambios estructurales a nivel cerebral en personas mayores que realizaron un programa de EF durante 12 meses. Los investigadores encontraron aumentos del 2% en las zonas anterior, izquierda y derecha del hipocampo de las personas ejercitadas posterior al período de intervención, lo cual significó revertir la pérdida de tejido cerebral relacionada con la edad, entre 1 y 2 años.

La relación inversa entre una vida físicamente activa y el riesgo de sufrir declive cognitivo está ampliamente documentada, siendo la inactividad física uno de los

1. Introducción

principales factores de riesgo para el deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer durante el envejecimiento⁷⁴, lo que a su vez indica que podría ser prevenido, o al menos retrasado.

Uno de los primeros estudios en demostrar que el declive de los procesos cognitivos propios de la edad era susceptible de ser modificado por la práctica de EF, fue llevado a cabo por Spirduso & Clifford en 1975⁷⁵. En él se demostró que adultos de mediana edad, practicantes de deporte durante gran parte de su vida, tuvieron mejor respuesta en tareas cognitivas que involucraron un componente psicomotor, cuando se compararon con sedentarios de mediana edad y similar respuesta a los jóvenes sedentarios, lo que indicó que la práctica regular de EF a lo largo de la vida pudo mantener la eficiencia del sistema nervioso central, al menos en términos de respuesta a estímulos simples y complejos.

De la misma manera que con el EF, varios estudios han encontrado una relación directa entre volumen de actividad física y menor riesgo de disminución de la función cognitiva en personas mayores^{37,67,76-78}. Por ejemplo, un estudio prospectivo llevado a cabo por Lindsay y colaboradores (2002)⁷⁶ encontró un efecto protector de la práctica de actividad física regular sobre el deterioro cognitivo y la EA, principalmente en mujeres. En él, los investigadores

evaluaron datos sobre la práctica de actividad física y resultados en pruebas de memoria recogidos en el estudio canadiense de salud y envejecimiento, en 6434 personas sanas de 65 años o mayores las cuales fueron nuevamente evaluadas 5 años después. Los autores concluyeron que la práctica regular de actividad física podría representar un importante factor protector contra el deterioro cognitivo y la EA.

Más recientemente un meta-análisis llevado a cabo por Hamer & Chida (2009)⁷⁹, en el que se incluyeron 16 estudios con más de 160.000 participantes, encontró una reducción del 45% del riesgo de padecer EA, gracias a la práctica regular de actividad física [0.55, 95% intervalo de confianza (CI)=0.36-0.84, $p=0.006$].

Similares resultados encontraron Buchman y colaboradores (2012)⁸⁰ al evaluar el riesgo de sufrir EA en una muestra de 716 sujetos mayores seguidos durante cerca de tres años y medio. Los autores encontraron que aquellas personas con bajos niveles diarios de actividad física, tuvieron un 53% más de probabilidades de sufrir EA respecto a aquellos que reportaron ser más activos (hazard ratio 0.477; 95% intervalo de confianza 0.273–0.832).

Aunque en la actualidad es difícil establecer los mecanismos neurobiológicos por los cuales la actividad física y el ejercicio físico podrían ser importantes en la

1. Introducción

prevención del deterioro cognitivo, se ha postulado que el aumento en la irrigación cerebral producido durante el ejercicio físico en varias áreas corticales y subcorticales (lo cual genera un incremento en la síntesis y uso de factores neurotróficos y neurotransmisores)⁸¹, junto con la disminución en la formación de proteína A β , la hiperfosforilación de la proteína Tau y la producción de factores pro-inflamatorios, podrían ser parte de la respuesta⁸²⁻⁸⁴.

1.2.4. Flujo sanguíneo cerebral y ejercicio físico

El flujo sanguíneo cerebral (FSC) indica la cantidad de suministro de sangre al tejido cerebral, y puede ser cuantificado en mililitros de sangre por 100g de tejido por minuto, mediante técnicas como PET (del inglés *Positron Emission Tomography*), SPECT (del inglés *Single Photon Emission Computed Tomography*), DSC (del inglés *Dynamic Susceptibility Contrast*) y MRI (del inglés *Magnetic Resonance Imaging*).

El envejecimiento ha sido asociado con una pérdida progresiva no solo en la función cognitiva sino también en el FSC⁸⁵⁻⁸⁹, con una tasa de disminución de entre 0.35% a 0.45% por año en sujetos de mediana edad y ancianos^{90,91}, lo que conlleva a un declive acelerado de la función cognitiva, y un riesgo incrementado de padecer demencia

en la población en general⁹². La figura 1.2 muestra una media del FSC por rangos de edad.

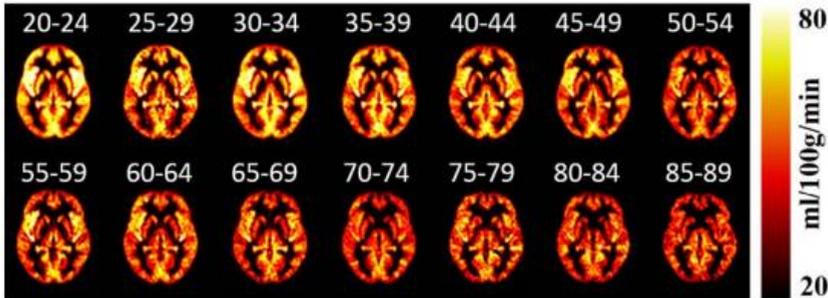


Figura 1.2. FSC por grupos de edad (con intervalo de 5 años), medida mediante MRI. Tomada de De Vis y colaboradores (2018)⁹³

Aunque la causa de la disminución del FSC propio del envejecimiento no es del todo clara, se ha postulado que cambios en la densidad y elasticidad de los vasos sanguíneos cerebrales, la degeneración de los pericitos y la reducción en los cuerpos neuronales, podrían ser parte de la respuesta⁹⁴⁻⁹⁶.

Comparadas con personas sanas, los individuos con EA pueden presentar una disminución de hasta el 40% en el FSC, donde ciertas regiones como el precúneo, el hipocampo, el giro cingulado posterior y los lóbulos temporal, occipital y parietal se ven principalmente afectadas⁹⁷⁻⁹⁹.

Una de las características fisiopatológicas de la EA es la acumulación de A β alrededor de las neuronas y la glía. Sin embargo, ha sido establecido que la forma soluble de esta

1. Introducción

proteína también puede acumularse en los vasos sanguíneos cerebrales (lo que se conoce como angiopatía amiloide), generando una disminución del FSC y un efecto vasoconstrictor, posiblemente afectando la actividad neuronal, tal como ha sido demostrado en modelos animales^{100,101}.

Por ejemplo, en un interesante estudio, Suo y colaboradores (1998)¹⁰² inyectaron intra-arterialmente A β 1–40 solubilizado a ratas de entre 7 y 8 meses de edad. Los investigadores encontraron que la infusión de la proteína amiloide, *in vivo*, disminuyó el FSC y aumentó la resistencia vascular en la corteza cerebral de estos animales, frente al grupo control, indicando que A β podría contribuir a la hipoperfusión observada durante la EA.

Por otra parte, hay evidencia que indica que la práctica regular de EF tiene un efecto positivo tanto en la función endotelial periférica¹⁰³ como en el aumento del FSC en áreas como el hipocampo, lo que a su vez se asocia con mejor desempeño en la memoria espacial en adultos mayores^{89,104}.

En línea con estos hallazgos, usando la técnica de ultrasonografía transcraneal Doppler, Anslie y colaboradores (2008)¹⁰⁵ midieron la velocidad del flujo sanguíneo en la arteria cerebral media (vACM) de 307 sujetos, de los cuales 153 eran sedentarios y 154

físicamente activos, de entre 18 y 79 años de edad. Los investigadores encontraron un aumento de ~17% en la vACM del grupo entrenado respecto al sedentario, lo que indica que la práctica habitual de EF a lo largo de la vida podría favorecer el mantenimiento de la perfusión cerebral durante el envejecimiento.

Junto con la anterior, hay evidencia que indica que, incluso en personas físicamente activas, períodos cortos sin EF podrían ser suficientes para disminuir el FSC hasta en 8 regiones del cerebro, incluidas el hipocampo¹⁰⁶. Esto implica que el FSC es sensible a pequeños cambios en el estilo de vida de las personas, por lo que es recomendable la práctica de ejercicio físico regular con el fin de conservar la salud cerebral.

Por su parte, en un estudio longitudinal, Chapman y colaboradores (2013)¹⁰⁷ encontraron que 3 horas de ejercicio aeróbico moderado por semana, durante 12 semanas, fueron suficientes para mejorar el FSC en reposo en regiones como el cíngulo anterior y el hipocampo, la memoria y el VO₂max de 18 sujetos sedentarios, cognitivamente sanos y de mediana edad, cuando se compararon con los controles. Similares resultados fueron encontrados por otros investigadores¹⁰⁸.

Estos hallazgos indican que los efectos del EF sobre la perfusión cerebral y la función cognitiva pueden ser

1. Introducción

favorables también en el corto plazo, al menos en personas cognitivamente sanas.

Al respecto, aunque Sobo y colaboradores (2016)¹⁰⁹ encontraron mejoras en el fitness cardiorrespiratorio de personas con EA después de un período de intervención con EF durante 4 meses de moderada a alta intensidad, otros investigadores no encontraron efectos positivos en el FSC¹¹⁰, las concentraciones de $A\beta$, Tau total o Tau fosforilado en el fluido cerebroespinal de personas con EA¹¹¹ que se ejercitaron en el mismo período de tiempo, y a las mismas intensidades propuestas por Sobo y colaboradores (2016)¹⁰⁹. Lo anterior indica que, pese a que la condición física sigue siendo susceptible de ser positivamente afectada en personas con EA, los cambios en la función cerebral podrían requerir de un ajuste en los distintos componentes de la carga como la duración de las sesiones de ejercicio y del programa en general, la frecuencia, la intensidad y el tipo de EF utilizado en la intervención. De igual forma, el estadio de la enfermedad en el cual se encuentren las personas también podría ser importante.

1.2.5. β -amiloide, proteína Tau y ejercicio

Diversos estudios realizados en modelos de ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer han encontrado disminución de placas amiloideas y ONFs después de intervenciones con EF, tanto de tipo voluntario como forzado. En algunos casos estos hallazgos han sido acompañados de mejoras en pruebas de aprendizaje y memoria.^{84,112,113}

Recientemente, en un interesante estudio en ratones APP^{swe}/PSEN1 Δ E9 de 5 meses de edad, 10 semanas de EF voluntario fueron suficientes para disminuir tanto la carga y el tamaño de las placas de A β como la fosforilación de Tau en el hipocampo. Junto con estos resultados, los investigadores encontraron reducción de la pérdida neuronal en el hipocampo y aumento en la neurogénesis en la zona CA3 y el giro dentado (zonas asociadas a la memoria), hallazgos que fueron acompañados de mejoras en la memoria espacial¹¹⁴. Los autores concluyeron que el EF de tipo voluntario, en un estado patológico temprano, podría ayudar a disminuir varios marcadores neuropatológicos en la EA, convirtiéndose en una herramienta terapéutica.

Estos resultados han sido respaldados por otros estudios en ratones transgénicos modelos de la enfermedad de Alzheimer (hPS2m, hTau23, Thy-Tau22)^{112,115,116}.

1. Introducción

Sin embargo, otros grupos de investigación no han encontrado disminuciones en la carga de A β o fosforilación de Tau, pese a conseguir mejoras en tareas de aprendizaje y/o memoria en ratones ejercitados¹¹⁷⁻¹¹⁹

Estos hallazgos inconsistentes podrían ser atribuidos a distintas causas, como la cantidad de ejercicio realizada por los ratones y la intensidad o el tipo de ejercicio. Adlard y colaboradores (2005)⁸³ sugirieron que al iniciar el programa de ejercicio físico después de la aparición de placas, el EF podría no contrarrestar la formación de éstas y el deterioro cognitivo, por lo que iniciar la intervención con EF en las etapas tempranas de la enfermedad se considera clave.

Igual que en animales, estudios en humanos han encontrado una asociación entre altos niveles de actividad física y baja carga de A β a nivel plasmático y cerebral en personas mayores sin desordenes cognitivos^{120,121}. Por ejemplo, Liang y colaboradores (2010)¹²⁰ demostraron en 69 adultos mayores cognitivamente normales que, bajos niveles de actividad física se asociaron con una mayor carga de A β a nivel cerebral medida por PET.

Consistente con estos hallazgos, el estudio australiano de imágenes, biomarcadores y estilo de vida sobre el envejecimiento realizado en 546 individuos cognitivamente

sanos, demostró que un alto nivel de actividad física, auto-reportada, podría contribuir a reducir el ratio $A\beta_{1-42/1-40}$ en plasma, y la carga cerebral de $A\beta$ ¹²².

Por su parte, en un ensayo clínico aleatorizado, el grupo de Baker (2010)¹²³ compararon el efecto de la práctica de EF de tipo aeróbico vs ejercicio de estiramiento, durante 6 meses, en 33 adultos entre 55-85 años de edad con deterioro cognitivo leve. Los individuos asignados al grupo ejercicio aeróbico entrenaron entre 45 y 60 minutos 4 días por semana, durante 6 meses, a una intensidad del 75% al 85% de la frecuencia cardíaca de reserva (FCR), mientras que el grupo control solo realizó actividades de estiramiento con una intensidad menor al 45% de FCR, durante el mismo tiempo. Aunque después de la intervención los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas, los niveles plasmáticos de $A\beta_{1-42}$ fueron 24% más bajos en el grupo de ejercicio aeróbico comparados con el grupo control, lo que podría indicar una posible acción del EF para modular el recambio de $A\beta$.

1.2.6. Inflamación y ejercicio

Hay amplia evidencia que indica un efecto antiinflamatorio del EF tanto de tipo agudo como crónico a nivel sistémico

1. Introducción

en humanos y animales^{124–127}, el cual también se sabe que afecta positivamente el SNC.

A nivel sistémico, la práctica habitual de actividad física en personas mayores ha demostrado un efecto positivo sobre la reducción en los niveles de marcadores inflamatorios como CRP (del inglés *C-reactive protein*), IL 6 (del inglés *Interleukin 6*) y TNF- α (del inglés *Tumor necrosis factor-alpha*)^{128–133}, lo que en muchos casos se ha asociado con mejor desempeño en pruebas cognitivas tanto en estudios transversales^{134,135} como longitudinales^{136,137}.

En estudios de intervención con ejercicio aeróbico se ha demostrado una mejora en el sistema inmune en personas mayores cognitivamente sanas, al aumentar la actividad de las NK (del inglés *Natural Killer cells*), la proliferación de linfocitos T, HSCs (del inglés *hematopoietic stem cells*) y EPCs (del inglés *endothelial progenitor cells*), con períodos de intervención superiores a las 2 semanas^{138–141}.

Aunque también se ha evaluado el efecto sobre el sistema inmune con intervenciones basadas en ejercicio de sobrecarga, los resultados han sido más heterogéneos¹⁴².

En cuanto al impacto del EF a nivel del SNC, hay considerable evidencia al respecto. En modelos animales para la EA se ha visto que 3 semanas de EF de tipo

voluntario fueron suficientes para disminuir la concentración de A β y citoquinas pro-inflamatorias como IL1 β y TNF- α en el hipocampo, y para aumentar los niveles de IFN- γ y MIP-1 α (proteínas relacionadas con la respuesta inmune). Estos resultados indican un efecto positivo del EF tanto en la respuesta inmune como en la disminución de proteína amiloide¹⁴³.

El efecto anti-inflamatorio del EF a nivel central también ha sido evaluado durante el envejecimiento en animales. Gomes da Silva y colaboradores (2013)¹⁴⁴ encontraron mayores niveles de IL10, y menores ratios de IL1 β /IL10, IL6/IL10 y TNF α /IL10 en el hipocampo de ratas ejercitadas por un período de 10 días, lo que refuerza el potencial terapéutico del EF para minimizar el riesgo de sufrir enfermedades relacionadas con la neuroinflamación, como el EA.

El mal funcionamiento microglial es un rasgo común durante el envejecimiento, caracterizado por distintos aspectos como: disminución en la tasa de migración al tejido lesionado, apariencia esporádica de microglía distrófica, disminución en la ramificación microglial individual y aumento de la activación en estado basal^{145,146}.

El envejecimiento fisiológico de la microglía junto con su constante exposición a un ambiente nocivo e inflamatorio alteran su función y respuesta basales, generando una alta

1. Introducción

expresión de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de superficie celular indicativas de activación, a lo que se le denomina *priming microglial*¹⁴⁷. Este estado fisiopatológico puede inducir tanto la producción de A β , como la hiperfosforilación de Tau y la disminución en la liberación de factores neurotróficos generando pérdida neuronal, y por ende un ambiente propicio para la EA¹⁴⁸. Sin embargo, el EF podría ser una herramienta de intervención eficaz para prevenir el *priming microglial*.

Recientemente, para determinar la influencia del EF de tipo voluntario sobre el estado inflamatorio inducido, Barrientos y su grupo de investigación (2011)¹⁴⁹ inyectaron intraperitonealmente E. Coli en ratas envejecidas, luego de haber tenido acceso libre a una rueda de carrera durante 6 semanas. La bacteria produjo un deterioro de la memoria a largo plazo en el grupo de ratas sedentarias, condición que fue eliminada en el grupo ejercitado. Junto con estos hallazgos, el ejercicio de tipo voluntario también previno la reducción en la expresión de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la zona CA1 del hipocampo cuando se comparó con el grupo control. Otro hallazgo importante tuvo que ver con la reducción de la sensibilización microglial mediante EF. Los investigadores aislaron la microglía tanto de las ratas ejercitadas voluntariamente como de sus controles, y la estimularon con distintas dosis

de lipopolisacárido durante 2 horas para provocar un estado inflamatorio. Los resultados revelaron que la microglía de las ratas ejercitadas tuvo una menor respuesta inflamatoria que la de los controles, medida por la expresión de TNF α , IL1 β y IL6. Estos hallazgos ponen de manifiesto la capacidad efectiva del EF para modular respuestas inflamatorias a nivel del SNC en ambientes similares a los de la EA, al menos en modelos animales.

Otras investigaciones, en ratones, también han mostrado que el EF revierte la alteración en la expresión de genes relacionados con la activación microglial propia del envejecimiento, como *MHCII* (del inglés *major histocompatibility complex class II*) y *CD68* (del inglés *Cluster of Differentiation 68*)^{150,151}.

1.3. PROTEÍNAS MODULADORAS DE LA FUNCIÓN COGNITIVA

1.3.1. Sirtuínas (SIRT)

Las sirtuínas son proteínas de la familia de las deacilasas y ADP-ribosiltransferasas que comparten un dominio central catalítico, pero varían en su localización subcelular y los sustratos preferidos^{152,153}. Tanto para la deacetilación como para la ADP-ribosilación, las sirtuínas dependen de la utilización de NAD⁺ (del inglés *nicotinamide adenine*

1. Introducción

dinucleotide) donde el producto final será nicotinamida y O-acetil-ADP-ribosa, respectivamente, resultando en silenciamiento de la cromatina y la represión o activación transcripcional^{154–156}, como lo muestra la **figura 1.3**.

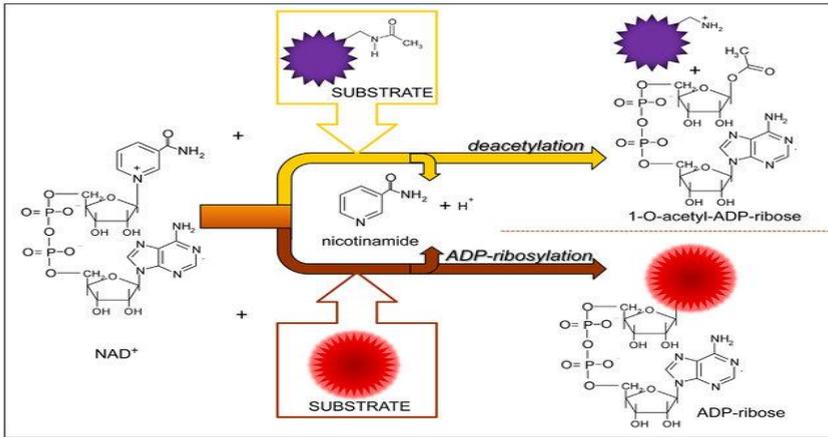


Figura 1.3. Esquema de reacciones catalizadas por sirtuinas.

Se requiere NAD⁺ para las reacciones de deacetilación y ADP-ribosilación que generan nicotinamida como subproducto. La deacetilación conduce a una transferencia del grupo acetilo a ADP-ribose, mientras que la ADP-ribosilación da como resultado la unión covalente del sustrato al resto de ADP-ribose. Extraído y modificado de Kleszcz, Paluszczak & Baer-Dubowska (2015)¹⁵⁷

Entre sus funciones está la de regular distintos procesos asociados al envejecimiento como el funcionamiento mitocondrial¹⁵⁸, el estrés oxidativo¹⁵⁹, el ritmo circadiano¹⁶⁰ y la función cerebral¹⁶¹.

Aunque la literatura se ha referido a las sirtuinas como deacetilasas, en la actualidad se les ha clasificado como deacilasas debido a que, además de remover los grupos acetilo de los residuos de lisina, pueden modificar otros

grupos acilo como el propionil, butiril, malonil, succinil, y los grupos miristoil y palmitoil derivados de los ácidos grasos¹⁶².

En mamíferos se han identificado siete sirtuínas (SIR1-SIR7)¹⁶³, las cuales se localizan en la mitocondria (SIRT3, SIRT4, and SIRT5), el núcleo (SIRT1, SIRT6, y SIRT7), y el citoplasma (SIRT2)¹⁵⁹.

Todas las sirtuínas se encuentran en diversos tejidos y órganos del cuerpo incluyendo el cerebro, células sanguíneas y músculo esquelético¹⁶⁴, y su actividad puede ser afectada negativamente por diversos factores como el envejecimiento o enfermedades de tipo neurológico, y de manera positiva por factores como el ayuno, la restricción calórica y el ejercicio físico¹⁶⁵⁻¹⁶⁸.

Por ejemplo, ha sido descrito que 6 semanas de ejercicio físico en tapiz rodante aumentaron los niveles de NAMPT (del inglés *Nicotinamide Phosphoribosyltransferase*), NAD⁺ y la actividad de SIRT1 en ratas jóvenes y envejecidas, cuando se compararon con su respectivo grupo control¹⁶⁹. NAMPT es una enzima clave en la producción intracelular de NAD⁺.

Así mismo, en humanos, recientemente de Guia y colaboradores (2019)¹⁷⁰ demostraron que 12 semanas de ejercicio físico tanto de tipo aeróbico como de fuerza,

1. Introducción

aumentaron los niveles de NAMPT en el vasto lateral de sujetos jóvenes (< 35 años) y mayores (> 55 años), lo que sugiere una mayor disponibilidad de NAD⁺ y actividad de las sirtuínas en este tejido.

Las sirtuínas estudiadas en la presente tesis (SIRT1, SIRT2, SIRT3 y SIRT6) son dianas potenciales en la lucha contra el deterioro cognitivo y la neurodegeneración¹⁶¹. Entre ellas, SIRT1 y SIRT3 se caracterizan por su fuerte actividad deacetilasa¹⁵⁹.

1.3.1.1. SIRT1

SIRT1 está involucrada en la regulación de varios procesos neurológicos como la plasticidad sináptica¹⁷¹, la neurogénesis adulta¹⁷² y la arborización dendrítica¹⁷³, necesarios para mediar distintas funciones cerebrales como el aprendizaje, la memoria y las emociones¹⁷⁴⁻¹⁷⁷, aunque su actividad disminuye con la edad¹⁶⁸. Así mismo, *in vitro*, ha sido demostrado que SIRT1 participa en la modulación de la inflamación y la producción de A β , al inhibir la actividad de NF- κ B (del inglés *Nuclear Factor κ B*), la γ -secretasa, y aumentar la de la α -secretasa ADAM10¹⁷⁸⁻¹⁸⁰, lo que implica que puede regular la hidrólisis de APP potenciando la vía no amiloidogénica (**Fig. 1.4**), y de esta forma convertirse en una diana para retrasar el Alzheimer.

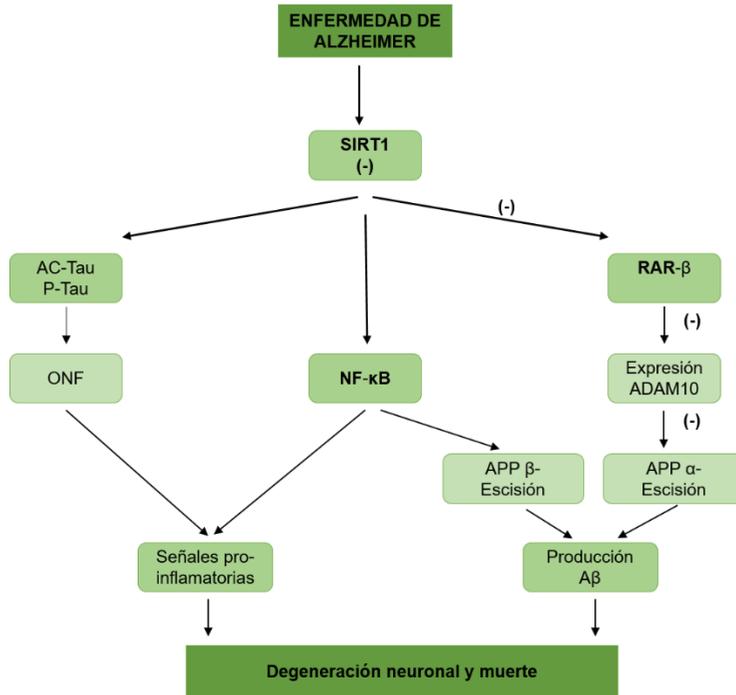


Figura 1.4. SIRT1 modula múltiples vías que ajustan la producción de A β .

Durante la enfermedad de Alzheimer, distintos efectos de SIRT1 se ven reducidos, como: deacetilación de Tau, inhibición de la vía de NF- κ B y la α -escisión de APP, lo que conlleva a la formación de ovillos neurofibrilares y un aumento de los niveles de A β y de la señal pro-inflamatoria. Adaptado y modificado de Jęsko y colaboradores (2017)¹⁸¹

Michán y colaboradores (2010)¹⁷¹ evaluaron esta hipótesis en un modelo murino al que se le modificó genéticamente la expresión de SIRT1. Los investigadores encontraron que la delección de esta sirtuína provocó un deterioro de las funciones cognitivas, específicamente en la memoria de corto y largo plazo y el aprendizaje espacial, lo cual fue acompañado de menor arborización dendrítica en el

1. Introducción

hipocampo. Así mismo, fue afectada la expresión de otros genes relacionados con la función cognitiva como BDNF y CREB, los cuales son importantes para el mantenimiento de la plasticidad sináptica.

También en un modelo murino, el grupo de la Dra. Sanfeliu (2017)¹⁷⁶ demostró que la sobreexpresión de SIRT1 en la zona CA1 del hipocampo mejoró distintos parámetros relacionados con la función cognitiva en ratones *Wild Type* (WT) y Transgénicos (Tg) para la enfermedad de Alzheimer. Los resultados de los ratones Tg fueron acompañados por una disminución en la carga de A β y proteína Tau fosforilada, así como de un aumento en los niveles de BDNF.

El ejercicio físico tanto de tipo agudo como crónico puede aumentar la expresión, el contenido y la actividad de SIRT1 en el músculo esquelético y en células mononucleares de la sangre en roedores y humanos¹⁸²⁻¹⁸⁵. Así mismo, hay evidencia que indica que la práctica regular de EF aumenta la actividad de SIRT1^{168,186}.

1.3.1.2. SIRT3

SIRT3 se encuentra altamente expresada en tejidos metabólicamente muy activos como el cerebro, el corazón, el hígado, el tejido adiposo marrón y el músculo esquelético¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, mientras que tejidos con bajas

demandas metabólicas como tejido adiposo blanco, pulmones, bazo, timo, páncreas e intestino delgado presentan menor expresión de esta proteína¹⁸⁷.

Entre las funciones de SIRT3 se destacan la modulación positiva del funcionamiento mitocondrial mediante la deacetilación y activación de varios componentes de la cadena de transporte electrónico¹⁹⁰, la participación en la defensa contra el estrés oxidativo y la biogénesis mitocondrial mediante la deacetilación de la enzima manganeso-superóxido dismutasa (MnSOD)^{191–193} y la inducción de PGC-1 α (del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor* y *co-activator 1 α*)¹⁸², respectivamente.

Mientras factores como el envejecimiento y una dieta alta en grasas regulan su expresión de manera negativa, la restricción calórica (RC), el ayuno y el ejercicio físico tienen el efecto contrario^{194–196}, tal como lo indica la **figura 1.5**. Por ejemplo, Palacios y colaboradores (2009)¹⁹⁶ encontraron mayores niveles de SIRT3 en el músculo esquelético de ratones que realizaron RC por 12 meses, así como de aquellos que se ejercitaron voluntariamente durante 6 semanas, comparados sus respectivos grupos control.

1. Introducción

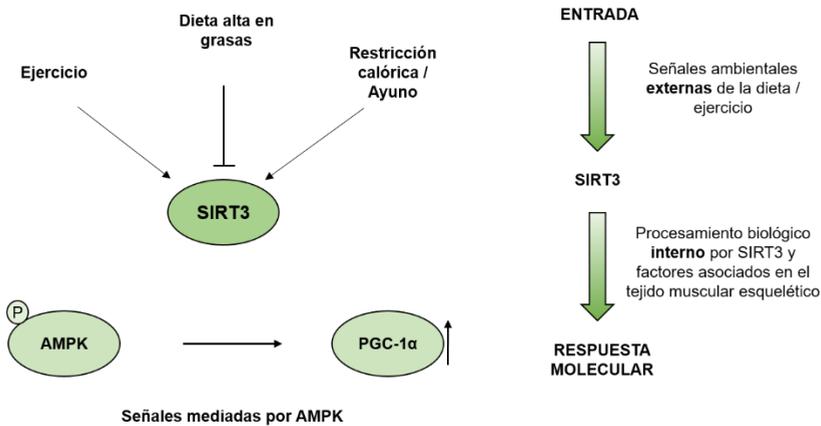


Figura 1.5. Esquema representativo de la acción de SIRT3 a nivel del músculo esquelético. Extraído y modificado de Palacios y colaboradores (2009)¹⁹⁶

Más recientemente, el grupo de Koltai (2018)¹⁹⁷ encontró mayor contenido de SIRT3 y SOD2 en el vasto lateral de atletas máster de 65 años, respecto a sujetos sedentarios.

A nivel cerebral también ha sido encontrada una alta expresión de ARNm de SIRT3 en ratas adultas, con niveles similares de la proteína en zonas como el hipocampo, la corteza, la médula espinal y el tronco encefálico, lo que contrasta con los bajos niveles observados en el cerebelo¹⁹⁸. Esto podría ser debido al poco número de mitocondrias presentes en esta zona¹⁹⁹. De igual forma, se sabe que SIRT3 se expresa tanto en neuronas como en astrocitos y la microglía, pero es en las primeras donde su expresión es más elevada¹⁹⁸.

La disfunción mitocondrial es una de las características de la EA²⁰⁰. La deficiencia de SIRT3 se asocia a la disfunción mitocondrial cerebral, lo que puede contribuir al deterioro cognitivo y posterior aparición de la enfermedad²⁰¹. Respecto a esto, recientemente Yin y colaboradores (2018)²⁰² encontraron menor nivel de expresión del ARNm y del contenido de SIRT3 en distintas regiones corticales de tejido post-mortem de personas que habían padecido EA, cuando las compararon con el grupo control. Paralelamente, los investigadores encontraron mayores niveles de A β , Tau total y Tau acetilada en neuronas corticales de ratones knock-down para SIRT3. Por último, se han encontrado menores niveles cerebrales de SIRT3 en ratones 3xTg para la EA²⁰³.

Contrario a estos hallazgos, otros estudios como el de Weir y colaboradores (2012)²⁰⁴, reportaron mayores niveles de expresión del ARNm de SIRT3 en tejido cortical postmortem de personas con EA. En un modelo murino para la enfermedad de Alzheimer, este mismo grupo encontró niveles elevados de ARNm de SIRT3 en el hipocampo de ratones de 6 meses de edad, los cuales incrementaron a los 26 meses.

Esta divergencia entre los resultados reportados en la literatura aún no es del todo clara. Sin embargo, es claro

1. Introducción

que SIRT3 es afectada por la aparición de la enfermedad de Alzheimer, así como durante su progresión.

1.3.2. Catepsina B

Catepsina B (CTSB) es la cisteína proteasa más abundante y ubicua ya que se expresa en todos los tejidos humanos. CTSB degrada péptidos y proteínas que entran en el sistema endolisosomal mediante endocitosis y fagocitosis^{205,206}. Es sintetizada como una pre-proenzima de 339 aminoácidos con un peso molecular de 38 kDa, pertenece a la superfamilia de la papaína^{205,207,208}, y es considerada clave en la activación lisosomal neuroprotectora y la supervivencia neuronal^{209,210}. La ablación genética de CTSB en un modelo murino para EA²¹¹ resulta en un aumento de las cantidades de A β 1–42, mientras que la inyección hipocampal de CTSB reduce la carga de A β y mejora el aprendizaje y la memoria en ratones Tg (APP/PS1)²¹², lo cual sugiere un papel anti-miloidogénico para esta proteasa.

En condiciones fisiológicas normales, CTSB se ubica en el compartimento endosómico / lisosómico y está implicada principalmente en el recambio habitual de proteínas intracelulares y extracelulares, manteniendo así la actividad metabólica homeostática dentro de las células.

Otras funciones celulares de CTSB incluyen la regulación de la activación pro-hormonal y pro-enzimática, procesamiento de antígenos, respuestas inflamatorias contra antígenos, remodelación de tejidos y apoptosis^{208,213}.

CTSB ha sido identificada como una mioquina que puede ser liberada por el músculo esquelético en respuesta a ejercicio tanto de tipo aeróbico como de fuerza^{214,215}, y puede cruzar la barrera hematoencefálica para mediar procesos relacionados con la cognición²¹⁴.

1.3.3. Factores neurotróficos (FNs)

Los FNs son proteínas que regulan el crecimiento axonal, la plasticidad sináptica, la neurotransmisión, y la expresión de proteínas sinápticas^{216–220}. Pueden actuar como factores derivados de tejidos diana (o áreas de inervación) por un mecanismo retrógrado, o de forma anterógrada en donde la neurona postsináptica recibe los factores tróficos de la neurona presináptica^{221,222}. También pueden actuar de forma autocrina, en donde la misma célula que posee receptores para dichos factores es al mismo tiempo capaz de sintetizarlos^{223,224}, o de forma paracrina, en la que la célula que libera el FN está cerca de su receptora²²⁵.

1. Introducción

Si bien se ha demostrado su papel en la diferenciación y supervivencia de las neuronas, algunos FNs también están activos en tejidos embrionarios no neuronales, o se pueden liberar durante la edad adulta en caso de regeneración tisular, neuroprotección y plasticidad^{226,227} para ayudar a mediar estos procesos. Sin embargo, una ausencia de FNs hace a células y tejidos proclives al daño, y por ende a la muerte^{218,228}.

En función de lo descrito anteriormente, cabe destacar que la expresión de estos factores se puede ver disminuida o incrementada como consecuencia de una enfermedad, trauma, inflamación, infección, crecimiento tumoral, o incluso en respuesta frente al ejercicio físico.

Con el descubrimiento del Factor de Crecimiento Nervioso (*NGF*, del inglés *Nerve Growth Factor*)²²⁹ vinieron en aumento los estudios que buscaban identificar otras moléculas peptídicas asociadas a los fenómenos fisiológicos neuronales, lo cual llevó a identificar otros factores neurotróficos pertenecientes a la misma familia del NGF, y a otras familias con sus respectivos receptores (tabla 1).

Entre los factores neurotróficos se destacan las neurotrofinas, las cuales han sido objeto de exploración de varios grupos de investigación en las últimas dos décadas, enfocándose en elucidar su papel tanto a nivel central

como periférico^{219,230,231}, logrando obtener resultados que demuestran que estas proteínas de tipo endógeno sirven como moduladoras de procesos antiapoptóticos, pero que a su vez promueven la sinaptogénesis, el mantenimiento, la diferenciación, la supervivencia neuronal, la axogénesis y la dendrogénesis. De igual forma, de manera más reciente, se ha evidenciado su papel en procesos de regeneración en distintos tejidos²³².

1. Introducción

Tabla 1.1. Familia de FNs estructuralmente relacionados y sus receptores.

Familia del factor neurotrófico	Factor neurotrófico	Receptores preferidos
Neurotrofinas	Factor de Crecimiento nervioso (NGF)	TrkA, p75 ^{NTR}
	Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	TrkB, p75 ^{NTR}
	Neurotrofina-3 (NT3)	TrkC, p75 ^{NTR}
	Neurotrofina-4/5 (NT4/5)	TrkB, p75 ^{NTR}
Familia GDNF	Factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF)	Ret, GFR α -1
	Neurturina	Ret, GFR α -2
	Artemina	Ret, GFR α -3
	Persefina	Ret, GFR α -4
Citoquinas Neurotróficas	Factor neurotrófico ciliar (CNTF)	gp130, LIFR β , CNTFR α
	Factor inhibidor de la leucemia (LIF)	gp130, LIFR β
	Cardiotrofina-1 (CT-1)	gp130, LIFR β
	Oncostatina-M (OSM)	gp130, OSMR β
	Interleucina-6 (IL-6)	gp130, IL6R α
Familia HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF)	Met
	Proteína estimuladora de macrófagos (MSP)	Ron

1.3.3.1. Neurotrofinas (NTs)

El término neurotrofina hace referencia a una familia de proteínas con características estructurales comunes²³³, comparada con otras familias de factores de crecimiento. Las NTs han sido de especial interés para los neurobiólogos, ya que ellas ejercen sus acciones biológicas sobre células del sistema nervioso²¹⁸, aunque actualmente hay evidencia que demuestra que estas moléculas actúan en otros sistemas y tejidos, como el músculo esquelético donde también ejercen sus acciones tróficas²³⁴.

Esta familia de polipéptidos está muy relacionada entre sí, y se sabe que cumplen diferentes funciones neuronales como la supervivencia, migración, diferenciación, desarrollo, y plasticidad^{218,235-237}, y son sintetizados inicialmente en su forma inmadura como pre-pro-proteína.

En los mamíferos se han identificado 4 NTs, las cuales incluyen a NGF²²⁹, BDNF²³⁸, neurotrofina 3 (NT-3)²³⁹ y neurotrofina 4/5 (NT4/5)^{218,240}, la cual debe su doble nomenclatura a su caracterización inicial en peces y posteriormente en mamíferos. Sin embargo, comúnmente se le conoce como NT-4.

Todas estas NTs tienen un papel esencial en la diferenciación neuronal y plasticidad sináptica en varias

1. Introducción

regiones cerebrales relevantes para el aprendizaje y la memoria²⁴¹, pero para que ejerzan sus acciones tróficas han de unirse a dos diferentes receptores en la membrana citoplasmática, uno de ellos de alta afinidad tipo tirosina quinasa (Trk, del inglés *Tirosyne Kinase*), al que se unirán en su forma madura, y otro de baja afinidad (p75NTR) al que se acoplarán en su estado inmaduro (pro-neurotrofina)^{242,243}.

1.3.3.2. BDNF

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *del inglés Brain Derived Neurotrophic Factor*) es un homodímero de un peso molecular de 27 KD identificado entre 1978 y 1980 por Barde y su grupo de investigación²³⁸. Posteriormente fue purificado a partir de tejido cerebral de cerdo²⁴⁴, y unos años después clonado por Leibrock²⁴⁵. Pero no fue sino hasta 1.995 cuando Rosenfel y colaboradores²⁴⁶ demostraron la presencia, a nivel periférico, de la mencionada molécula, advirtiendo que su concentración era unas 200 veces mayor en suero que en plasma, lo cual fue sustentado por su liberación desde las plaquetas. Es decir, BDNF puede cruzar la barrera hematoencefálica en ambas direcciones^{247,248} y posteriormente ser almacenado en las plaquetas.

Por demás está decir que estos aportes fueron sustanciales para que la comunidad científica se volcara a estudiar la relación entre la presencia de BDNF en la periferia, y su relación con la función cognitiva. Si bien es cierta esta aseveración, cabe resaltar que solo hasta el 2002 se estableció una correlación entre los niveles de BDNF corticales y séricos ($P < 0.01$), especialmente en animales jóvenes²⁴⁹ aunque para otros autores, tal evidencia no es clara²⁵⁰.

Su síntesis, en primera medida, se da en el retículo endoplasmático como una proteína precursora (pre-pro-BDNF), que posteriormente será proteolíticamente escindida de dos formas, constituyendo dos proteínas distintas estructural y funcionalmente: la forma truncada (pro-BDNF), de 28 KDa, y la forma madura (BDNF) de 14 KDa²⁵¹.

El BDNF maduro es considerado la forma activa de esta molécula la cual posee dos receptores, uno de baja afinidad (p75) y otro de alta afinidad (TrkB)^{252,253}. Tanto el BDNF como su receptor de alta afinidad están presentes en el músculo esquelético²⁵⁴, así como en axones terminales presinápticos y en compartimientos dendríticos postsinápticos en las neuronas, y son capaces de liberarse y actuar en ambas direcciones²⁵⁵.

1. Introducción

Aunque se ha documentado que esta importante neurotrofina puede ser producida en tejidos periféricos como el músculo esquelético, hígado, tejido adiposo, músculo liso bronquial, tejido ovárico, glándulas submandibulares y células endoteliales y del sistema inmune²⁵⁶⁻²⁶⁶, es importante resaltar que el cerebro contribuye a cerca del 75% de su síntesis en condiciones normales, las cuales se ha visto que aumenta durante el ejercicio prolongado en unas 2 o 3 veces respecto a sus valores en reposo²⁶⁷.

BDNF se ha descrito como promotor de varios aspectos del desarrollo cerebral,^{241,268-271} los cuales son mediados por su receptor TrkB en el hipocampo y la corteza cerebral²⁷², y llevados a cabo a través de complejas vía de señalización como PI3K/Akt, PLC γ y las vías de Ras ^{273,274}, las cuales promueven la supervivencia neuronal y convergen en el regulador transcripcional CREB (del inglés *cAMP-Response Element Binding Protein*) ^{275,276}, el cual se sabe que inhibe la apoptosis, previene la neurodegeneración y modula la expresión de genes relacionados con la función cognitiva²⁷⁷⁻²⁷⁹. Esto constata la premisa de que un aumento en las concentraciones de BDNF se asocia con incrementos de la talla hipocampal y mejora en el desempeño de la memoria espacial y el aprendizaje^{255,280},

misma relación que se ha encontrado en sujetos físicamente activos^{70,71}.

Si bien hemos mencionado los fenómenos fisiológicos en los que BDNF interviene de forma positiva, también es oportuno señalar que se ha descrito una disminución de sus concentraciones con el paso de los años²⁸¹, aumentando el riesgo de sufrir patologías de tipo neurodegenerativo como enfermedad de Parkinson, demencia, EA, depresión y deterioro cognitivo leve^{281–283}.

1.3.4. Receptores de neurotrofinas

1.3.4.1. Receptores Trk

La familia de los receptores de tirosina quinasa tienen especial preferencia por una o más NTs, en donde el receptor TrkA es afin por NGF, TrkB por BDNF y NT-4/5, y TrkC por NT-3²⁵⁵. Sin embargo, a pesar de su especificidad, estos receptores pueden expresar afinidad, en menor medida, por otras neurotrofinas. Por ejemplo, se ha establecido que TrkB también podría interaccionar con NT-3^{240,284}, mientras que TrkA haría lo propio con NT-3 y NT-4/5 (**Figura 1.6**)

1. Introducción

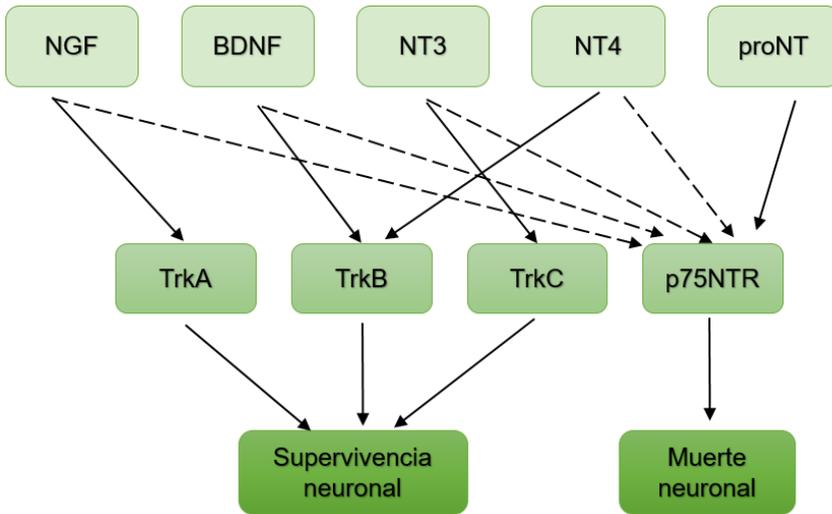


Figura 1.6. Familia de las neurotrofinas y su interacción con receptores Trk y p75.

Al enlazarse a su receptor de alta afinidad, las NTs serán llevadas hasta el soma mediante transporte axonal retrógrado (desde los botones terminales hasta el soma neuronal), donde serán responsables de iniciar diversos efectos promotores de la supervivencia, crecimiento neuronal, plasticidad sináptica, mielinización, diferenciación, entre otras, mediante la activación de varias vías de señalización intracelular como IP3, Ras/Erk, AMPK y PLC γ dentro del núcleo^{219,237,242,285-289} (**figura 1.7**).

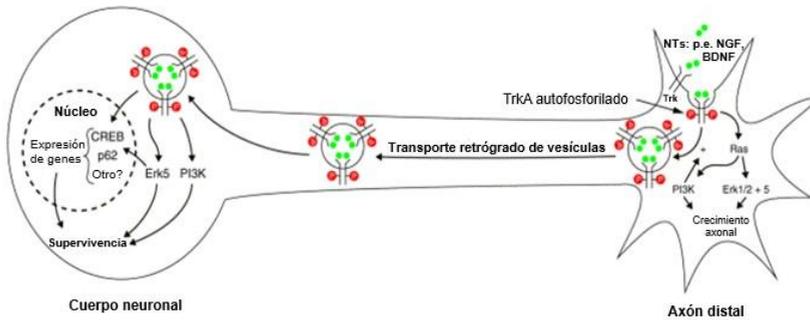


Figura 1.7. Transporte retrógrado de las neurotrofinas. Extraída y modificada de Ginty & Segal, 2002²⁹⁰

Estas acciones tróficas llevadas a cabo por las NTs y mediadas por sus receptores Trk, han sido comprobadas en experimentos con ratones KO donde se ha evidenciado, por ejemplo, que tanto en ausencia de NGF como de su receptor de alta afinidad, no solo presentan pérdida neuronal en ganglios sensoriales y simpáticos, sino que no ganan peso respecto a sus compañeros de camada, y la mayoría de ellos desarrollan llagas y signos de automutilación. A esto se suma que mueren dentro del primer mes de vida ^{291,292}.

De igual forma, Klein y colaboradores 1993²⁹³ evidenciaron que ratones KO para el receptor TrkB no solo morían pocas horas después de nacer, sino que presentaban reducida capacidad para alimentarse y deficiencias neuronales tanto en el sistema nervioso central como en el periférico.

1. Introducción

Sin duda, estos hallazgos demuestran la importancia de las vías de señalización reguladas por receptores Trk en el desarrollo neuronal y mantenimiento a través de la diferenciación y neurogénesis.

1.3.4.2. Receptor p75

Todas las neurotrofinas, en su forma inmadura, se enlazan a su receptor de baja afinidad p75NTR (**Fig. 1.6**), el cual es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral²⁹⁴. A pesar de que aún no se han establecido de forma clara las funciones de este receptor²⁹⁵, hay varias líneas de evidencia que apuntan a que sus principales acciones fisiológicas se centran en la regulación y activación de la señalización de los Trk^{285,296}, y ejercer distintas tareas importantes del desarrollo del sistema nervioso²⁹⁷. Así mismo, se ha visto implicado en la activación de vías opuestas como NF- κ B y *Jun kinasa*, encargadas de promover la supervivencia celular y apoptosis respectivamente²⁹⁸⁻³⁰¹, las cuales podría activar en distintas etapas del desarrollo embrionario, ya que se ha visto que es necesario para la conservación de las neuronas sensoriales en esta etapa inicial de la vida, pero en etapas más tardías puede activar la señal apoptótica³⁰².

1.4. BDNF, FUNCIÓN COGNITIVA Y EJERCICIO FÍSICO

Entre las neurotrofinas, el factor neurotrófico derivado del cerebro ha sido considerablemente estudiado, y su relación con el ejercicio y la función cognitiva ha sido ampliamente establecida^{123,267,303–306}. De igual forma, la relación directa entre los niveles circulantes a nivel periférico y los contenidos a nivel cerebral ha sido demostrada^{267,307}.

Bajos niveles de esta neurotrofina han sido encontrados en tejido cerebral postmortem de personas que padecieron EA^{308,309}, lo que apoya la hipótesis de que puede ser considerado una diana para la enfermedad, y las intervenciones que mejoren su producción podrían representar una alternativa efectiva para retrasar su aparición.

Con el objetivo de explorar distintas rutas que puedan dar explicación al origen del deterioro de la función cognitiva, y con ello descubrir posibles dianas que puedan revertir o retardar su aparición mediante distintas intervenciones, entre las que se encuentra el EF, han sido generados varios modelos murinos transgénicos que simulan las principales características neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer^{310–315}. Junto con ello, numerosos estudios en cohortes humanas han estudiado el papel del EF frente a la mejora del funcionamiento cognitivo y el

1. Introducción

retraso de la aparición de su pérdida, propio de la edad^{38,66,316,317}

Por ejemplo, recientemente el grupo de Choi (2018)³¹⁸ demostró que al bloquear la neurogénesis adulta hipocampal (NAH, del inglés *Adult Hippocampal Neurogenesis*) en ratones 5xFAD, el deterioro cognitivo propio del genotipo se exacerbó. Cuando indujeron NAH (farmacológica y genéticamente) no hubo ningún beneficio sobre la cognición ni marcadores de EA. Sin embargo, después de un período de entrenamiento físico, el EF logró inducir NAH que a su vez mejoró la cognición junto con un aumento en los niveles de BDNF y una reducción de la carga de A β .

Los autores concluyeron que, a diferencia de las neuronas recién nacidas inducidas por drogas y terapia génica, la NAH generada por el ejercicio tuvo efectos positivos sobre la función cognitiva probablemente por ir acompañada de producción de BDNF, el cual pudo generar un ambiente cerebral adecuado para el mantenimiento y la supervivencia de las nuevas neuronas en regiones del cerebro afectadas por AD.

Por su parte, el grupo de Maejima (2017)³⁰⁴ investigó los efectos del EF moderado y el envejecimiento sobre la función cognitiva y la expresión de BDNF en el hipocampo de ratones de 13 meses de edad con envejecimiento

acelerado. Cuatro semanas de EF fueron suficientes para mejorar la memoria de reconocimiento y aumentar la expresión de BDNF, sugiriendo que este tipo de ejercicio podría ayudar a prevenir la degeneración de la función cognitiva durante el envejecimiento, mediante el aumento de la expresión de BDNF en el hipocampo.

En humanos, varios estudios indican que tanto la práctica de EF de tipo agudo como crónico contribuyen a aumentar los valores basales periféricos de BDNF³¹⁹⁻³²⁵ y, en algunos casos, esto se relaciona con ganancias en la función cognitiva^{305,326,327}. El hecho de que el EF aumente los niveles de BDNF lo postula como una potencial herramienta para mejorar el aprendizaje y la memoria.

En un ensayo controlado y aleatorizado, Vaughan y colaboradores (2014)³²⁸ se centraron en determinar el efecto de 16 semanas de ejercicio multimodal en la función cognitiva y los niveles plasmáticos de BDNF, en 48 mujeres de entre 65-75 años de edad cognitivamente sanas. El grupo de intervención (25 mujeres) realizó ejercicio multimodal que incluyó entrenamiento cardiovascular, de fuerza, flexibilidad, coordinación y agilidad, junto con su respectivo calentamiento y vuelta a la calma en cada sesión, dos veces por semana durante 60 minutos. El grupo control (23 mujeres) no realizó EF.

1. Introducción

Al final del estudio, el grupo intervención tuvo mayores niveles plasmáticos de BDNF respecto al grupo control, y esto fue acompañado de mejores resultados en pruebas relacionadas con la función cognitiva sugiriendo, igual que en los estudios en animales, que la acción del EF sobre la función cognitiva podría ser mediada por BDNF.

Otros estudios también encontraron aumentos en el volumen cerebral y/o mejoras en la función cognitiva en individuos mayores sanos, después de participar en un programa de EF³²⁹⁻³³². Así mismo, Burns y colaboradores (2012) demostraron que sujetos con altos niveles de aptitud cardiorrespiratoria presentaron menores niveles de atrofia cerebral³³³.

El único estudio que a la fecha se ha centrado en determinar el efecto agudo del EF sobre BDNF en individuos con EA, fue realizado por el grupo de Coelho (2013)³³⁴. En él, 21 sujetos con EA y 18 cognitivamente sanos realizaron una sesión de EF hasta el agotamiento. Los niveles plasmáticos de BDNF en ambos grupos fueron significativamente mayores al final del ejercicio, respecto a los encontrados previo a éste.

Estos hallazgos son importantes, ya que demuestran que las vías encargadas de la síntesis y liberación de BDNF en personas con EA siguen siendo susceptibles de estimulación por el EF. Si el BDNF sintetizado durante la

práctica de EF activa las distintas vías de señalización encargadas de modular los procesos relacionados con el aprendizaje, la memoria, el mantenimiento y la supervivencia neuronal, aún está por establecerse.

1.5. ESTRÉS OXIDATIVO

1.5.1. Definición

Aunque originariamente el estrés oxidativo fue definido por Sies & Cadenas (1985)³³⁵ como “una alteración en el equilibrio pro-oxidante-antioxidante a favor del primero”, la investigación ha dado lugar a una modificación permanente de este concepto. Por ejemplo, teniendo en cuenta la complejidad del balance redox celular, Jones (2006)³³⁶ definió el estrés oxidativo como “una disrupción del control y la señalización redox”. Sin embargo, más recientemente el mismo Jones junto a Helmut Sies redefinieron el concepto, postulando al estrés oxidativo como un “desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes, conllevando a un desequilibrio del control y/o la señalización redox”³³⁷. Este desequilibrio al que se hace referencia puede generar daño a diferentes estructuras biológicas como macromoléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos) y ácidos nucleicos (ADN y ARN)³³⁸, lo cual puede generar alteraciones a nivel celular entre las que se

1. Introducción

incluyen la pérdida de la función enzimática, el incremento de la permeabilidad celular por ataque a sus membranas, o la muerte celular por necrosis o apoptosis, que a su vez puede conllevar a la aparición de distintas enfermedades como diabetes, insuficiencia renal, hipertensión arterial, cirrosis, aterosclerosis, procesos inflamatorios, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cataratas, depresión, diversos tipos de cáncer, entre otras^{339,340}.

1.5.2. Moléculas pro-oxidantes

1.5.2.1. Radicales libres

Normalmente, un átomo está compuesto por un núcleo central con pares de electrones orbitando alrededor de él. Sin embargo, existen átomos que tienen electrones desapareados en su capa de valencia, a los que se le denominan radicales libres (RLs)³⁴¹. Estos RLs suelen ser inestables y altamente reactivos, ya que sus electrones desapareados tienden a formar pares con otros átomos o biomoléculas estables. Cuando el RL ha conseguido el electrón que necesita para estabilizarse, la molécula que se lo ha cedido se convierte en un RL y el daño a otras moléculas se continúa propagando.

Para estabilizarse, los RLs pueden participar en 4 reacciones químicas diferentes³⁴²:

1. En una reacción de oxidación, el radical libre interactúa con una molécula estable que le cede un electrón. De esta forma, mientras el radical libre se estabiliza, la molécula donante se convierte en radical.

2. Mediante una reacción de adición, los RLs se unen a una molécula más estable convirtiendo a la molécula receptora en un nuevo radical libre.

3. En una reacción de terminación, en la que 2 RLs se combinan entre sí para generar un producto con un número par de electrones.

4. En una reacción de desproporción en la que 2 radicales interactúan entre sí, uno de ellos como donador y el otro como aceptor de electrones. En ambos casos se forman moléculas más estables

1.5.2.2. Clasificación desde el punto de vista bioquímico

Existen 2 tipos de radicales libres. Los derivados del oxígeno, a los que se les denomina especies reactivas de oxígeno (ERO), y los derivados del nitrógeno, a los que se les conoce como especies reactivas de nitrógeno (ERN)³⁴¹.

1. Introducción

Junto con ellas, hay otras moléculas a las que se les conoce como prorradicales, o no radicales, las cuales pueden convertirse en radicales libres (**tabla 1.2**).

Tabla 1.2. Lista de los principales ERO y ERN

Radicales	$O_2^{\cdot-}$	Anión Superóxido
	$\cdot OH$	Hidroxilo
	$NO\cdot$	Óxido nítrico
	$NO_2\cdot$	Dióxido de nitrógeno
No radicales	H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
	$HOCl$	Ácido hipocloroso
	$ONOO^-$	Peroxinitrito

Está ampliamente descrito que Tanto las ERO como las ERN son producidas durante el metabolismo celular de forma natural, y pueden jugar un papel tanto beneficioso como deletéreo. Los efectos beneficiosos se producen a concentraciones bajas y moderadas en donde, por ejemplo, sirven como segundos mensajeros e iniciadores de distintas vías de señalización, o forman parte de la defensa frente a agentes infecciosos^{343,344}. Así mismo, son importantes cuando son producidos tanto de manera fisiológica como durante el ejercicio, ya que ha sido demostrado que sirven para mediar las adaptaciones moleculares inducidas por éste³⁴⁵.

En el lado opuesto, concentraciones elevadas de RLs pueden llevar a la activación de vías de señalización

relacionadas con la apoptosis, la inflamación o la disfunción mitocondrial³⁴⁶⁻³⁴⁸, y junto con ello generar daño a macromoléculas y ácidos nucleicos, lo que podría contribuir a la generación de patologías de tipo neurodegenerativas (como Alzheimer y Parkinson), diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis y cáncer, entre otras³⁴⁹.

1.5.2.3. Fuentes de producción de radicales libres

La producción de RLs se lleva a cabo tanto por reacciones enzimáticas como no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas que generan ERO son aquellas involucradas en la cadena respiratoria, la síntesis de prostaglandinas, las células fagocíticas y el sistema de citocromo P450³⁵⁰⁻³⁵³.

La mitocondria es una de las principales fuentes de producción de radicales libres³⁵⁴. Inicialmente se calculó que, en condiciones normales, entre un 2% y un 5% del oxígeno molecular utilizado por la cadena respiratoria para formar ATP podría sufrir una reducción monovalente, lo que generaría anión superóxido³⁵⁵. Así mismo, se ha asumido que la generación de RLs en sitios altamente oxidativos como el músculo esquelético, se incrementa entre 50 y 100 veces debido a la alta actividad de la respiración mitocondrial³⁵⁶.

1. Introducción

Sin embargo, es importante acentuar que cálculos más recientes indican que la cantidad de oxígeno molecular utilizada por las mitocondrias para producir superóxido es del orden de 0,15%³⁵⁷. Así mismo, varias líneas de evidencia indican que la producción mitocondrial de ERO es mayor en estado basal (Estado 4) que en estado activo (Estado 3)³⁵⁸⁻³⁶⁰.

Por otra parte, respecto a la producción de anión superóxido por distintas fuentes enzimáticas, debemos decir que puede ser generado por la Xantina Oxidasa, la NADPH oxidasa y las enzimas fosfolipasas. Luego de su formación, este radical libre participa en varias reacciones que generan otros radicales y prorradicales como el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el peroxinitrito, el ácido hipocloroso, entre otros. Por su parte, una ERN como el óxido nítrico es sintetizado a partir de la oxidación de L-arginina a L-citrulina por medio de la enzima óxido nítrico sintasa, tal como lo muestra la **figura 1.8**.

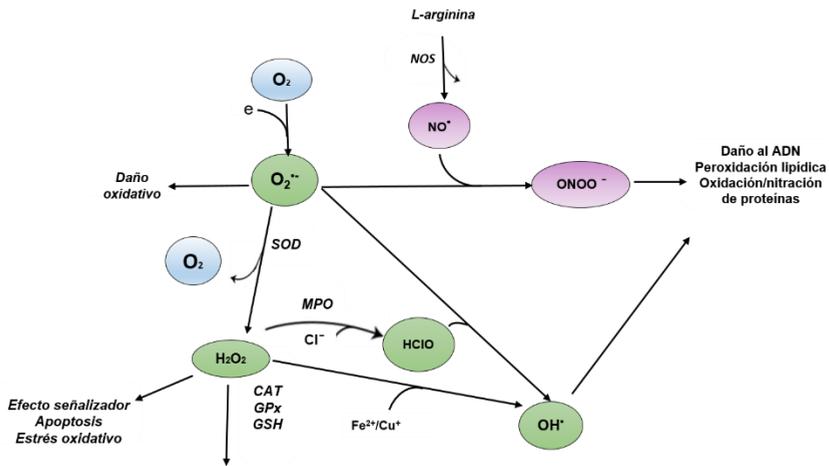


Figura 1.8. Formación de Radicales libres y especies reactivas a partir del oxígeno molecular. Extraída y adaptada de Aviello & Knaus (2018)³⁶¹

Por otra parte, la producción de radicales libres mediante fuentes endógenas puede ocurrir como resultado de la exposición a contaminantes ambientales, metales pesados, algunos medicamentos (ciclosporina, tacrolimus, gentamicina y bleomicina), solventes químicos, cocción (carne ahumada, aceite usado y grasas), humo de cigarrillo, alcohol y radiaciones^{349,362-364}. Cuando estos compuestos exógenos ingresan al cuerpo, se degradan o metabolizan y los RL se generan como subproductos.

1. Introducción

1.5.3. Daño oxidativo a macromoléculas y ácidos nucleicos

1.5.3.1. Lípidos

Los RLs hidroxilo, hidroperoxilo y oxígeno singlete, pueden reaccionar con los lípidos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos y un radical alquilo, lo que se conoce como peroxidación lipídica. El alquilo formado reacciona con una molécula de oxígeno para generar la especie reactiva inicial, lo que constituye una cadena que se repite constantemente³⁶⁵⁻³⁶⁸.

Este proceso de daño a lípidos inicia cuando el radical libre sustrae un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metilenos de la cadena carbonada. Los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares son especialmente susceptibles de ser atacados por RLs, debido a que sus dobles enlaces facilitan la sustracción del mencionado átomo de hidrógeno^{369,370}.

Tanto el malondialdehído (MDA) como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) e hidrocarburos gaseosos como el etano y el pentano, son productos derivados de la peroxidación lipídica³⁷¹.

Los aldehídos derivados de la peroxidación lipídica aumentan con la edad y están involucrados en trastornos

relacionados con el envejecimiento. Especialmente, el producto 4-HNE contribuye a la disminución observada en la fluidez de la membrana mitocondrial con el envejecimiento por su interacción con los fosfolípidos de membrana³⁷²

En la presente tesis hemos medido como marcador de daño a lípidos el MDA, el cual se sabe que puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana^{373,374}, generando aún más alteración en su estructura.

1.5.3.2. Proteínas

Las proteínas son la base del funcionamiento celular y fisiológico de los organismos vivos, y sus propiedades físicas y químicas determinan sus actividades y funciones³⁷⁵.

La exposición de proteínas a moléculas pro-oxidantes induce una alteración de las cadenas laterales de aminoácidos, la escisión de la cadena de polipéptidos y su conversión en derivados altamente sensibles a la degradación proteolítica^{376,377}.

Cuando RLs y especies reactivas atacan a las proteínas, pueden generar disfunción en las enzimas, rompimiento de los enlaces peptídicos por radicales superóxido, hidroxilo u

1. Introducción

oxígeno singlete, e interrupción de la regulación de las vías metabólicas^{222,378,379}. En la mayoría de los casos este daño es irreversible. Un ejemplo claro de modificación a proteínas por acción de RLs y especies reactivas, ocurre cuando el hierro de la oxihemoglobina reacciona con el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno. En esta reacción se forma metahemoglobina, la cual es una forma alterada de la hemoglobina que es incapaz de ceder oxígeno a los tejidos³⁸⁰.

Uno de los tipos más comunes de oxidación inducida por RLs y especies reactivas es la carbonilación de proteínas, la cual hemos medido en la presente tesis³⁷⁷. Las proteínas oxidadas deben degradarse para limitar su acumulación, pero la capacidad de degradación de los organismos pierde su eficacia con el envejecimiento y diversas enfermedades lo cual explica, en parte, por qué se encuentran niveles elevados de proteínas oxidadas en la población de edad avanzada y en varios estados patológicos^{376,381,382}. Además del daño por carbonilación, las proteínas están expuestas a la nitrosilación. Este estado de oxidación ocurre cuando los residuos de cisteína son modificados por el óxido nítrico³⁸³.

1.5.3.3. Carbohidratos

A pesar de que esta macromolécula sufre menor daño inducido por estrés oxidativo que los lípidos o las proteínas,

se sabe que la glucosa y otros monosacáridos o azúcares simples y desoxiazúcares pueden sufrir oxidación al reaccionar con el radical hidroxilo^{384,385}. De igual forma, los azúcares complejos o polisacáridos también pueden ser atacados por RLs y fragmentados en unidades más sencillas.

De otra parte, se ha establecido que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones, el cual aparece alterado en la artritis reumatoide³⁸⁶.

1.5.3.4. Ácidos nucleicos

La diana principal de los radicales libres en el ácido desoxirribonucleico (ADN) es la guanina, debido a su potencial de oxidación más bajo entre las bases nitrogenadas³⁸⁷. Entre los subproductos derivados de la modificación oxidativa a las distintas bases, se cuentan más de veinte³⁸⁸, y entre ellos, la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) es la más abundante y su acumulación en el ADN se considera uno de los mejores biomarcadores del estrés oxidativo³⁸⁹. Justamente, su formación se deriva de la oxidación de la guanina.

Hay considerable evidencia que indica que el daño al ADN producido por el ataque de RLs y especies reactivas

1. Introducción

genera aberraciones cromosómicas, debido a las alteraciones químicas que sufren las bases y la desoxirribosa de los ácidos nucleicos³⁹⁰⁻³⁹⁴.

Estas modificaciones químicas que se producen en bases nitrogenadas pueden generar la ruptura de las hebras de ADN produciendo su fragmentación (generando alteraciones en la transcripción génica), a lo que la célula responde con sus mecanismos de supervivencia y reparación en los que, a través de la nucleasa, remueve todo el segmento de nucleótidos dañado para ser reemplazado gracias a la ADN polimerasa I y la ligasa, lo que se conoce como escisión de nucleótidos. En caso de que el daño sea grande, se pueden producir mutaciones que resultarían en carcinogénesis, enfermedades hereditarias o la muerte celular³⁹⁵⁻³⁹⁸.

1.5.4. Sistemas de defensa antioxidante

Los antioxidantes son moléculas que bloquean la acción de las especies reactivas, evitando el daño oxidativo que estas y los RLs producen sobre ácidos nucleicos y macromoléculas mediante el sacrificando su propia integridad molecular³⁹⁹. Pueden interactuar directamente con el agente oxidante formando un radical menos activo, o interferir en la cadena de reacciones oxidativas que

conducen al daño⁴⁰⁰. De igual forma, Chihuailaf y colaboradores. (2001)⁴⁰¹ y Membrillo y colaboradores. (2003)⁴⁰² han descrito a los antioxidantes como moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones. Según Hicks (2006)⁴⁰³, un antioxidante actúa como un donador de electrones, siendo capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción

La defensa antioxidante puede ser tanto de origen endógeno (antioxidantes sintetizados por el organismo) como exógeno (provistos a través de la dieta). De igual forma, los antioxidantes de origen endógeno pueden ser agrupados como enzimáticos y no enzimáticos.

1.5.4.1. Antioxidantes enzimáticos.

Las principales enzimas antioxidantes encargadas de eliminar los RLs y especies reactivas que son producidas durante las reacciones metabólicas, incluyen a la Superóxido Dismutasa (SOD), Glutatión Peroxidasa (GPX) y la Catalasa (CAT).

- ***Superóxido Dismutasa***

Esta enzima es una metaloproteína, es decir, contiene un ión metálico como cofactor en su centro activo (Cu/Zn o Mn). En mamíferos hay identificadas 3 isoformas: Cu/ZnSOD (SOD1) ubicada en el núcleo, citoplasma, peroxisomas, lisosomas y membrana mitocondrial

1. Introducción

externa⁴⁰⁴; MnSOD (SOD2)⁴⁰⁵ ubicada en la membrana mitocondrial interna; y Cu/ZnSOD (SOD3)⁴⁰⁶ ubicada a nivel extracelular.

Su función es la de proteger a las células del daño oxidativo ejercido por el radical superóxido, mediante su conversión a peróxido de hidrógeno y oxígeno.

- **Catalasa**

Es una hemoproteína cuya función depende de la unión del hierro a su sitio activo^{407,408}. Se encuentra en altas concentraciones en hígado y riñón, en bajas concentraciones en epitelios y tejido conectivo, y en menor medida en el tejido nervioso. A nivel celular está localizada en mitocondrias y peroxisomas, siendo estos últimos los que mayor concentración presentan^{399,401}.

La principal función de esta enzima antioxidante es la de convertir el H₂O₂ proveniente de la dismutación del anión superóxido, en agua y oxígeno³⁸⁴



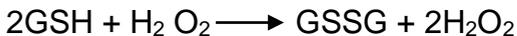
- **Glutación peroxidasa (GPX)**

La GPX es una selenoproteína, es decir, es una enzima selenio dependiente, ubicada en la matriz mitocondrial y en el citosol de los eritrocitos, lisosomas de neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune^{384,399,401}.

Así mismo, en mamíferos se han identificado cinco isoformas (GPX1-GPX5)^{409,410}. Las isoformas GPX1 y GPX4 fueron medidas en la presente tesis.

La GPX posee más afinidad por el H₂O₂ que la CAT, cuando se encuentra a bajas concentraciones. Su función es, precisamente, la de catalizar la reducción de H₂O₂ en H₂O y de hidroperóxidos (ROOH) en H₂O y alcohol (ROH), usando como agente reductor el glutatión reducido (GSH) para generar glutatión oxidado (GSSG) y agua. Sin embargo, en algunos casos usa la tioredoxina o la glutaredoxina como el donante de electrones⁴¹¹⁻⁴¹³.

Cuando el GSH es el donante de electrones, dona un par de iones de hidrógeno con lo cual pasa de su estado reducido (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG), su forma oxidada, de la siguiente manera:



- **NFE2L2**

El factor nuclear (derivado de eritroide), similar al 2 (NFE2L2 o Nrf2), es un gen que codifica al factor de transcripción Nrf2.

1. Introducción

Nrf2 regula la transcripción de una amplia gama de genes que codifican antioxidantes y otras proteínas responsables de la detoxificación de xenobióticos y especies reactivas⁴¹⁴

Bajo condiciones de estrés como el ejercicio físico o el estrés oxidativo, Nrf2 se trasloca desde el citosol al núcleo para promover la transcripción de distintos genes antioxidantes, entre los que se encuentran la GPx y la Glutatión transferasa⁴¹⁵⁻⁴¹⁸.

1.5.4.2. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos también se denominan antioxidantes secundarios. Sin embargo, son indispensables para contrarrestar ciertos tipos de especies reactivas como el radical hidroxilo y el oxígeno singlete, contra los cuales las defensas enzimáticas son ineficaces⁴¹⁹. Para neutralizar estas especies reactivas, los organismos requieren compuestos derivados de alimentos con propiedades antioxidantes entre las que se encuentran carotenoides, melatonina, bilirrubina, vitamina C, vitamina E, ácido úrico, taurina, flavonoides y glutatión⁴¹⁹⁻⁴²³

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es estudiar el papel del entrenamiento físico a largo plazo sobre la función cognitiva y definir marcadores periféricos de los mecanismos neuroprotectores relacionados en sujetos jóvenes y de mediana edad.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1. Evaluar el impacto del ejercicio físico a largo plazo sobre la expresión de genes relacionados con la plasticidad y el trofismo neuronal (BDNF, NTRK2, CATEPSINA B, CREB1 y VEGFA), el envejecimiento (SIRT 1, SIRT 2, SIRT 3 y SIRT 6), la defensa antioxidante endógena (SOD1, SOD2, CATALASA, GPX1 y GPX4) y la inflamación (IL6, IL10 e IL1B) a nivel periférico en sujetos de mediana edad y jóvenes.

Objetivo 2. Estudiar los efectos del ejercicio físico a largo plazo sobre distintas variables cognitivas (memoria, atención, velocidad psicomotora y funciones ejecutivas) y neuropsicológicas (ansiedad, depresión y calidad de sueño) en sujetos de mediana edad.

Objetivo 3. Evaluar los niveles basales de BDNF y CTSB en suero y plasma respectivamente, en sujetos de mediana edad y jóvenes tanto sedentarios como ejercitados.

2. Objetivos

Objetivo 4. Evaluar el impacto del ejercicio físico a largo plazo sobre el daño oxidativo, determinado por los niveles de carbonilación de proteínas y malondialdehído a nivel plasmático en sujetos de mediana edad y jóvenes, tanto sedentarios como ejercitados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y PARTICIPANTES

3.1.1. Características de los participantes

Ochenta y seis sujetos sanos entre 17 y 68 años de edad fueron voluntarios en este estudio. Los sujetos fueron asignados a 4 grupos experimentales: Grupo Sedentario Joven (YSG, del inglés *Young Sedentary Group*; n=21, edad: 17-25 años), Grupo Entrenado Joven (YTG, del inglés *Young Trained Group*; n=16, edad: 18-25 años), Grupo Sedentario de Mediana edad (MSG, del inglés *Middle-aged Sedentary Group*; n=25, edad: 47-67 años) y Grupo Entrenado de Mediana edad (MTG, del inglés *Middle-aged Trained Group*; n= 24, edad: 46-68 años). No hubo diferencias en los años de escolarización entre los grupos de mediana edad.

Los participantes pertenecientes a los YSG y YTG, residían en la provincia de Valencia, mientras que aquellos que formaron parte MSG y MTG tenían su domicilio en la provincia de Barcelona.

Los participantes del YTG eran sujetos que se ejercitaron de forma regular durante los últimos siete años, aunque la duración, frecuencia e intensidad del ejercicio fue heterogénea. Las disciplinas deportivas practicadas incluyeron tenis, atletismo, fútbol y taekwondo.

3. Materiales y métodos

Por su parte, todos los participantes en el MTG fueron jugadores de rugby amateur de los clubes Matusalem, King's PEbrots y Barcelona y habían practicado el deporte a lo largo de su vida (35 ± 15 años de práctica).

Un resumen de las características principales de los participantes, está consignado en las **tablas 3.1 y 3.2**.

Todos los grupos se reclutaron de forma simultánea con excepción del grupo YTG, el cual fue incluido 3 meses después del inicio de los experimentos con el fin de aprovechar el perfil activo y de edad, de un grupo con el que realizábamos un estudio paralelo en la Universidad de Valencia. Por esta razón, no disponemos de los resultados de análisis clínicos, psicológicos y en algunos casos bioquímicos que fueron realizados previos a su inclusión en la presente investigación.

Tabla 3.1. Parámetros sociodemográficos y del estado de salud

	MSG N=25	MTG N=24	YSG N=21	YTG N=16
VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS				
Edad (años)	55.9 ± 5.9	54.3 ± 6.6	20.9 ± 2.2 ***###	19.9 ± 2.0
Escolarización (años)	14.4 ± 3.3	15.0 ± 3.4	ND	ND
Nivel educativo ¹	3.44 ± 1.04	3.58 ± 1.14	3.4 ± 0.8	ND
VARIABLES CLÍNICAS Y GENÉTICAS				
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	28.4 ± 3.9	28.2 ± 2.7	24.2 ± 4.6 **##	22.6 ± 3.2 ***###
Hipertensión (N, %)				
Hipertenso	10 (40%)	10 (41.7%)	1 (4.8%)*, ##	ND
Tratado	5 (20%)	5 (20.8%)	0 (0%)	
Hiperglicemia (N, %)				
Hiperglicémico	5 (20%)	3 (12.5%)	0 (0%)	0 (0%)
Tratado	2 (8%)	1 (4.2%)	0 (0%)	0 (0%)
APOE ε4 (N, %) ²	7 (28%)	5 (21%)	4 (19%)	ND
Traumatismo craneoencefálico ² (N, %)	4 (16%)	12 (50%) *	ND	ND
TABAQUISMO Y HÁBITOS ALIMENTICIOS				
Consumo de tabaco (N, %)				
Nunca	9 (36%)	12 (50%)	13 (62%)	16 (100%)
Ex fumador	8 (32%)	8 (33.3%)	1 (4.8%)	
Actualmente	8 (32%)	4 (16.7%)	7 (33%)	
Consumo de fruta				
Días/semana	6.0 ± 1.6	4.6 ± 2.2	4.0 ± 2.5**	ND
Raciones/semana	13.5 ± 9.2	10.1 ± 10.2	8.1 ± 7.8	
CONSUMO DE VERDURAS				
Días/semana	4.4 ± 2.0	4.2 ± 1.9	4.2 ± 2.4	ND
Raciones/semana	12.3 ± 16.2	7.0 ± 4.8	8.6 ± 6.2	
Frecuencia de consumo de alcohol ³	3.3 ± 1.4	3.0 ± 1.5	2.4 ± 1.5	ND
VARIABLES PSICOLÓGICAS				
Escala de Calificación de Hamilton para la Ansiedad	8.1 ± 1.9	8.0 ± 2.0	9.4 ± 3.2	ND
Escala de Calificación de Hamilton para la Depresión	8.4 ± 1.4	9.1 ± 1.4	8.4 ± 2.5	ND
Índice de Calidad del sueño de Pittsburgh	5.3 ± 2.6	4.7 ± 2.2	5.6 ± 1.8	ND
Cuestionario de Funcionamiento de la Memoria	93.8 ± 10.3	91.7 ± 13.6	84.8 ± 12.3	ND
Cuestionario de Variables de Reserva Cognitiva	13.89 ± 3.0	16.8 ± 3.3*	14.2 ± 2.9##	ND

Los datos son presentados como la media ± DE, excepto en donde el número y el porcentaje son indicados: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparado con MSG, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ comparado con MTG.

Abreviaturas: ND, no determinado.

3. Materiales y métodos

¹Niveles de educación: 1, primaria; 2, estudios elementales de secundaria; 3, estudios básicos de secundaria; 4, estudios superiores

²Sujetos con un alelo (no fueron encontrados sujetos con 2 alelos).

³Consumo de alcohol durante el último año: consumo diario desde 0 a 5.

Tabla 3.2. Parámetros de Actividad Física

IPAQ (MET-min/semana)	MSG	MTG	YSG
AF en el trabajo	30 (0-1091)	0 (0-3990)	0 (0-0)
AF durante un viaje, caminando y en bicicleta	363 (181-990)	477 (132-864)	600 (330-10539)
AF en casa o en el jardín	885 (0-1541)	420 (0-1905)	175 (80-630)
AF durante el tiempo libre	198 (0-531)	3078 (1440-4386)***	0 (0-396)###
Total FA	2298 (1604-3846)	4606 (2962-10647)*	1435 (990-1886)###
STEPS, AF (min/semana)	MSG	MTG	YSG
AF moderada en el trabajo	0 (0-50)	0 (0-0)	0 (0-0)
AF intensa en el trabajo	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
AF caminando y en bicicleta	22 (0-162)	0 =0-124)	100 (30-240)
AF moderada durante el tiempo libre	0 (0-90)	90 (0-240)	0 (0-15)###
AF intensa durante el tiempo libre	0 (0-0)	240 (90-450)***	0 (0-0))###
MLTPAQ (MET-h/año)	MSG	MTG	YSG
Todas las actividades durante el tiempo libre	1379 (751-4702)	3081 (2209-5232)**	1709 (935-2583)###
Rugby	---	742 (546-1181)	---

Los datos son presentados como la mediana (rango intercuartil).
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ comparado con MSG, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ comparado con MTG.

Abreviaturas: AF, actividad física; **MET-h**, equivalente metabólico de tarea por hora; **IPAQ**, cuestionario internacional de Actividad Física; **STEPS**, cuestionario de vigilancia de los factores de riesgo de enfermedades crónicas; **MLTPAQ**, cuestionario de actividad física y tiempo libre.

3.1.2. Recogida de información y criterios de exclusión de los participantes

La historia médica, estilo de vida y frecuencia de entrenamiento de todos los participantes, fueron obtenidas a partir de distintos cuestionarios.

MSG y MTG fueron evaluados con una batería de pruebas cognitivas y cuestionarios psicológicos, con el objetivo de determinar alguna posible diferencia entre el grupo entrenado y sedentario. Los resultados fueron analizados por un neuropsicólogo especializado en ensayos clínicos.

La aplicación de las pruebas fue por el método de goteo, en un mismo día para cada individuo en el Departamento de Psiquiatría y Psicobiología Clínica de la Universidad de Barcelona, entre las 10:00 y las 15:00h

Los sujetos fueron excluidos si presentaban deficiencias cognitivas, si actualmente tomaban alguna droga neuroactiva, si se suplementaban con antioxidantes o fumaban sustancias alucinógenas.

3. Materiales y métodos

En YSG y MSG también fueron excluidos aquellos sujetos que reportaron 150 o más minutos semanales de actividad física de moderada intensidad, en la versión corta del Cuestionario Internacional de Actividad Física (IPAQ).

3.1.3. Comité ético

Todos los sujetos fueron informados del objetivo del estudio de manera verbal y escrita, incluyendo los riesgos potenciales. Antes del inicio del estudio, los consentimientos informados fueron debidamente diligenciados y entregados por los participantes. Todos los procedimientos fueron acordes con los principios éticos de la declaración de Helsinki. Debido a la colaboración realizada con la Universidad de Barcelona y el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, los protocolos fueron aprobados por el comité de ética del Hospital Clínico de Barcelona, España.

3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

La obtención de las muestras sanguíneas de los sujetos jóvenes (YSG y YTG) fueron realizadas en la ciudad de Valencia, mientras que las muestras de los de mediana edad (MSG y MTG) fueron obtenidas en Barcelona.

En ambos casos las extracciones se realizaron en ayunas, y a los sujetos se les pidió que no realizaran ejercicio físico en las 24 horas previas a la extracción, la cual se realizó entre las 8:00 y las 10:00 a.m.

3.2.1. Obtención de plasma sanguíneo

Las muestras de sangre de todos los sujetos fueron obtenidas por punción en la vena antecubital, en tubos Vacutainer® con EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético, por sus siglas en inglés), Ref 367525. Inmediatamente después de la extracción, se agitó el tubo entre 8 y 10 veces y se centrifugo a 2000 g (10 minutos, 4° C). Para ello se utilizó una centrífuga marca Selecta. Posterior, se transfirió el sobrenadante a 2 ó 3 tubos eppendorfs de 2 mL de capacidad, utilizando una pipeta Eppendorf. Finalmente, se almacenaron las muestras en un congelador de -80° hasta ser utilizadas para los análisis bioquímicos, o enviadas a Valencia o Barcelona.

3.2.2. Obtención de suero sanguíneo

Para la obtención del suero se utilizaron tubos Vacutainer® Ref 366468, BD. Inmediatamente después de la extracción, se agitó el tubo entre 8 y 10 veces y se dejó coagular durante 60 minutos (10 minutos a temperatura ambiente, y

3. Materiales y métodos

50 minutos a 4°C). Pasado este tiempo, se centrifugo a 2000 (RCF) (10 minutos, 4°C). Para ello se utilizó una centrífuga marca Selecta. Posterior a esto, se transfirió el sobrenadante a 2 ó 3 tubos eppendorfs de 2 mL de capacidad, utilizando una pipeta Eppendorf. Finalmente, se almacenaron las muestras en un congelador de -80° hasta ser utilizadas para los análisis bioquímicos, o enviadas a Valencia o Barcelona.

3.2.3. Obtención de sangre para ARN

Las muestras de sangre de todos los sujetos fueron obtenidas por punción en la vena antecubital en 2 tubos de 3mL (TEMPUS blood RNA, Ref 4342792, Applied Biosystems). Inmediatamente después de la extracción, se agitó el tubo vigorosamente durante 10-15 segundos, y se almacenaron a -80° hasta ser enviadas a Barcelona.

3.2.4. Obtención de sangre para ADN

Las muestras de sangre de todos los sujetos fueron obtenidas por punción en la vena antecubital, en 1 tubo de 10mL con EDTA (Ref 367525, BD). Inmediatamente después de la extracción, se agitó el tubo vigorosamente entre 8 y 10 veces, y se almacenaron a -80° hasta ser enviadas a Barcelona para los análisis respectivos.

3.3. CUESTIONARIOS DE ACTIVIDAD FÍSICA Y ESTILO DE VIDA

El mismo día de la extracción de sangre los participantes respondieron los cuestionarios de actividad física y estilo de vida, que se explican a continuación:

- ***Método STEPwise para la vigilancia de los factores de riesgo de enfermedades crónicas (STEPS)***

Es un método simple y estandarizado para recoger, analizar y diseminar datos en los países miembros de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés *World Health Organization*). La información solicitada incluye datos relacionados con la hipertensión, hiperglicemia, peso corporal y estatura, hábito tabáquico, hábitos de dieta (incluyendo consumo de alcohol), y hábitos de actividad física⁴²⁴.

- ***Cuestionario internacional de actividad física (IPAQ, del inglés *International Physical Activity Questionnaire*), versión larga***

Es un instrumento para monitorizar la actividad física y la inactividad en el ámbito de la investigación, durante los últimos 7 días⁴²⁵. Los resultados fueron calculados como el equivalente metabólico semanal (MET-h) para las distintas categorías de la actividad física.

3. Materiales y métodos

Un equivalente metabólico (por sus siglas en inglés, *MET*) es un parámetro usado para expresar la intensidad de la actividad física realizada, y equivale a un consumo de 1 kcal/kg/h mientras la persona está sentada. En este caso, MET-h hace referencia a la cantidad de energía utilizada por el organismo estando sentado en 1 h. Ante una actividad física de tipo moderado, el consumo calórico puede ser entre 3 y 6 veces mayor (3-6 MET), y más de 6 veces cuando se realiza actividad física vigorosa (> 6 MET).

- **Cuestionario de actividad física en el tiempo libre de Minnesota** (*MLTPAQ*, del inglés *Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire*)

Este cuestionario cuantifica la tasa metabólica de diferentes actividades físicas de ocio y domésticas realizadas durante los últimos 12 meses⁴²⁶. Son 63 actividades que se dividen en 8 categorías: caminar, actividades acuáticas, ejercicios de acondicionamiento físico, actividades de invierno, actividades en el jardín, deportes, bricolaje, caza y pesca.

La frecuencia de las actividades se evalúa mes a mes, como "números promedio de veces por mes". Cada actividad física tiene su propio código de intensidad (MET). Los valores se calcularon como MET-h total anual.

3.4. TEST NEUROPSICOLÓGICOS

Todos los sujetos de MSG y MTG realizaron la siguiente batería de test neuropsicológicos entre las 9.00 y las 15.00h en días distintos.

- **Test de recuerdo libre y selectivamente facilitado**
(*FCSRT, del inglés Free and Cued Selective Reminding Test*)

En esta prueba, el aprendizaje y la memoria verbal declarativa se evalúan utilizando una lista de 16 palabras que deben recordarse a lo largo de tres intentos. Tanto la memoria inmediata como la memoria a largo plazo se evalúan con la ayuda de pistas semánticas⁴²⁷. Las puntuaciones se dan por el recuerdo inmediato libre, el recuerdo total inmediato, el recuerdo demorado libre y el recuerdo demorado total⁴²⁸.

Para iniciar el test, a cada participante se le entregaron 4 tarjetas, cada una con 4 artículos diferentes. Cada artículo perteneciente a una categoría distinta. Los participantes fueron evaluados individualmente, y antes de la prueba se les habló de los elementos que tenían que recordar más tarde. Se les pidió a los participantes que leyeran todos los ítems en voz alta y luego se le pidió que identificara el nombre de cada uno de ellos (por ejemplo, "banana") cuando el evaluador dijo su clave de categoría (por

3. *Materiales y métodos*

ejemplo, "fruta"). Este procedimiento continuó hasta que los 16 elementos se leyeron e identificaron correctamente. Después de una tarea de interferencia no semántica que duró 20 s, que consistió en contar hacia atrás para evitar el recuerdo de la memoria a corto plazo, el sujeto intentó recordar libremente tantos elementos como fuera posible, en cualquier orden. El tiempo permitido para esta tarea fue de 90s. La tarea se detuvo si no había respuesta en 15s. Los artículos que no fueron recordados espontáneamente fueron indicados por el examinador (por ejemplo, "¿Cuál era una fruta?"). Las "pistas" de categoría se presentaron para obtener el recuerdo de los elementos que no se recordaron libremente. Este procedimiento fue repetido tres veces. Pasados 30m se volvió a realizar la prueba, con el objetivo de evaluar el recuerdo demorado. Cada prueba se puntuó por el número de artículos recordados libremente, el número de artículos recordados después de las "pistas" y el recuerdo demorado (libre y facilitado).

Por lo tanto, en nuestro estudio se consideraron cuatro puntuaciones: (a) Recuerdo libre total inmediato (prueba 1 de recuerdo inmediato libre + prueba 2 de recuerdo libre + prueba 3 de recuerdo libre; puntuación máxima, 48); (b) Recuerdo inmediato total facilitado (prueba 1 de recuerdo facilitado + prueba 2 de recuerdo facilitado + prueba 3 de recuerdo facilitado; puntuación máxima, 48); (c) Recuerdo

demorado libre (puntuación máxima, 16); (d) Recuento demorado facilitado (puntuación máxima, 16).

- **Test del trazo** (*TMT, del inglés Trail Making Test*)

En la parte A de la prueba TMT, una serie de números impresos en una hoja de papel deben conectarse usando una línea dibujada con lápiz, siguiendo la secuencia numérica (de menor a mayor) lo más rápido posible. Esta sub-prueba evalúa la atención y la velocidad psicomotora. En el TMT parte B, los números y las letras intercaladas se deben unir en orden numérico y alfabético⁴²⁹. Esta sub-prueba también evalúa un componente de las funciones ejecutivas.

Un tiempo más corto en segundos para completar el TMT-A o TMT-B, indica una mejor respuesta.

- **Prueba de modalidad de dígitos y símbolos** (*SDMT, del inglés Symbol Digit Modalities Test*)

Esta prueba mide la velocidad y la atención psicomotora a través de una tarea de sustitución en la que los símbolos geométricos, enumerados repetidamente al azar, deben emparejarse con los números correspondientes del 1 al 9. La puntuación es el número de sustituciones correctas realizadas en 90 segundos⁴³⁰.

3. Materiales y métodos

- **Escala de inteligencia para adultos, cuarta edición**
(*WAIS-IV, del inglés Wechsler Adult Intelligence Scale*)

La prueba WAIS fue diseñada para medir la inteligencia y las habilidades cognitivas en la práctica clínica⁴³¹. En la presente tesis usamos varias sub-pruebas de la versión actual WAIS-IV. La sub-prueba de dígitos directos evalúa la atención y la memoria de trabajo, la sub-prueba de dígitos inversos evalúa las funciones ejecutivas, trabajando memoria y vocabulario, así como nivel intelectual premórbido.

- **Fluidez verbal**

Las funciones ejecutivas también son evaluadas mediante tareas de fluidez verbal donde los participantes deben pronunciar tantas palabras como sea posible, de una categoría semántica determinada o que comiencen con una letra determinada, durante un minuto⁴³². La puntuación es el número de palabras pronunciadas.

- **Prueba de color y palabra (*Stroop test*)**

La tarea automática de leer una lista de palabras o nombres de colores interfiere con la tarea solicitada de nombrar el color de tinta de las palabras, se conoce como el efecto Stroop. Una puntuación de los aciertos correctos mide la velocidad de procesamiento y la función ejecutiva de inhibición⁴³³.

- **Prueba Neuropsicológica de Cambridge Batería Automatizada** (*CANTAB, del inglés Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery*)

Las pruebas CANTAB son programas computarizados diseñados para evaluar varias áreas cognitivas⁴³⁴. En la presente tesis usamos las pruebas de Memoria de trabajo Espacial (por sus siglas en inglés *SWM*), Aprendizaje de Asociación Pareada (por sus siglas en inglés *PAL*) y Procesamiento Rápido de información Visual (por sus siglas en inglés *RPV*).

3.5. CUESTIONARIOS PSICOLÓGICOS

En la presente tesis pedimos a los sujetos de los YSG, MSG y MTG que cumplimentaran las siguientes escalas y cuestionarios:

- **Escala de calificación de Hamilton para la ansiedad (Hamilton-A)**

Califica catorce grupos de síntomas de ansiedad, en una escala de 0 a 5 puntos. Los puntajes de 0 a 17 indican ausencia de ansiedad o ansiedad leve; 18 a 24 indican ansiedad leve a moderada; y 24 a 30 indican ansiedad moderada a severa⁴³⁵.

3. Materiales y métodos

- **Escala de calificación de Hamilton para la depresión (Hamilton-D)**

Califica diecisiete síntomas de depresión en una escala de 0 y 3 puntos. Las puntuaciones de 0-7 indican ausencia de depresión y 20 o más indican, al menos, depresión moderada⁴³⁶.

- **Índice de calidad de sueño de Pittsburgh** (*PSQI, del inglés Pittsburgh Sleep Quality Index*)

Califica siete componentes de la calidad del sueño en una escala de 0 a 3. El puntaje general varía de 0 a 21, con puntajes bajos de 0-5 que indican una buena calidad del sueño⁴³⁷.

- **Cuestionario de funcionamiento de la memoria** (*MFQ, del inglés Memory Functioning Questionnaire*)

Es una escala de 7 ítems, con cada ítem calificado de 1 a 7 que incluye diferentes aspectos de la autoevaluación de la memoria, el olvido y el uso de mnemotécnicos. Las puntuaciones más altas indican un mejor funcionamiento de la memoria autovalorada⁴³⁸.

- **Cuestionario de variables de reserva cognitiva**

Otorga una puntuación compuesta por la presencia de estilos de vida considerados para aumentar la reserva cognitiva incluyendo nivel de educación (formación

académica), actividades de ocio de tipo social, intelectual y física.⁴³⁹. En la validación de esta puntuación de reserva cognitiva, los autores informaron que los adultos cognitivamente sanos mayores de 65 años obtuvieron una puntuación de 7 a 11, mientras que los sujetos con deterioro cognitivo obtuvieron solo entre 3 y 7 puntos⁴³⁹.

3.6. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS

3.6.1. Extracción y análisis del ARN

El aislamiento del ARN fue realizado utilizando el mirVana RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), NanoDrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración de las muestras se evaluaron el mismo día de la extracción, usando un espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente las muestras fueron alicuotadas y almacenadas a -80°C.

Para obtener cDNA, las muestras de ARN fueron retrotranscritas usando *random priming and Superscript Reverse Transcriptase* (Life Technologies), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, la expresión génica fue medida con sondas TaqMan específicas (Applied Biosystems) en un sistema de detección CFX96 Real-Time qPCR (Bio-Rad, Hercules,

3. Materiales y métodos

CA, USA). Los datos fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y normalizados a dos controles internos (PGK1 y B2M). los resultados fueron expresados en relación al grupo control (MSG). Los genes analizados son descritos en la **tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Sondas usadas para medir los niveles de ARNm por RT-qPCR

Símbolo del Gen	Descripción	TaqMan ID	Secuencia de Referencia NCBI
SIRT1	Sirtuína 1	Hs01009006_m1	NM_00114 2498.1
SIRT2	Sirtuína 2	Hs00247263_m1	NM_00119 3286.1
SIRT3	Sirtuína 3	Hs00953477_m1	NM_00101 7524.2
SIRT6	Sirtuina 6	Hs00966002_m1	NM_00119 3285.2
CAT	Catalasa	Hs00156308_m1	NM_00175 2.3
SOD2	Superóxido dismutasa 2, mitocondrial	Hs00167309_m1	NM_00063 6.3
GPX1	Glutación peroxidasa 1	Hs00829989_gH	--
GPX4	Glutación peroxidasa 4	Hs00989766_g1	NM_00103 9847.2

3. Materiales y métodos

NFE2L2	El factor relacionado al factor nuclear Eritroide 2	Hs00975961_g1	NM_00114 5412.3
IL6	Interleucina 6	Hs00174131_m1	NM_00060 0.4
IL10	Interleucina 10	Hs00961622_m1	NM_00057 2.2
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro	Hs02718934_s1	NM_00114 3805.1
NTRK2 o TRKB	Receptor neurotrófico tirosina quinasa 2, o receptor tipo tirosina quinasa B	Hs00178811_m1	NM_00100 7097.2
CREB1	Proteína de respuesta de unión al AMPc1	Hs00231713_m1	NM_00132 0793.1
CATHEP SIN B	Catepsina B	Hs00947433_m1	NM_00131 7237.1
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A	Hs00900055_m1	NM_00102 5366.2

3. Materiales y métodos

3.6.2. Extracción y análisis del ADN

La extracción de ADN fue realizada usando el kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Fitchburg, WI, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las muestras de ADN fueron analizadas para determinar la distribución del alelo APOE. El gen APOE es polimórfico en dos nucleótidos individuales (rs429358 y rs7412), lo que da como resultado los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. APOE $\epsilon 4$ es considerado un factor de riesgo para diversas afecciones asociadas con la pérdida cognitiva en la edad avanzada

Los análisis fueron realizados mediante qPCR, usando una combinación de dos sondas TaqMan marcadas doblemente con 6-carboxifluoresceína (FAM) y fluorescentes VIC (Ensayos de Genotipado SNP Taqman, Applied Biosystems), que demostraron las diferentes combinaciones de los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ ⁴⁴⁰.

3.6.3. Determinación de BDNF por ELISA

Para estudiar BDNF en sangre periférica, generalmente se prefiere el suero al plasma y la sangre total. Esto se debe al hecho de que el suero sanguíneo ha sido el estándar convencional para la mayoría de los análisis bioquímicos. La concentración de BDNF periférico muestra una enorme variabilidad debido a varios factores metodológicos que

resultan en modificaciones en sus niveles en suero humano. Dos factores importantes son el tiempo en que la sangre se deja coagular antes de la extracción de suero y la temperatura a la que se produce la coagulación. Ambos fueron estrictamente controlados en nuestro estudio.

- **Objetivo del método**

La técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés, enzyme-linked immunosorbent assay) tiene cuatro variantes: ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA competitivo y ELISA tipo sándwich. En la presente tesis hemos usado ELISA tipo sándwich.

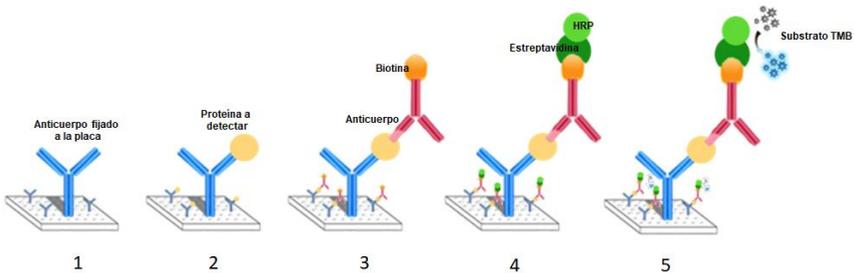


Figura 3.1. Pasos para desarrollar el método ELISA.

- **Reactivos**

Los reactivos que se muestran a continuación vienen incluidos en el kit ELISA utilizado (Catalogue Number: BEK-2211-1P/2P. BiosensisRapid™Mature BDNF, Australia).

3. Materiales y métodos

- Placa 96 pocillos pre-incubada con anticuerpo monoclonal de captura anti-BDNF maduro.
- Patrón de BDNF maduro (humano).
- Tampón de lavado.
- Diluyente.
- Anticuerpo monoclonal biotinilado anti-BDNF maduro.
- Estreptavidina-HRP conjugada.
- 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB).
- Solución para detener la reacción (TMB stop solution).

• Procedimiento

El protocolo para la realización del ELISA fue realizado a partir de las instrucciones del fabricante.

1. El mismo día del experimento realizamos una dilución 1/250 de las muestras de suero, utilizando el tampón de dilución de la muestra contenido en el kit.

2. se realizó una recta patrón a partir de la reconstitución de la proteína (BDNF) liofilizada, en 1 mL de tampón de dilución provisto en el kit, siendo éste el punto más alto de la recta (1000 pg/mL). Seguidamente se hicieron diluciones seriadas como lo indica la **figura 3.2**.

3. Materiales y métodos

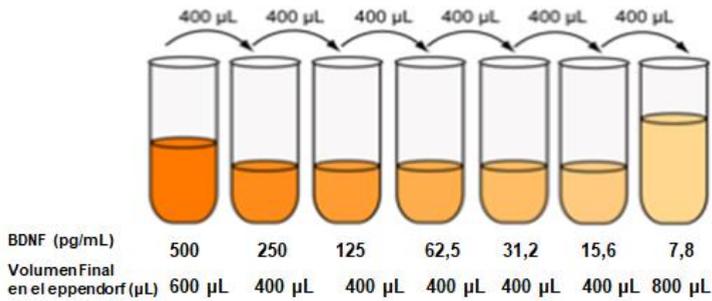


Figura 3.2. Diluciones seriadas a partir de una concentración conocida de BDNF.

3. Se añadieron 100 µL de muestras o de patrón a cada uno de los pocillos en la placa. Cada muestra y punto de la recta patrón fue analizada por duplicado. La placa fue sellada y se dejó incubando a temperatura ambiente y en agitación (140rpm) durante 45 minutos.

4. Seguidamente se realizaron 5 lavados con 200 µL de tampón de lavado 1x por pocillo.

5. Posteriormente se añadieron 100 µL de anticuerpo (anti-BDNF maduro biotinilado previamente diluido al 1x) en cada pocillo. Nuevamente se selló la placa para incubarse durante 30 minutos en agitación (140rpm) a temperatura ambiente.

6. Nuevamente se realizaron 5 lavados como en el paso número 3.

3. Materiales y métodos

7. Se añadieron 100 μL del complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa 1x en cada pocillo, y se dejó incubando la placa en las mismas condiciones que en los pasos 3 y 5.

8. Se realizaron 5 lavados como en los pasos 3 y 6.

9. Seguidamente se añadieron 100 μL de TMB en cada pocillo, y se dejó incubar la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

10. Por último, se paró la reacción al añadir 100 μL del reactivo TMB stop.

11. La absorbancia se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm dentro de los 15 minutos posteriores al paso anterior.

3.6.4. Determinación de Catepsina B por ELISA

Para la detección de Catepsina B en plasma también se usó el método de ELISA tipo sándwich, por lo que el principio fue el mismo que al medir BDNF, aunque los tiempos de incubación fueron diferentes.

- **Reactivos**

Los reactivos que se muestran a continuación vienen incluidos en el kit utilizado (Catalogue Number: ab119584 - Cathepsin B Human ELISA Kit- abcam).

- Placa 96 pocillos pre-incubada con anticuerpo monoclonal de captura anti-Human Cathepsin B.
- Patrón liofilizado de *Human Cathepsin B*.
- Diluyente de muestras y patrón.
- Complejo de Avidina-Biotina-peroxidasa (ABC).
- Diluyente del complejo ABC.
- Anticuerpo monoclonal biotinilado anti-Human Cathepsin B.
- Diluyente del anticuerpo.
- 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB).
- Solución para detener la reacción (*TMB stop solution*).

- **Procedimiento**

El protocolo para la realización del ELISA fue realizado a partir de las instrucciones del fabricante.

1. El mismo día del experimento realizamos una dilución 1/15 de las muestras de plasma, utilizando el tampón de dilución de la muestra contenido en el kit.
2. Se realizó una recta patrón a partir de la reconstitución de la proteína (Cathepsina B) liofilizada, en 1 mL de tampón de dilución provisto en el kit, siendo este el punto más alto

3. Materiales y métodos

de la recta (10 ng/mL). Seguidamente se hicieron diluciones seriadas. como lo indica la **figura 3.3**.

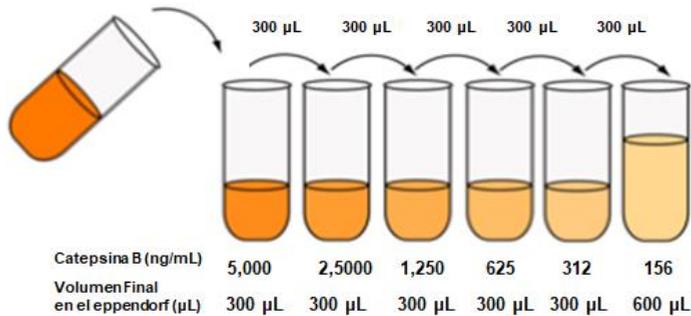


Figura 3.3. Diluciones seriadas a partir de una concentración conocida de Catepsina B.

3. Se añadió a los pocillos 100 µL de muestras o de patrón. Cada muestra y punto de la recta patrón fue analizada por duplicado. La placa fue sellada y se dejó incubando a 37°C durante 90 minutos.

4. Seguidamente se descartó el contenido de los pocillos utilizando un lavador de placas de ELISA

5. Posteriormente se añadieron 100 µL de anticuerpo (anti-Human Cathepsin B biotinilado previamente diluido del 20x al 1x) en cada pocillo, y nuevamente se selló la placa para incubarse a 37°C durante 60 minutos.

6. Se realizaron 3 lavados, cada uno con PBS 0.01 M (Phosphate Buffered Saline, por sus siglas en inglés), con 1 minuto de espera entre cada lavado.

7. Se añadieron 100 μL del complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa en cada pocillo, y se dejó incubando la placa a 37°C durante 30 minutos
8. Se realizaron 5 lavados con PBS 0.01 M, con 1 minuto de espera entre cada lavado.
9. Seguidamente se añadieron 90 μL de TMB en cada pocillo, y se dejó incubar la placa a 37°C durante 25 minutos (esta vez en la oscuridad)
10. Se añadieron 100 μL del reactivo TMB stop para frenar la reacción
11. Finalmente, se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm dentro de los 30 minutos posteriores al paso anterior.

3.6.5. Determinación de IL1 β por ELISA

Para la detección de IL1 β en plasma también se usó el método de ELISA tipo sándwich.

- **Reactivos**

Los reactivos que se muestran a continuación vienen incluidos en el kit utilizado (Catalogue Number: HSLBOOD Quantikine HS ELISA- Human IL1 β Immunoassay. R&D SYSTEMS a biotechne Brand).

3. *Materiales y métodos*

- Placa 96 pocillos pre-incubada con anticuerpo monoclonal de captura Human IL1 β .
- Patrón liofilizado de Human IL1 β .
- Diluyente de muestras y patrón.
- Estreptavidina-HRP (100X).
- Diluyente de estreptavidina-HRP.
- Anticuerpo monoclonal biotinilado anti- Human IL1 β .
- Diluyente del anticuerpo.
- Reactivo de color A.
- Reactivo de color B.
- Solución para detener la reacción (*TMB stop solution*).

• **Procedimiento**

El protocolo para la realización del ELISA fue realizado a partir de las instrucciones del fabricante.

1- El mismo día del experimento realizamos una dilución 1/2 de las muestras de plasma, utilizando el tampón de dilución (*calibrator diluent*) de la muestra contenido en el kit.

2- Se realizó una recta patrón a partir de la reconstitución de la proteína (IL-1 β) liofilizada, en 1 ml de agua Milli-Q, para obtener un patrón con una concentración de 80 pg/ML.

3. Materiales y métodos

Seguidamente, en un eppendorf aparte, se añadieron 900 μL de *calibrator diluent* y 100 μL del patrón que se había reconstituido previamente. Ésta dilución constituyó el punto más alto de la recta patrón (8 pg/mL). Seguidamente se hicieron diluciones seriadas hasta el punto más bajo de la curva, el cual tuvo una concentración de 0.125 pg/mL.

3. Se añadió a cada pocillo 50 μL de *assay diluent*, provisto en el kit. Seguidamente agregamos 100 μL de la respectiva dilución de cada muestra, o del patrón, a su respectivo pocillo. Cada muestra y punto de la recta patrón fue analizada por duplicado. La placa fue sellada y dejada incubando a temperatura ambiente y en agitación durante 2 horas, a 500 rpm.

4. Seguidamente, utilizando un lavador de placas de ELISA, se descartó el contenido de los pocillos y se efectuaron 4 lavados con un volumen de 400 μL cada vez, con el tampón de lavado diluido previamente al 1x con agua destilada. Entre cada lavado se dejó un tiempo de 45 s de espera.

5. Posteriormente se añadieron 200 μL de anticuerpo (Human IL1 β) en cada pocillo, y nuevamente se selló la placa para incubarse a temperatura ambiente y en agitación, como en el paso 3, durante 60 minutos.

6. Se repitieron los lavados como en el paso 4.

3. Materiales y métodos

7. Se añadieron 200 μL del estreptavidina-HRP (1X) en cada pocillo, y se dejó incubando la placa durante 30 minutos, nuevamente a temperatura ambiente y en agitación.

8. Se repitieron los lavados como en el paso 4.

9. Seguidamente se añadieron 50 μL del reactivo *substrate solution* (el cual tuvimos que preparar previamente al mezclar dos volúmenes iguales del reactivo de color A y el reactivo de color B), en cada pocillo, para estimular la actividad de la enzima HRP y se dejó incubar la placa en la oscuridad, sin agitación, por 30 minutos.

10. Posteriormente se añadieron 50 μL del reactivo *stop solution* para frenar la reacción

11. Finalmente, dentro de los 30 minutos siguientes, se midió en el espectrofotómetro a dos longitudes de onda (450 nm y 570nm), y el valor de la absorbancia de la segunda se le restó a la primera, y los resultados fueron interpolados en una recta patrón.

3.6.6. Cuantificación de proteínas por el método Lowry

- **Objetivo del método**

El método de Lowry es un ensayo espectrofotométrico para cuantificar proteínas, propuesto en 1951 por Oliver H.

Lowry⁴⁴¹ y se basa en dos reacciones químicas. La primera reacción es la reducción de los iones de cobre en condiciones alcalinas, lo que forma un complejo con los enlaces peptídicos (reacción de Biuret). Estos complejos Cu^{2+} -proteína muestran un característico color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. La segunda, es la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por el complejo cobre-enlace peptídico, en donde el Cu^{2+} actúa como catalizador. El principal componente del reactivo de Folin es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul oscuro en la solución, y puede ser detectado con un espectrofotómetro en un rango de 500 a 750 nm⁴⁴². La cantidad de proteína en la muestra puede ser estimada interpolando los valores de la absorbancia obtenidos, en una recta de calibrado de una sustancia cuya concentración es conocida y ha sido tratada con el mismo método que nuestras muestras. La proteína que hemos usado en este ensayo, fue la albúmina de suero bovino (*BSA por sus siglas en inglés, bovine serum albumin*).

3. *Materiales y métodos*

- **Reactivos**

- **Reactivo Lowry:**

Se prepara a partir de la adición de 40 mL de agua Milli-Q a la botella de reactivo Lowry, y mezclar hasta disolver, con la botella protegida de la luz.

Guardar a temperatura ambiente.

- **Reactivo Folin-Ciocalteu:**

El reactivo que se usa en el método Lowry, debe estar previamente preparado en una dilución 1/6 a partir de la solución Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, en una botella de vidrio topacio, y almacenado a temperatura ambiente.

- **Procedimiento**

Antes de empezar el procedimiento para cuantificar proteínas mediante el método de Lowry, realizamos una dilución 1/15 de la muestra de plasma utilizando como diluyente agua Milli-Q. Una vez hecho esto, procedimos de la siguiente forma:

1. Preparamos una recta patrón seriada de diluciones de BSA conocidas, las cuales se procesaron en iguales condiciones que las muestras. Las diluciones preparadas fueron: 10- 5- 2,5- 1- 0,5- 0,1 mg/mL

2. Pipeteamos 490 μL de agua Milli-Q y 10 μL de cada muestra (dilución 1/15) o patrón en un tubo Eppendorf y seguidamente se añadieron 500 μL del reactivo de Lowry. Seguidamente vorteamos vigorosamente cada eppendorf durante 5 segundos, y los dejamos incubando durante 20 min en la oscuridad.

3. Añadimos 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu e incubamos 30 min en la oscuridad, y posteriormente medimos la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro Marca Jenway 7315.

4. Para calcular los resultados, restamos a todos los valores de absorbancia el valor de la muestra "blanco" (solo lleva agua Milli-Q y reactivos) e interpolamos la absorbancia de las muestras en la de la recta patrón construida a partir de las concentraciones conocidas de BSA.

El valor que se utiliza para hacer la recta y para calcular la concentración de las muestras es: $\Delta\text{Abs} = \text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}$.

3.6.7. Determinación de los niveles de Malondialdehído (MDA) por HPLC

La peroxidación lipídica en plasma fue determinada por el método de HPLC (por sus siglas en inglés, High

3. Materiales y métodos

Performance Liquid Chromatography), como fue previamente descrito ⁴⁴³. De manera resumida, este método está basado en la hidrólisis de lipoperóxidos y la formación de un aducto entre el ácido 2-triobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés) y el MDA liberado (thiobarbituric acid-MDA₂). Ya que el ácido TBA reacciona con distintos grupos carbonilos presentes en la muestra, además de con el MDA proveniente de los lipoperóxidos, se realiza la separación por HPLC en fase reversa del aducto TBA-MDA del resto de las sustancias reaccionantes presentes en las muestras, y se cuantifica a 532nm (Ultimate 3000 Dionex).

• **Reactivos**

- Bomba marca Shimadzu, modelo LC-10 AD.
- Autoinyector marca Shimadzu, modelo SIL-10AD vp.
- Detector UV Shimadzu, modelo SPD-10 AV.
- Controlador del equipo marca CBM-10 A.
- Ordenador marca IBM XT, modelo 486 (programa de integración Classic10).
- Columna marca Teknokroma (de fase reversa), modelo Spherisorb C18 (dimensiones 15 x 0.46cm y 5µm de diámetro partícula).

3.6.8. Determinación de los niveles de proteínas carboniladas por Western blotting

- **Objetivo del método**

Las especies reactivas de oxígeno han sido implicadas en el envejecimiento, apoptosis, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades crónicas inflamatorias, enfermedades pulmonares, y enfermedades cardiovasculares^{420,444}.

Las proteínas son una de las principales dianas de los ROS y otras especies reactivas. La modificación oxidativa de las proteínas cambia las cadenas laterales de la metionina, histidina y tirosina, y forma enlaces disulfuro de cisteína^{445,446}, lo cual produce alteraciones en su función y las hace más susceptibles a la degradación. La modificación oxidativa de proteínas puede modular características bioquímicas de éstas, tales como la actividad enzimática⁴⁴⁷, la actividad de unión al DNA de los factores de transcripción⁴⁴⁸, y la susceptibilidad a la degradación proteolítica⁴⁴⁶.

La oxidación de proteínas introduce grupos carbonilos (aldehídos y cetonas) en los residuos de lisina, arginina, prolina o treonina^{445,447}. Estos grupos carbonilo pueden ser detectados mediante el Western Blotting. Cuando se derivatizan las muestras con 2,4-dinitrofenilhidrazina

3. Materiales y métodos

(DNPH) se marcan los grupos quedando 2,4-dinitrofenilhidrazona la cual puede ser detectada mediante anticuerpos específicos.

- **Reactivos**

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

- **Procedimiento**

La modificación oxidativa de las proteínas totales se evaluó mediante la detección de inmunotransferencia de grupos carbonilo de proteínas, utilizando el kit “OxyBlot” de oxidación de proteínas (Millipore, Madrid-España) según las instrucciones del fabricante.

- **Derivatización de la muestra**

A partir de 12 µg de muestra, tomados de la dilución 1/15 que hicimos previamente para medir proteínas por Lowry, iniciamos el proceso de derivatización:

1. En un eppendorf que ha de contener los 12 µg de muestra (p.e. 3 µL), le añadimos una determinada cantidad de agua Milli-Q hasta completar 5 µL de volumen (para este ejemplo, añadimos 2 µL).
2. Se agregan 5 µL de SDS al 12% para desnaturalizar las proteínas.

3. Se añaden 10 μL de solución DNPH al 1x, y se dejan incubando los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos.

4. Durante esos 15 minutos de incubación se prepara, en un tubo diferente, una solución que contiene el reactivo de neutralización (7,5 μL por muestra) y Mercaptoetanol (1,4 μL por muestra).

5. Pasado el período de incubación, añadimos a cada muestra 8,9 μL de la solución preparada en el paso anterior. Con lo cual termina el proceso de derivatización de la muestra.

- **Condiciones del gel y transferencia**

Una vez derivatizadas las muestras, están preparadas para cargarlas en el gel de poliacrilamida. La proteína se carga en geles discontinuos al 12% de acrilamida (29/1 Acrilamida: Bisacrilamida) con SDS al 10%, sobre los que se aplica un campo eléctrico constante de 100 Voltios durante casi 2 horas, en un tampón preparado previamente (25 mM Tris, 200 mM de glicina, SDS 10%, pH 8,3). Una vez realizada la electroforesis, el gel es transferido (Western Blotting) a una membrana de PVDF, mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Miniprotean II (Bio-Rad, USA). El proceso se desarrolla durante 90 minutos, a una temperatura de 4°C a

3. *Materiales y métodos*

una intensidad constante de 240 mAmperios, en un tampón de transferencia (25Mm Tris, 192 mM de Glicina, Metanol al 20% v/v).

- **Procedimiento**

Una vez obtenida la membrana, tras la transferencia, se deja incubando durante una hora en una solución de BSA al 1% en PBS-T, para bloquear sitios inespecíficos a los que el anticuerpo se pueda unir.

1. Posterior al bloqueo, se incuban las membranas con el anticuerpo primario. Se debe hacer una dilución 1:150 del anticuerpo en BSA al 1% de PBS-T, y se dejará incubando en agitación durante toda la noche, a una temperatura de 4°C.
2. Posterior a la incubación, se realizan 3 lavados con 10 mL de PBS-T, y entre cada lavado se deja la membrana en agitación durante 10 minutos.
3. Seguidamente, la membrana se incuba durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, proporcionado por el kit, el cual debe haberse diluido en BSA al 1% de PBS-T, en una dilución 1:300.
4. Se repiten los lavados igual que en el paso número 2.

- **Revelado y cálculos**

La membrana fue incubada 1 min con luminol e inmediatamente revelada con un detector quimioluminiscente mediante el programa Image quant LAS 4000 (GE-Healthcare Bio-Sciences). Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato digital tif para poder realizar la densitometría utilizando el programa informático Li-cor Image studio.

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

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software SPSS versión 21 y el programa GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). El nivel de significatividad establecido fue de 0.05, y los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar (DS) para variables de distribución normal, y como la mediana [rango intercuartil IQR)] para variables no normales y número (porcentaje) para variables cualitativas.

3. Materiales y métodos

El supuesto de normalidad para determinar la distribución de los datos fue estudiado mediante la prueba Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de la varianza fue evaluada con el estadístico de Levene. Para comparaciones entre tres grupos, las variables cuantitativas que cumplieron el criterio de normalidad fueron analizadas usando ANOVA de un factor, y la prueba post-hoc Tukey's fue utilizada para realizar múltiples comparaciones. Las variables sin distribución normal fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post-hoc de Dunn, para analizar múltiples comparaciones.

El efecto de la práctica regular de ejercicio físico y la edad sobre BDNF, Catepsina B, MDA, y carbonilación de proteínas, fue evaluado usando ANOVA de dos vías; la prueba post-hoc de Bonferroni fue usada para analizar las diferencias entre las medias de los grupos cuando hubo interacción entre ambos factores (ejercicio y edad).

El análisis inferencial utilizado para comparar dos grupos fue realizado mediante una prueba t-student de dos colas para muestras independientes, o una prueba U de Mann-Whitney, según fuera el caso. Las variables cualitativas fueron analizadas usando la prueba de Chi-cuadrado.

Se realizaron correlaciones parciales para controlar el efecto de variables adicionales. La correlación de Pearson fue usada cuando los datos presentaron una distribución

3. *Materiales y métodos*

normal. De lo contrario usamos la correlación de Spearman.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXPRESIÓN DE GENES EN SANGRE TOTAL

4.1.1. Expresión de genes y factores de transcripción relacionados con la función cognitiva, la plasticidad y el trofismo neuronal

La expresión de genes y factores de transcripción relacionados con la función cognitiva, la plasticidad y el trofismo neuronal, se muestran en la **figura 4.1**. El análisis estadístico no mostró diferencias entre los grupos de mediana edad en la expresión de ninguno de los genes medidos. Los niveles de expresión del ARNm de BDNF y VEGFA fueron mayores en YSG respecto a MTG, y en CREB1 las diferencias las encontramos entre el grupo YSG respecto a MSG. Adicionalmente, no hubo diferencias entre los grupos para los genes Cathepsin B y NTRK2 (receptor de alta afinidad de BDNF).

4. Resultados y discusión

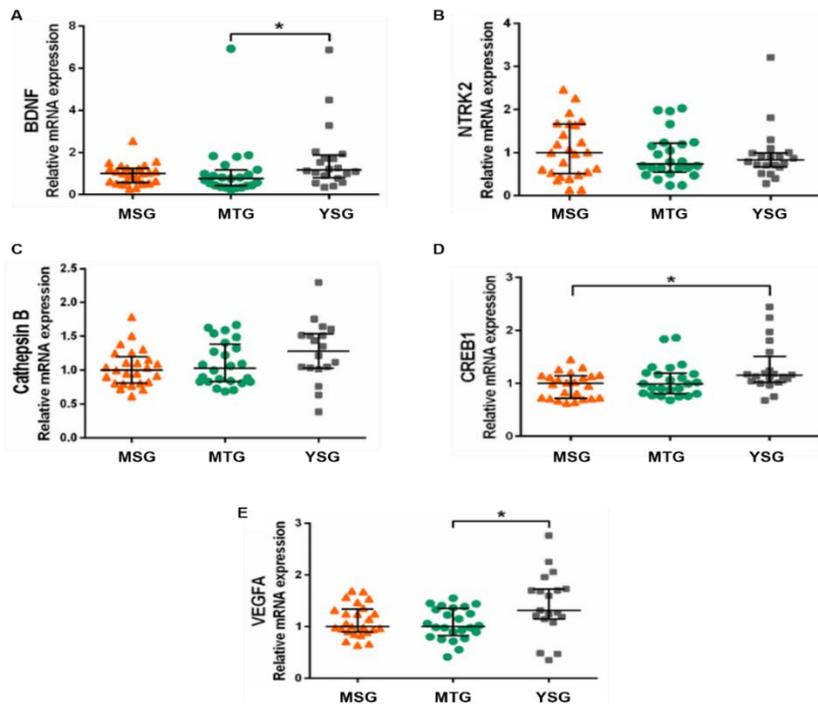


Figura 4.1. Expresión de genes relacionados con la función cognitiva, la plasticidad y el trofismo neuronal en sangre periférica de sujetos jóvenes y de mediana edad.

Niveles de expresión de ARNm de (A) BDNF, (B) NTRK2, (C) CATEPSINA B, (D) CREB1, (E) VEGFA. La significación estadística fue evaluada usando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Los datos se representaron como la mediana \pm DE. * $p < 0.05$.

En la presente tesis nos planteamos el estudio de la expresión de este grupo de genes porque se han descrito previamente sus modificaciones con el entrenamiento físico, así como sus cambios con la edad.

Respecto a CREB1, se sabe que es activado con el ejercicio de resistencia aeróbica, lo cual permite inducir la transcripción de genes protectores⁴⁴⁹ como las sirtuínas y

el BDNF. BDNF, por su parte, puede ser sintetizado en el cerebro, el músculo esquelético y otros compartimentos periféricos, y se ha sugerido que sirve como mediador clave en el aumento del volumen del hipocampo y la mejora cognitiva relacionada con el ejercicio físico a largo plazo⁷⁰.

En relación a la cisteína proteasa CSTB y, aunque su papel es poco conocido, se ha descrito que su liberación desde el músculo esquelético después del ejercicio podría generar beneficios cognitivos a través de varias vías, incluida la inducción de BDNF y la neurogénesis²¹⁴.

El ejercicio físico también influye positivamente en la liberación de VEGF, probablemente debido al estímulo hemodinámico que aumenta el estrés y la tensión sobre las paredes de los vasos sanguíneos⁴⁵⁰. Tanto el ejercicio de tipo agudo como el crónico pueden estimular su liberación⁴⁵¹, principalmente a partir de las células endoteliales de los capilares musculares, desde donde actúan sinérgicamente con otros factores tróficos⁴⁵². Entre las diversas funciones de VEGF, la proliferación de las células endoteliales y la angiogénesis son algunas de las más destacadas⁴⁵³.

VEGF también ha sido involucrado en la neurogénesis hipocampal. Esto fue propuesto por Fabel y colaboradores (2003)⁴⁵⁴ quienes utilizaron el entrenamiento voluntario en ratones para estudiar los efectos de VEGF sobre la

4. Resultados y discusión

neurogénesis inducida por ejercicio físico. Los investigadores usaron un adenovirus para bloquear la acción de VEGF a nivel periférico, lo cual disminuyó la neurogénesis hipocampal. Esto podría ser posible ya que se sabe que VEGF puede cruzar la barrera hematoencefálica y unirse a su receptor en el hipocampo, desde donde puede activar ERK (*del inglés Extracellular signal regulated kinase*) y a Akt (*del inglés Protein Kinase B*) para estimular la proliferación de neuronas y astrocitos⁴⁵⁵. Los efectos de VEGF sobre la neurogénesis parece también guardar relación con su interacción con IGF-1 y BDNF⁴⁵³.

El análisis de la expresión génica se realizó a partir de muestras recogidas al menos 24 horas después de la última sesión de entrenamiento físico, en el caso de MTG, con el fin de determinar el efecto crónico del ejercicio físico. Sin embargo, dados los resultados, es posible pensar que la transcripción de algunos factores tróficos sensibles al ejercicio pueda disminuir durante el período de recuperación.

La inesperada disminución en los niveles de ARNm de VEGFA en MTG, así como las discrepancias entre los niveles de ARNm y el contenido de proteína en factores como BDNF y CTSB, que veremos más adelante en las figuras 4.10 y 4.11, respectivamente, podría estar

relacionado con diferencias en la eficiencia transcripcional⁴⁵⁶, debido a un menor impacto del EF sobre la estimulación en la producción de estos factores, a nivel periférico. Sin embargo, la expresión de VEGFA y CTSB se correlacionó positivamente con los resultados en las pruebas de memoria declarativa (FCSRT) en el MTG, aunque no para BDNF, NTRK2 o CREB1.

De igual forma, es posible que la expresión del ARNm de estos factores tróficos fuera inicialmente regulada al alza y posteriormente a la baja, por acción de algún factor que pudiera actuar sobre el ARNm para bloquear su transcripción, o conducir a su degradación.

Estos hallazgos también podrían representar un mecanismo de adaptación al entrenamiento físico, en el cual las células son estresadas por estímulos constantes, lo que provoca altos niveles de transcripción de BDNF, CTSB, VEGF y CREB1 para la traducción inmediata. Sin embargo, la eventual acumulación de la proteína podría regular la traducción a través de un feedback negativo, si esta no es utilizada para una respuesta inmediata⁴⁵⁶.

4.1.2. Expresión génica de sirtuínas

Las sirtuínas juegan un papel importante a nivel funcional y estructural durante el ejercicio, participando en vías

4. Resultados y discusión

relacionadas con la mitocondriogénesis, el consumo de oxígeno y el estado redox celular^{457,458}. De igual forma, algunas de ellas son dianas potenciales por su relación con el combatir el envejecimiento cerebral y la neurodegeneración¹⁶¹.

La expresión de genes de la familia de las sirtuínas se muestra en la **figura 4.2**. El MSG mostró una menor expresión de SIRT1 y SIRT3 que el YSG. Por su parte, el MTG mantuvo la expresión de SIRT1 y SIRT3 al mismo nivel que el YSG. La diferencia entre los grupos de mediana edad fue estadísticamente significativa para SIRT3, con una tendencia a la significación en SIRT1 ($P=0.064$). Nuestros resultados no muestran cambios en la expresión de los genes SIRT2 y SIRT6 en ningún grupo experimental.

4. Resultados y discusión

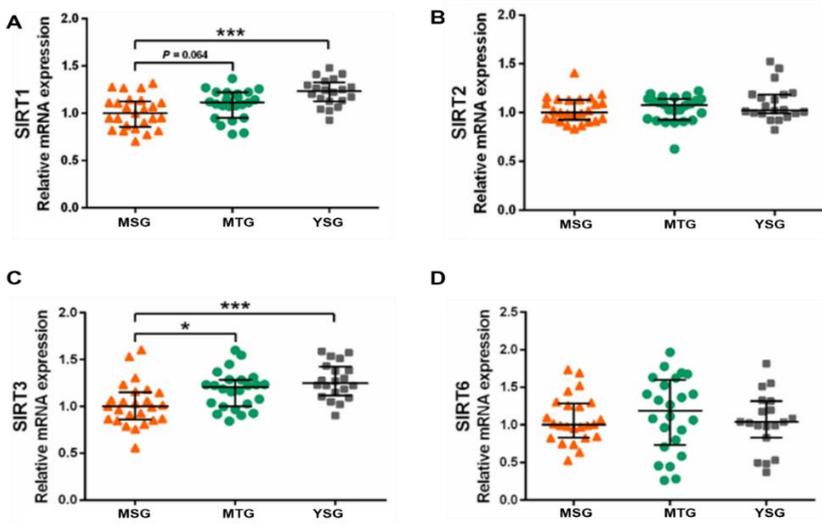


Figura 4.2. Expresión de sirtuínas en sangre periférica de sujetos jóvenes y de mediana edad.

Niveles de expresión de ARNm de **(A)** SIRT 1, **(B)** SIRT 2, **(C)** SIRT 3, **(D)** SIRT 6. La significación estadística fue evaluada usando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Los datos se representaron como la mediana \pm DE. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Estos hallazgos en sujetos sanos de mediana edad pueden respaldar la relevancia de SIRT1 y SIRT3 como biomarcadores de resistencia contra el deterioro cognitivo y/o la fragilidad relacionada con la edad. Las correlaciones de la expresión de estos genes con diversos parámetros de actividad física y parámetros neuropsicológicos fueron generalmente positivas en el grupo de jugadores y negativas en los sujetos control.

En un estudio transversal realizado en 200 sujetos entre 60 y 80 años, Kumar y colaboradores⁴⁵⁹ encontraron que bajos niveles séricos de SIRT1 y SIRT3 estaban asociados

4. Resultados y discusión

con la fragilidad. De igual forma, han sido encontrados bajos niveles sanguíneos de SIRT1 en ancianos con deterioro cognitivo y pacientes con Alzheimer⁴⁶⁰.

En cerebros de enfermos de Alzheimer, se ha visto una disminución tanto en la proteína como en el ARNm de SIRT1⁴⁶¹ y SIRT3⁴⁶². Además, las disminuciones en SIRT3 se han asociado con la pérdida de audición relacionada con la edad⁴⁶³ y el daño cardíaco exacerbado por la edad⁴⁶⁴.

El grupo de jugadores de rugby (MTG) mantuvo la expresión SIRT1 y SIRT3 al nivel de los sujetos jóvenes (YSG), lo cual puede indicar que el aumento significativo en los niveles de actividad física de éstos, en comparación con los sedentarios de mediana edad (MSG), sería la causa del “rejuvenecimiento” de su expresión génica en las células sanguíneas. En línea con nuestros resultados, recientemente Koltai y su grupo de investigación (2018)¹⁹⁷ encontraron niveles más altos de ARNm y proteína de SIRT1 y SIRT3 en músculo esquelético de atletas veteranos de ~65 años, cuando se compararon con controles de la misma edad.

Varios estudios han demostrado que el ejercicio crónico aumenta los niveles de proteína de SIRT1⁴⁶⁵ y SIRT3⁴⁶⁶ en el hipocampo de ratones transgénicos con Alzheimer, hasta equiparlos con los *Wild Type* (WT), además de restaurar el aprendizaje y la memoria. Las limitaciones de

acceso a esto tipo de muestra no nos permite realizar este estudio en humanos. Sin embargo, es posible que los niveles de sirtuínas tanto en el grupo de jugadores de rugby, analizados en la presente tesis, como en el grupo de atletas veteranos evaluados en el estudio de Koltai ¹⁹⁷, también fueran más altos a nivel cerebral.

Los mecanismos moleculares subyacentes a las funciones neuroprotectoras de SIRT1 han sido estudiados en modelos animales. Esta sirtuína de localización nuclear detecta la señalización de nutrientes o estrés y responde activando vías de plasticidad sináptica y cognición^{171,174}. Recientemente, el grupo de investigación de la Dra. Sanfeliu¹⁷⁶ encontró que la sobreexpresión de SIRT1 en el hipocampo de ratones transgénicos, para la enfermedad de Alzheimer, y ratones WT, indujo la expresión de factores neurotróficos, mejoró la proteostasis y contribuyó a mejorar la función cognitiva en estos animales. Esta mejora de los mecanismos neuroprotectores, indican el potencial de SIRT1 sobre la resiliencia cerebral. Es decir, la capacidad de esta sirtuína de generar adaptaciones que permitan mantener, en términos normales, las distintas vías de señalización de las cuales subyace la función cognitiva, en medio de una patología como la enfermedad de Alzheimer.

En concordancia con estos datos, nuestros resultados muestran que la expresión de SIRT1, en sangre total, se

4. Resultados y discusión

correlacionó positivamente con parámetros de memoria y funciones ejecutivas en el MTG, pero no en el MSG.

Respecto a SIRT3, se sabe que controla muchos aspectos funcionales de las mitocondrias y por lo tanto tiene un papel importante en el envejecimiento saludable⁴⁶⁷. SIRT3 está involucrado en el metabolismo celular y la reparación del ADN en una variedad de tejidos, y también activa genes antioxidantes como SOD2 y CAT⁴⁶⁸. Sus mecanismos neuroprotectores han sido menos estudiados que los de SIRT1. Sin embargo, SIRT3 ha demostrado servir como mediador en la respuesta adaptativa de las neuronas al estrés metabólico y oxidativo^{193,469}. Por lo tanto, de manera similar a SIRT1, la activación de SIRT3 aumentaría la resiliencia contra la neurodegeneración. Existe una estrecha relación entre SIRT1 y SIRT3. SIRT3 es un sustrato para la deacetilación de SIRT1 y, por lo tanto, su nivel de activación puede ser directamente modulado por SIRT1⁴⁷⁰. Además, tanto SIRT1 como SIRT3 deacetilan algunos sustratos homólogos presentes en sus correspondientes compartimentos celulares, núcleo y mitocondrias⁴⁷¹, y pueden actuar de manera cooperativa en respuesta a factores inductores⁴⁷² o en condiciones patológicas^{470,473}.

4.1.3. Expresión de genes antioxidantes

Hay evidencias que indican que la práctica regular de ejercicio físico en personas de mediana edad mejora las defensas antioxidantes, cuando se comparan con controles sedentarios⁴⁷⁴.

Para evaluar el efecto del entrenamiento físico a largo plazo sobre el estado redox, analizamos la expresión del ARNm de distintas enzimas antioxidantes en sangre total. La **figura 4.3** muestra una menor expresión del ARNm para CAT, SOD1, GPX4 y NFE2L2 en el grupo sedentario de mediana edad cuando se comparó con el grupo joven. Por su parte, el grupo de jugadores de rugby mantuvo la expresión de CAT y SOD1 al mismo nivel que el grupo joven, pero la expresión de GPX4 y NFE2L2 fueron menores. La diferencia entre los grupos de mediana edad fue estadísticamente significativa solo para CAT y SOD1, mostrando valores más elevados el grupo entrenado. Sin embargo, no hubo cambios en la expresión de los genes SOD2 y GPX1 en ningún grupo experimental.

4. Resultados y discusión

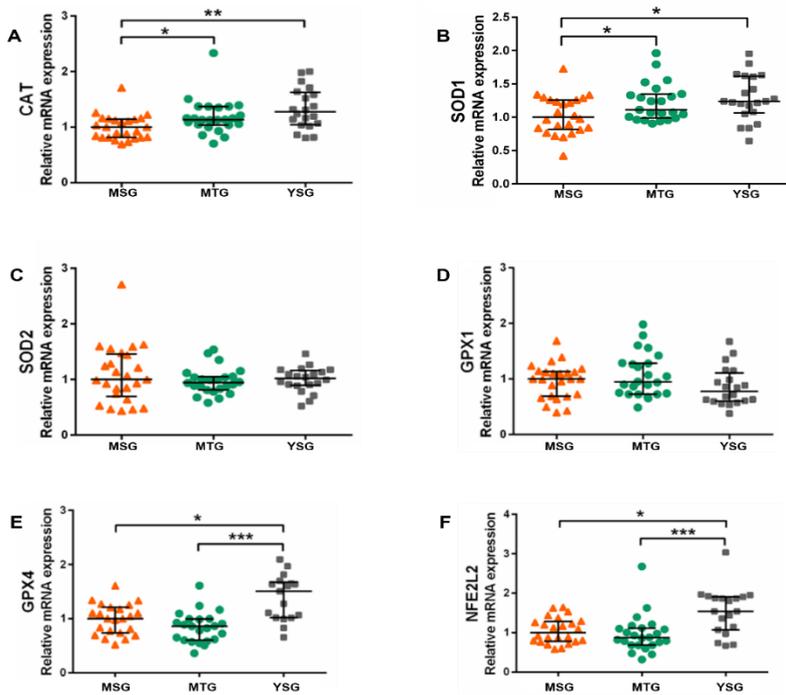


Figura 4.3. Expresión de genes relacionados con la defensa antioxidante endógena en sangre periférica de sujetos jóvenes y de mediana edad.

Niveles de expresión de ARNm de (A) Catalasa, (B) Superóxido Dismutasa 1, (C) Superóxido Dismutasa 2, (D) Glutación Peroxidasa 1, (E) Glutación Peroxidasa 4, (F) Factor nuclear relacionado al factor eritroide 2. La significación estadística fue evaluada usando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Los datos se representaron como la mediana \pm DE. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Si bien ha sido establecido que series cortas de ejercicio de alta intensidad pueden generar daño oxidativo⁴⁷⁵, la práctica de ejercicio físico regular mejora la capacidad celular para eliminar la acumulación excesiva de radicales libres y especies reactivas mediante el aumento de la defensa antioxidante endógena^{8,476}.

La mayoría de los estudios en fisiología del ejercicio han evidenciado la importancia de la intensidad como un parámetro clave en la generación de ERO en el músculo esquelético durante el ejercicio⁴⁷⁷.

El rugby es un deporte que involucra frecuentes episodios de ejercicio de alta intensidad separados por otros de baja intensidad. Las demandas fisiológicas en este deporte requieren que los jugadores desarrollen velocidad, fuerza muscular y una gran potencia aeróbica⁴⁷⁸, por lo que su práctica continua implica la estimulación y el desarrollo de los distintos sistemas de energía.

Parte del daño oxidativo a nivel celular producido por la acumulación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, puede ser neutralizado mediante las defensas antioxidantes endógenas que incluyen las enzimas determinadas en la presente tesis.

En deportes con altas demandas energéticas, varias investigaciones resaltan la influencia del ejercicio físico sobre las defensas antioxidantes endógenas. Teixeira y colaboradores (2009)⁴⁷⁹ demostraron que la actividad de SOD, en sangre total, fue mayor en kayakistas y piragüistas, respecto a controles sedentarios, aunque no hubo diferencias en la actividad de enzimas como GPX y GR. Otras investigaciones en deportes de equipo como el baloncesto y el rugby encontraron mayor actividad de SOD

4. Resultados y discusión

y GPX en los eritrocitos de los deportistas, comparada con la de sujetos sedentarios^{480,481}. De igual forma, se ha demostrado un aumento de la capacidad antioxidante total en el plasma de jugadores de fútbol adolescentes, comparados con sus respectivos controles⁴⁷⁷.

Más recientemente, Bouzid y colaboradores (2018) encontraron que la práctica regular de ejercicio físico en personas de mediana edad aumentó la actividad de SOD y GPX, en sangre total, respecto a personas sedentarias de la misma edad⁴⁷⁴.

En la presente tesis, nuestros análisis mostraron que los genes antioxidantes CAT y SOD1 tuvieron una sorprendente similitud con los encontrados en el apartado anterior en SIRT1 y SIRT3 en su respuesta al entrenamiento físico. Los jugadores de rugby mostraron un nivel “rejuvenecido” de expresión de CAT y SOD1, mientras que los sedentarios de mediana edad una disminución significativa de ellos. Estas dos enzimas antioxidantes pueden ser activadas por SIRT1. En roedores, se ha demostrado que el entrenamiento físico sirve como un potente inductor de la actividad enzimática de CAT y SOD a nivel cerebral⁴⁸².

La catalasa es un antioxidante de primera línea que descompone el peróxido de hidrógeno, y que a la vez puede tener un papel en el envejecimiento como se ha visto

en ratones que sobre-expresaron esta enzima en el hígado⁴⁸³. En la presente tesis hemos encontrado una disminución de su expresión génica en sangre total con la edad, que revierte con el entrenamiento físico. Este aumento de la expresión de CAT con el ejercicio podría estar relacionado con la neuroprotección, dado que encontramos que la expresión de CAT se correlacionó positivamente con la memoria visual en el grupo de jugadores de rugby.

Por su parte, la enzima citosólica SOD1 es la principal responsable de la descomposición del radical superóxido. Su disminución a nivel cerebral en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, fue restablecida luego de realizar ejercicio físico de tipo voluntario¹¹³.

Es posible que la mayor expresión de estas enzimas antioxidantes conlleve a un aumento en los niveles de la proteína, que a su vez pueda repercutir en una protección aumentada frente al daño oxidativo en MTG respecto a MSG, lo cual analizaremos más adelante.

Los genes SOD2 y GPX1, que codifican las enzimas antioxidantes SOD2 y GPX1, no mostraron diferencias en los niveles de expresión con la edad o la actividad física en sangre total. Mientras que SOD2 descompone el anión superóxido en la mitocondria, GPX1 es la isoenzima GPX más abundante y reduce principalmente los hidroperóxidos

4. Resultados y discusión

en el citoplasma. La GPX aumenta por ejercicio agudo y crónico en animales jóvenes, pero su inducibilidad puede perderse con el envejecimiento^{484,485}. Junto con esto, ha sido visto que tanto GPX1 como SOD2 han mostrado niveles de actividad cerebral alterados en modelos animales para la enfermedad de Alzheimer, con estrés oxidativo elevado¹¹³.

Por lo tanto, la falta de cambios en estos genes antioxidantes ampliamente expresados también apoyaría la ausencia de procesos oxidativos de neurodegeneración u otras enfermedades crónicas en nuestros grupos de mediana edad. Sin embargo, encontramos una disminución en la expresión del gen GPX4, que codifica la isoenzima GPX4, en los dos grupos de mediana edad, cuando se compararon con el grupo sedentario joven. Hay evidencia que indica que los niveles enzimáticos de esta isoforma son mucho más bajos que los de GPX1, aunque muestra una gran afinidad por los peróxidos lipídicos y recientemente se ha sugerido que es neuroprotectora⁴⁸⁶. Por esta razón consideramos que se necesitan más estudios para comprender la relevancia de los cambios en la expresión de GPX4 en el envejecimiento en diversos tejidos.

Al analizar la expresión de NFE2L2 también encontramos que ésta fue menor en ambos grupos de mediana edad

respecto al grupo sedentario joven, lo cual indica que la expresión del gen se relaciona con la edad. Esta respuesta era esperable, si tenemos en consideración que varios de los genes de enzimas antioxidantes medidos como CAT, SOD, y GPX, que son regulados por Nrf2, tuvieron mayor nivel de expresión en YSG respecto a MSG y MTG, como lo analizamos en el apartado anterior.

De igual forma, el comportamiento de NFE2L2 es parecido al que previamente analizamos de SIRT1, y va en línea con varios estudios que indican que la inducción de la respuesta antioxidante por Nrf2 es mediada previamente por acción de esta sirtuína^{487,488}.

4.1.4 Expresión de genes relacionados con la inflamación, y concentración de IL1 β

Un estilo de vida sedentario puede impactar negativamente sobre la inflamación sistémica crónica de bajo grado^{489,490}. Durante el envejecimiento, este estado inflamatorio aumenta el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con la edad y la pérdida de memoria^{491,492}. Sin embargo, la práctica de ejercicio físico puede regular a la baja varias vías pro-inflamatorias en sujetos jóvenes, de mediana edad y personas mayores^{127,493,494}.

4. Resultados y discusión

La expresión de genes pro y anti-inflamatorios, junto con el contenido de proteína de IL1 β , se muestran en la **figura 4.4**. Los análisis estadísticos no mostraron diferencias entre los grupos tanto para IL6 como para IL10. Sin embargo, la expresión de IL1 β fue mayor en MSG y YSG comparada con el grupo de mediana edad entrenado.

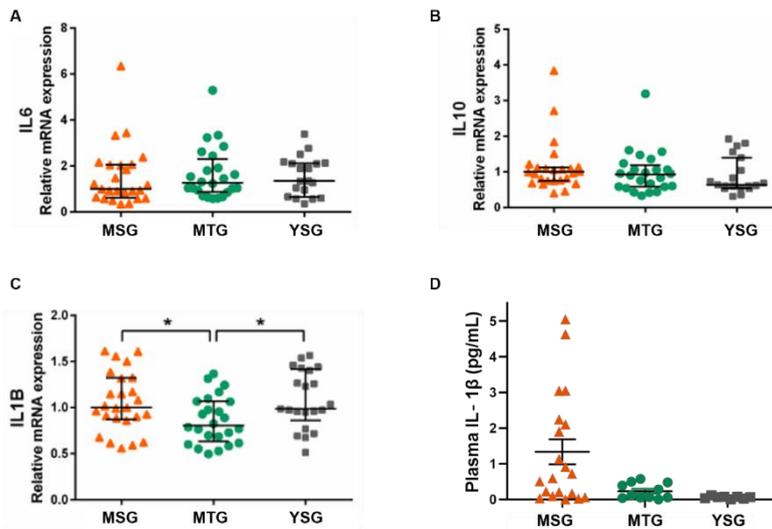


Figura 4.4. Expresión de genes relacionados con la inflamación en sangre periférica, y concentración de IL1 β en plasma de sujetos jóvenes y de mediana edad.

Niveles de expresión de ARNm de (A) IL 6, (B) IL10, (C) IL 1 β . La significación estadística fue evaluada usando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Los datos se representaron como la mediana \pm DE. * $p < 0.05$.

La citoquina IL1 β es un mediador importante de la respuesta inflamatoria. Su nivel disminuido en los jugadores de rugby de mediana edad, en comparación con los controles jóvenes, confirma el efecto anti-inflamatorio

comentado previamente de la actividad física a edades más avanzadas⁴⁹⁵. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre MSG y YSG en la expresión génica, los niveles de proteína de IL1 β en plasma mostraron una tendencia a aumentar en los controles de mediana edad en comparación con el control joven. Por lo tanto, los cambios de la inflamación relacionada con la edad probablemente aún no sean claramente detectables en la mediana edad. En la presente tesis no encontramos diferencias en los niveles de expresión génica de IL6 e IL10 entre los grupos. La expresión génica de marcadores pro-inflamatorios o anti-inflamatorios puede ser menor en la sangre que en otros compartimentos⁴⁹⁶. Sin embargo, es interesante observar que el nivel de expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 se correlacionó negativamente con la memoria y los parámetros de procesamiento visual en los jugadores de rugby, y el nivel de expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL10 se correlacionó positivamente con las puntuaciones de memoria, atención y función ejecutiva en controles.

Si bien correlación no necesariamente implica causalidad, es importante acentuar que varias líneas de evidencia sugieren que las citoquinas pro-inflamatorias tienen influencia en el desarrollo y la función neural. Por ejemplo, estudios como los del grupo de Marsland (2006)⁴⁹⁷,

4. Resultados y discusión

Lekander (2011)⁴⁹⁸ y Singh (1997)⁴⁹⁹ demuestran que niveles periféricos elevados de IL6 están asociados con declive cognitivo en sujetos sanos de mediana edad y personas con Alzheimer.

De igual forma, la relación entre IL6 y la función cognitiva también ha sido descrita en animales. Usando un modelo de ratón KO para IL6, Braidá y colaboradores (2004)⁵⁰⁰ encontraron que la memoria y el aprendizaje estaban más “activados” que en ratones WT. Aunque los mecanismos por los cuales las citoquinas inflamatorias actúan sobre la capacidad cognitiva no son claros, es probable que la interferencia en el desarrollo y el funcionamiento neural debido a su desregulación, sean parte de la respuesta.

4.2. CARACTERIZACIÓN NEUROPSICOLÓGICA

Los grupos de mediana edad demostraron desempeños normales en las pruebas de memoria, atención, velocidad psicomotora, funciones ejecutivas, procesamiento visual e inteligencia premórbida. Los resultados de las pruebas neuropsicológicas y la batería de test computarizada CANTAB, se muestran en las **tablas 4.1 y 4.2** respectivamente.

Tabla 4.1. Pruebas neuropsicológicas

	MSG	MTG
Memoria declarativa		
FCSRT, recuerdo inmediato libre	18.20 ± 5.08	21.79 ± 5.91*
FCSRT, recuerdo inmediato facilitado	27.28 ± 5.14	31.13 ± 5.19*
FCSRT, recuerdo demorado libre	8.32 ± 2.25	9.33 ± 2.78
FCSRT, recuerdo demorado facilitado	12.12 ± 2.47	13.17 ± 2.30
Atención y velocidad psicomotora		
TMT, Parte A	27.24 ± 7.55	25.79 ± 6.09
SDMT	48.44 ± 8.77	51.67 ± 8.69
WAIS IV, Dígitos directos	9.24 ± 1.86	10.00 ± 2.40
Funciones ejecutivas		
TMT, Parte B	67.96 ± 19.06	58.42 ± 17.99
WAIS IV, Dígitos inversos	6.36 ± 2.66	6.67 ± 2.41
Fluidez verbal semántica	20.80 ± 4.70	21.42 ± 5.16
Fluidez verbal fonética	43.76 ± 12.85	46.29 ± 11.29
Stroop test	51.80 ± 7.08	52.83 ± 5.72
Nivel de inteligencia premórbido		
WAIS IV, (Vocabulario)	14.08 ± 1.80	13.63 ± 2.12

Los datos son presentados como la media ± DE; *P<0.05 comparado con MSG. Abreviaturas: **FCSRT**, prueba de recuerdo selectivo libre y facilitado; **TMT**, Prueba del trazo; **SDMT**, Prueba de símbolos y dígitos; **WAIS IV**, Escala Wechsler de inteligencia para adultos, cuarta edición; **MSG**, Middle-aged Sedentary Group; **MTG**, Middle-aged Trained Group.

4. Resultados y discusión

Tabla 4.2. Batería de pruebas neuropsicológicas automatizada de Cambridge (CANTAB)

	MSG	MTG
Memoria de trabajo espacial (SWM)		
Latencia a la primera respuesta	2229.00 ± 1245.00	2215.00 ± 1273.00
Estrategia	41.04 ± 6.28	42.00 ± 7.22
Errores dobles	0.08 ± 0.28	0.04 ± 0.21
Aprendizaje asociado emparejado (PAL)		
Primer puntaje de memoria de prueba	11.56 ± 3.70	12.65 ± 3.13
Intentos hasta el éxito	2.34 ± 1.03	2.26 ± 0.92
Etapas completadas	3.68 ± 0.56	3.78 ± 0.42
Procesamiento rápido de información visual (RVP)		
Fallos totales	37.44 ± 7.95	37.30 ± 8.99
Latencia	449.20 ± 82.59	442.60 ± 62.15
Rechazos correctos	506.50 ± 20.14	507.70 ± 18.96

Los datos son presentados como la media ± DE. No se encontraron diferencias entre los grupos. Abreviaturas: **SWM**, Memoria espacial de trabajo; **PAL**, Aprendizaje asociado emparejado; **RVP**, Procesamiento rápido de información visual; **MSG**, Middle-aged Sedentary Group; **MTG**, Middle-aged Trained Group.

4.3. CORRELACIONES ESTADÍSTICAS

En el siguiente apartado presentaremos las correlaciones estadísticas entre los genes estudiados y distintos parámetros relacionados con la salud, la práctica de actividad física y las pruebas cognitivas medidas en los participantes. Los datos obtenidos se usaron para elaborar los *heat maps* de las **figuras 4.5, 4.6 y 4.7**, que se explican a continuación.

4. Resultados y discusión

Nuestros resultados muestran que, para algunos parámetros relacionados con la actividad física, como el total realizado semanalmente y durante el tiempo libre de forma moderada, medidos por IPAQ y el STEPS respectivamente, SIRT1 SIRT2 y SIRT3 correlacionaron negativamente en MSG y SIRT2 en YSG. De igual forma SIRT2 y SIRT3 correlacionaron positivamente con la actividad física realizada en el trabajo y durante desplazamientos en MTG

Por otra parte, tanto en MSG como en YSG, los niveles de IL10 correlacionaron positivamente con algunos síntomas de depresión medidos por la prueba de Hamilton-D.

Respecto a genes relacionados con la inflamación, IL6 correlacionó negativamente con las porciones de fruta tomadas en la dieta en YSG. IL1 β también correlacionó negativamente con las porciones de frutas tomadas en la dieta en MSG, pero positivamente con el consumo de tabaco.

Por otra parte, varios de los genes antioxidantes estudiados (CAT, GPX1, GPX4 y NFE2L2) correlacionaron negativamente con parámetros de actividad física en MSG, como la cantidad de actividad física realizada en el trabajo y durante desplazamientos. Sin embargo, lo hicieron de manera positiva, SOD2 y la cantidad de actividad física

4. Resultados y discusión

intensa realizada en el tiempo libre en MTG, y SOD1 con la actividad física realizada en casa, en YSG.

Por su parte, BDNF correlacionó positivamente con la cantidad de actividad física realizada en labores domésticas y durante el tiempo libre medidas en los cuestionarios IPAQ y STEPS en YSG.

Otras correlaciones con la actividad física incluyeron una relación inversa con Catepsina B en MTG, y positiva en VEGFA para MSG. En YSG, la expresión de VEGFA mostró correlaciones ambiguas con la actividad física. CREB1 correlacionó negativamente con varios parámetros de la actividad física en MTG y YSG.

Además, los niveles de expresión de SIRT1 y SIRT3 se correlacionaron positivamente con el nivel de educación de MTG.

Las correlaciones significativas entre la expresión de los genes estudiados y las pruebas neuropsicológicas para los dos grupos de mediana edad (MSG y MTG) se recogen en la **figura 4.6**.

4. Resultados y discusión

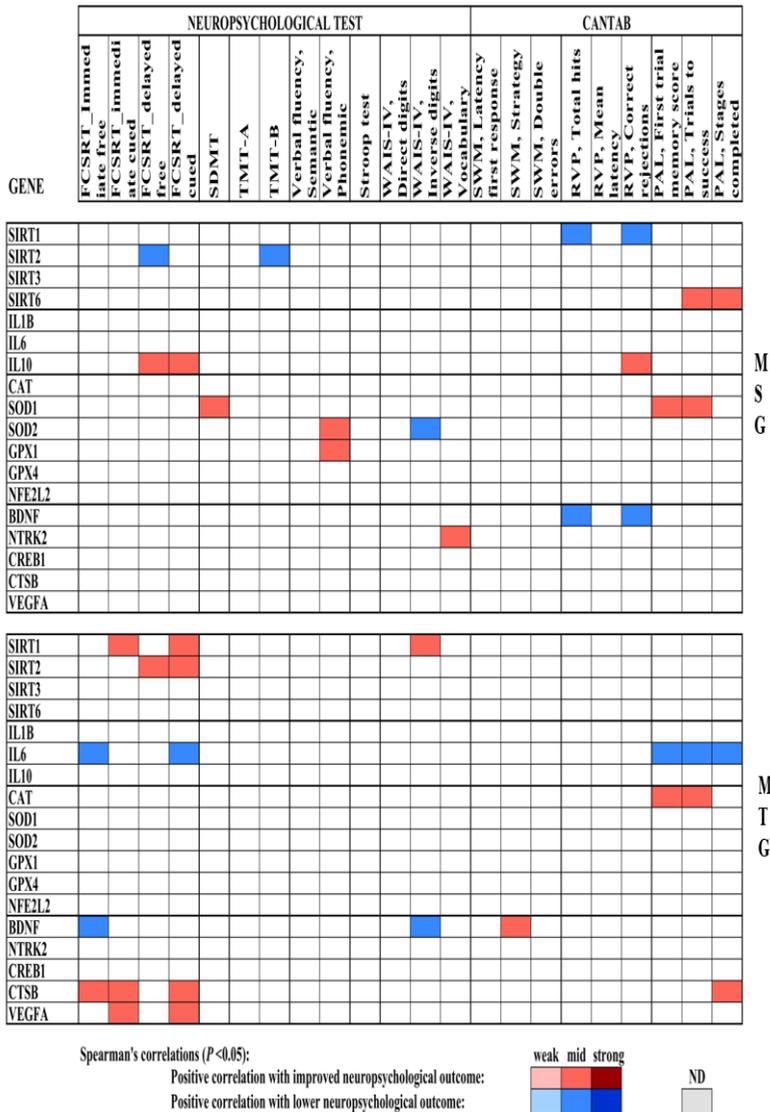


Figura 4.6. Heat map de las correlaciones significativas entre los genes estudiados y los resultados de las pruebas cognitivas en MSG y MTG.

El signo del coeficiente de correlación se invierte cuando el mejor resultado neuropsicológico se mide por el valor más bajo del parámetro, como se indica (neg). La potencia de las correlaciones significativas ($P < 0.05$) se definió como débil ($|R| < 0.40$), moderada ($0.40 \leq |R| < 0.60$) o fuerte ($|R| \geq 0.60$), como se muestra en el código de color.

4. Resultados y discusión

El análisis estadístico mostró correlaciones positivas en MTG entre SIRT1 y ambas sub-pruebas “facilitadas” del FCSRT y la sub-prueba de dígitos invertidos del WAIS-IV test. Otra asociación positiva destacable, fue la encontrada entre SIRT2 y las pruebas de recuerdo demorado libre y facilitado del FCSRT. Sin embargo, MSG mostró correlaciones negativas para estos dos genes, y correlaciones positivas entre SIRT6 y dos sub-pruebas de la batería CANTAB.

En cuanto a los parámetros inflamatorios, la expresión de IL6 correlacionó negativamente con algunas sub-pruebas del FCSRT y la batería CANTAB en MTG, mientras IL10 presentó correlaciones positivas en las dos sub-pruebas “facilitadas” del FCSRT en MSG.

El análisis entre la expresión de los genes antioxidantes y los parámetros neuropsicológicos medidos, mostró correlaciones positivas para ambos grupos de mediana edad, como las encontradas entre CAT y algunas pruebas de la batería CANTAB en MTG; y SOD2 y GPX1 con la prueba de fluidez verbal (SDMT) en el grupo MSG, así como SOD1 con algunas sub-pruebas de la batería CANTAB y la prueba de dígitos y símbolos.

Al analizar la interacción de BDNF con otras variables, encontramos que se correlacionó negativamente con los resultados de algunas pruebas neuropsicológicas en los

4. Resultados y discusión

dos grupos de mediana edad, mientras que CTSB y VEGFA se correlacionaron positivamente con los resultados de la mayoría de las pruebas de FCSRT, en MTG.

Por otra parte, las correlaciones significativas entre las pruebas neuropsicológicas y la edad, el nivel de educación, salud y características del estilo de vida para los grupos de mediana edad (MSG y MTG), se muestran en la **figura 4.7**.

4. Resultados y discusión

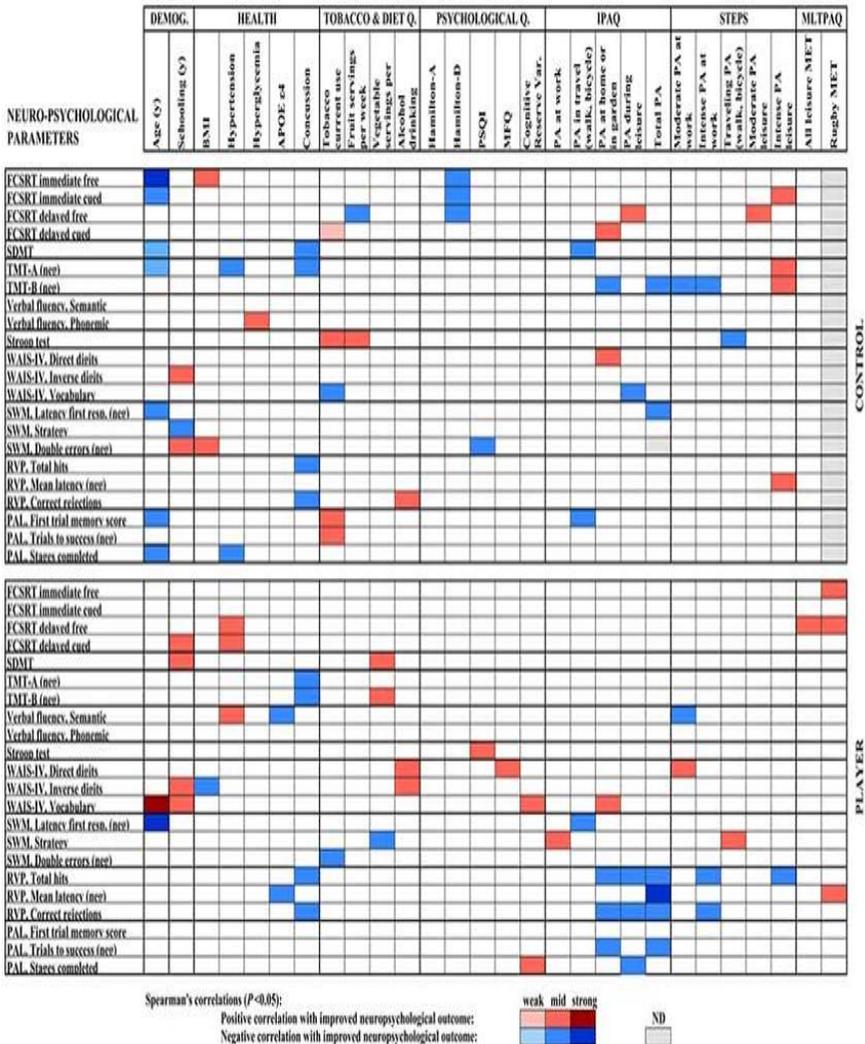


Figura 4.7. Heat map de las correlaciones significativas entre los parámetros neuropsicológicos evaluados en los grupos de mediana edad (MSG y MTG) y aspectos demográficos, de dieta saludable y actividad física obtenidos mediante cuestionarios estandarizados.

El signo del coeficiente de correlación se invierte cuando el mejor resultado neuropsicológico se mide por el valor más bajo del parámetro, como se indica (neg). La potencia de las correlaciones significativas ($P < 0.05$) se definió como débil ($R < 0.40$), moderada ($0.40 \leq R < 0.60$) o fuerte ($R \geq 0.60$), como lo muestra en el código de color.

El análisis estadístico mostró que en MTG, los METS-h de rugby anuales, medidos por el MLTPAQ, correlacionaron positivamente con las pruebas de recuerdo inmediato libre y facilitado del FCSRT. Así mismo, los METS-h anuales de la actividad de ocio también correlacionaron positivamente con la prueba de recuerdo demorado libre.

En MSG, varios parámetros de ocio y actividad doméstica medidas por el STEPS y el IPAQ, correlacionaron positivamente con la mayoría de las pruebas del FCSRT. Sin embargo, no todos los resultados de las correlaciones entre los parámetros de actividad física medidos y las demás pruebas neuropsicológicas, siguieron la misma tendencia.

Por ejemplo, el análisis en MSG mostró una correlación positiva entre la actividad física intensa en el tiempo libre, medida por el STEPS, y el desempeño en la prueba de atención visual TMT-A y TMT-B, mientras que la cantidad de actividad física doméstica medida con el IPAQ correlacionó positivamente con la sub-prueba de dígitos directos del WAIS-IV, que evalúa la atención y la memoria de trabajo. En el grupo MTG, esta misma sub-prueba correlacionó positivamente con la cantidad de actividad física en el trabajo, medida con el cuestionario STEPS. Por último, la sub-prueba de vocabulario del WAIS-IV

4. Resultados y discusión

correlacionó positivamente con la cantidad de actividad física doméstica realizada, medida por el IPAQ.

En cuanto a las conmociones cerebrales, éstas correlacionaron negativamente con el desempeño en las pruebas SDMT y TMT-A en el grupo sedentario, y con *TMT-A* y *B* en los jugadores de rugby. Así mismo, el número de conmociones cerebrales se correlacionó negativamente con el resultado en la prueba RVP para ambos grupos.

Por otra parte, los análisis revelaron que la presencia de un alelo APOE $\epsilon 4$ solo se correlaciona con una fluidez semántica más baja y una latencia en el *RPV* más alta en el grupo de jugadores de rugby.

Al analizar la relación entre las pruebas de la batería CANTAB con los diferentes parámetros de actividad física en MTG, encontramos que los resultados en la prueba de memoria de trabajo espacial (SWM), que mide la capacidad de estrategia de los sujetos, se asoció positivamente tanto con la cantidad de actividad física realizada en el trabajo, medida por el IPAQ, como con la realizada mediante caminata y uso de la bicicleta, reportada en el *STEPS*.

Por otra parte, los resultados de la latencia media en la subprueba de procesamiento rápido de la información visual (*RVP*), se correlacionaron negativamente con los METS-h de rugby anuales medidos por el MLTPAQ, en MTG, y con

la actividad física intensa en el tiempo libre reportada por el STEPS en MSG. Otras correlaciones negativas fueron encontradas entre la sub-prueba PRV y distintos parámetros relacionados con la actividad física, medidos por el IPAQ y el STEPS.

En cuanto a los registros de salud en los sujetos de mediana edad, MTG tuvo un mayor número de conmociones cerebrales que MSG. Estos resultados correlacionaron negativamente con las pruebas RVP, TMT-A y B para los primeros, y con las pruebas RVP, TMT-A y SDMT para los sedentarios.

En MTG, la presencia de un alelo APOE ϵ 4 solo se correlacionó con una fluidez semántica más baja y con una latencia en la velocidad de procesamiento visual (RVP) más alta en el grupo de jugadores.

En cuanto al análisis correlacional entre las variables psicológicas y las pruebas neuropsicológicas, encontramos una asociación negativa entre mayores puntuaciones de depresión en la escala Hamilton-D y tres de las cuatro sub-pruebas del FCSRT, en MSG.

En este mismo grupo, respecto al índice de calidad del sueño, encontramos que malos hábitos de sueño correlacionaron positivamente con la sub-prueba de errores SWM de la batería CANTAB.

4. Resultados y discusión

Como esperábamos, un mayor número de años de estudio y/o nivel de educación, mostraron correlaciones positivas con mejores puntuaciones en los resultados de algunas pruebas neuropsicológicas como la sub-prueba de recuerdo demorado facilitado del FCSRT, la sub-prueba de Vocabulario del WAIS-IV y la prueba de velocidad y atención psicomotora (SDMT), para el MTG.

Por último, la edad dentro del grupo se correlacionó negativamente con el rendimiento neuropsicológico en una serie de parámetros en MSG, pero mostró un efecto menor en el grupo MTG, lo cual reafirma que la práctica de ejercicio físico a lo largo de la vida ayuda a proteger contra el deterioro cognitivo relacionado con la edad.

4.4. EL ENTRENAMIENTO FÍSICO A LARGO PLAZO SE ASOCIA CON MEJOR FUNCIÓN DE LA MEMORIA EN JUGADORES DE RUGBY DE MEDIANA EDAD

El FCSRT es particularmente sensible a estados patológicos, especialmente en estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer⁵⁰¹. El deterioro del recuerdo libre en el FCSRT predice el desarrollo de demencia hasta 5 años antes del diagnóstico⁵⁰². Nuestra muestra de jugadores de rugby de mediana edad y sus respectivos controles, estaba compuesta por personas cognitivamente

normales. Sin embargo, el análisis estadístico mostró diferencias entre los grupos.

Como se muestra en la **figura 4.8**, el MTG obtuvo un desempeño significativamente mayor que el MSG tanto en la prueba de recuerdo inmediato libre ($t_{(47)} = 2.283, p = 0.0270$) (**figura 4.8A**) como en la de recuerdo inmediato facilitado ($t_{(47)} = 2.605, p = 0.0123$) (**figura 4.8**). También encontramos una correlación positiva entre el número de horas de ejercicio físico semanal y los resultados en el test de recuerdo inmediato libre ($r_{(49)} = 0.33, P = 0.022$) (**figura 4.8C**) y recuerdo inmediato facilitado ($r_{(49)} = 0.39, P = 0.0058$) (**figura 4.8D**) en los sujetos de mediana edad. Estas correlaciones se mantuvieron cuando ajustamos por años de educación.

4. Resultados y discusión

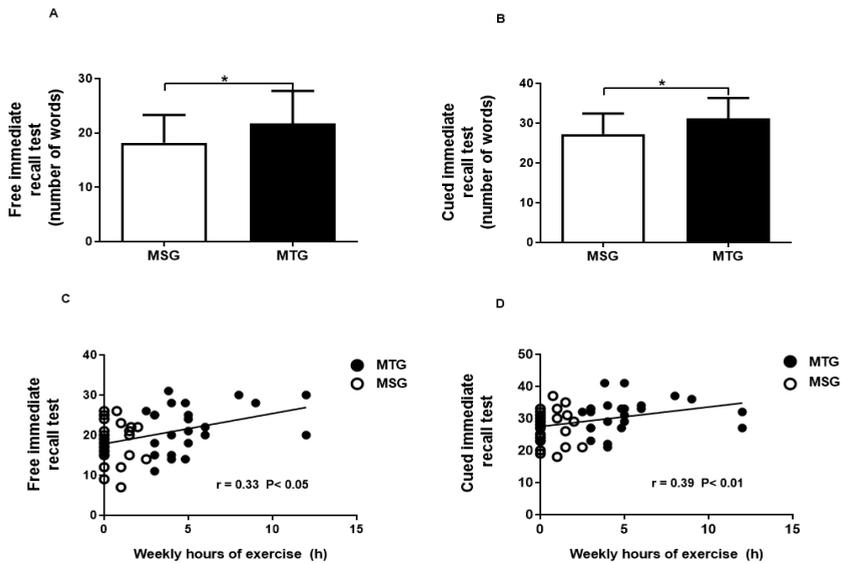


Figura 4.8. Pruebas de recuerdo selectivo libre y facilitado en sujetos de mediana edad.

Número de palabras en la prueba de recuerdo inmediato libre total (A) y en la prueba de recuerdo inmediato facilitado total (B). Las barras representan la media \pm DE. La significación estadística fue evaluada usando la prueba t de Student de dos colas. * $p < 0.05$ (C, D). Pruebas de correlación de Spearman entre las horas semanales de ejercicio físico realizadas y el número de palabras en la prueba de recuerdo inmediato libre total (C) y recuerdo inmediato facilitado total (D).

El deterioro cognitivo y la demencia se han convertido en graves cargas sociales, económicas y humanas⁵⁰³, por lo que la prevención es un elemento clave para contrarrestar la demencia⁵⁰⁴. Se estima que un tercio de los casos de enfermedad de Alzheimer en todo el mundo son atribuibles a siete factores modificables: hipertensión y obesidad en la mediana edad, baja educación, diabetes, inactividad física, tabaquismo y depresión⁵⁰³. Sin lugar a dudas, estos datos

brindan oportunidades para realizar intervenciones desde la prevención en etapas de enfermedad pre-sintomática y pre-demencia, donde presumiblemente no sería demasiado tarde.

Diversos trabajos de investigación han dado muestras de la relación existente entre el ejercicio físico y los procesos relacionados con la función cognitiva⁵⁰⁵⁻⁵⁰⁷, estableciendo que su práctica habitual puede contribuir a la mejora de tareas de memoria, agilidad y atención, así como a proteger contra el deterioro cognitivo y la demencia en personas mayores^{66,508}.

Aquí, nuestro objetivo fue determinar si el entrenamiento físico a largo plazo, más concretamente la práctica de rugby, coadyuvaría a mejorar las respuestas cognitivas en un período de la vida en el que podríamos encontrar una pérdida sutil relacionada con la edad.

Dados los resultados encontrados, creemos que la mejora de la memoria detectada en el MTG estuvo asociada a un retraso en el inicio de la pérdida de memoria fisiológica. Por lo tanto, el estudio de terapias y mecanismos que promuevan el mantenimiento normal de la memoria, podría ayudar a diseñar programas específicos para tratar de mejorarla en un estado de enfermedad, como en Alzheimer.

4. Resultados y discusión

Entre las personas de mediana edad, incluimos un grupo de jugadores de rugby que informaron un promedio de 35 \pm 15 años de práctica de este deporte.

Tradicionalmente, la mayoría de los estudios que muestran que la función cognitiva mejora con el ejercicio físico, se han realizado después de una serie aguda^{327,509} y / o crónica de ejercicio aeróbico^{70,510,511}. Sin embargo, no hay evidencias de los beneficios de la práctica de ejercicio físico a largo plazo, en deportes de equipo, disponibles en la literatura.

La evidencia en apoyo a los efectos del ejercicio aeróbico para mejorar la memoria en humanos no se ha establecido de manera convincente. La gran mayoría de los estudios que evalúan los efectos del ejercicio cardiovascular sobre la cognición, han empleado principalmente tareas neuropsicológicas dirigidas principalmente a la atención, la toma de decisiones y el procesamiento de la velocidad (por ejemplo, tiempo de reacción simple o de elección). En contraste, se ha puesto menos énfasis en investigar los efectos de este tipo de ejercicio en tareas cognitivas que involucran, por ejemplo, la memoria⁷⁰.

El FCSRT mide el aprendizaje verbal y la memoria⁵¹², y se usa ampliamente para identificar demencia muy leve⁵¹³ ya que el deterioro del recuerdo libre predice el desarrollo de demencia hasta 5 años antes del diagnóstico⁵⁰². Es

importante acentuar que, a nivel general, hay una disminución en la mayoría de las medidas en pruebas de recuerdo selectivo con el avance de la edad^{514,515}.

Nuestros resultados muestran un mejor rendimiento en las pruebas de recuerdo inmediato libre y facilitado en los individuos entrenados de mediana edad en comparación con los sedentarios, lo que indica un impacto positivo del entrenamiento físico a largo plazo al retrasar el inicio de la pérdida de memoria fisiológica en el curso normal del envejecimiento cerebral.

Aquí es importante destacar que, pese a que los efectos demográficos, como la educación, se han asociado con frecuencia a puntajes más altos en el FCSRT⁵¹⁶, en nuestro estudio no hubo diferencias entre grupos en el grado de escolaridad, el tabaquismo u otras condiciones como la hiperglucemia.

Por último, respecto a los posibles mecanismos que podrían ser modulados por el ejercicio físico para ejercer un impacto positivo sobre los procesos cognitivos, Kleinloog y colaboradores (2019)⁵¹⁷ demostraron que el aumento del flujo sanguíneo cerebral podría ser determinante. De esta forma, la angiogénesis y el aumento del flujo sanguíneo en zonas como el cerebelo y el hipocampo, podrían incrementar la disponibilidad de oxígeno^{507,518,519} y de neurotransmisores esenciales como

4. Resultados y discusión

la serotonina y norepinefrina tal como ha sido demostrado en roedores^{520,521}. Así mismo, la liberación de factores neurotróficos que “enciendan” las vías de señalización relacionadas con la síntesis de proteínas sinápticas, y que a su vez promuevan la aparición de más y mejores conexiones neuronales, podrían ser parte de la respuesta en un fenómeno que cada vez tiene más dudas sin resolver.

De esta forma, comprender la importancia de utilizar el ejercicio físico como herramienta desde la prevención, podría hacer la diferencia entre mantener en alerta las funciones cerebrales durante el envejecimiento o simplemente dar por hecho su pérdida.

4.5. EL ENTRENAMIENTO FÍSICO A LARGO PLAZO DISMINUYE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN PLASMA EN LOS GRUPOS ENTRENADOS JOVEN Y DE MEDIANA EDAD

El entrenamiento físico induce la expresión de enzimas antioxidantes no sólo en el músculo esquelético, sino también en sangre⁵²² y a nivel cerebral⁵²³, lo cual permite que los individuos entrenados tengan cierta protección contra el daño oxidativo. La **figura 4.9A** no muestra cambios en la carbonilación de proteínas en plasma, ni en

4. Resultados y discusión

los grupos jóvenes ni en los de mediana edad, como consecuencia del entrenamiento. Sin embargo, la **figura 4.9B** muestra una disminución significativa en los niveles de MDA en plasma en los grupos entrenados cuando se compararon con los sedentarios tanto jóvenes como de mediana edad ($F_{(1,77)} = 6.077$; $p = 0.0159$).

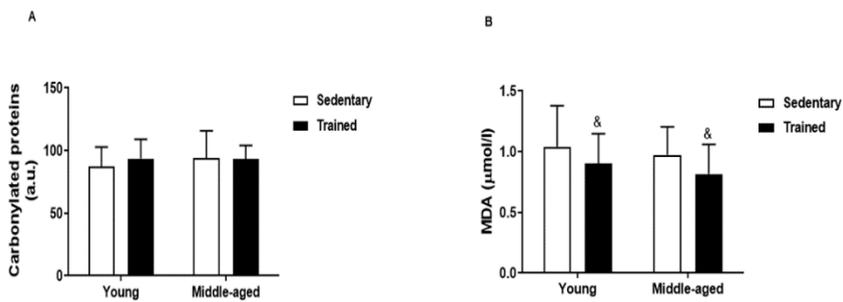


Figura 4.9. Daño oxidativo en sujetos jóvenes y de mediana edad. Efecto del entrenamiento físico a largo plazo.

(A) Análisis densitométrico (a.u.: arbitrary units) de los niveles de proteínas carboniladas medidas en plasma, por Western Blotting. (B) Niveles plasmáticos de MDA medidos por HPLC. Las barras representan la media \pm DE. La significación estadística fue evaluada usando ANOVA de dos vías. &p < 0.05 para el factor entrenamiento físico.

Ya que previamente habíamos visto un mejor perfil de expresión en NFE2L2 (que codifica el gen Nrf2) y los genes antioxidantes en YSG respecto a los grupos de mediana edad, y que se sabe que el ejercicio puede modular la inducción de Nrf2⁴¹⁸, era presumible pensar que los dos grupos jóvenes (YSG y YTG) estuvieran más protegidos

4. Resultados y discusión

contra el daño oxidativo que los grupos de mediana edad. Sin embargo, la **figura 4.9A** no muestra cambios en el daño oxidativo a proteínas en ninguno de nuestros grupos estudiados, lo que en este caso nos indica que no hubo influencia de los factores edad ni ejercicio en este biomarcador a nivel plasmático.

Son pocos los trabajos que han estudiado el estatus antioxidante de individuos entrenados y sedentarios sin previa intervención, por lo que el margen de comparación con otras investigaciones es reducido. Sin embargo, nuestros resultados son similares a los encontrados por el grupo de Rahnama (2.007)⁵²⁴ el cual no evidenció diferencias en la carbonilación de proteínas, a nivel plasmático, en individuos sometidos a un programa de entrenamiento físico crónico, respecto a sus controles.

Ya que no encontramos diferencias entre los grupos en ninguno de los factores analizados (edad y ejercicio), es presumible pensar que el daño oxidativo a proteínas medido a nivel sistémico, no sea un buen reflejo de lo que sucede en los distintos segmentos corporales.

Por otra parte, la **figura 4.9B** muestra una disminución significativa en los niveles de MDA en plasma en los grupos entrenados cuando se compararon con los sedentarios tanto jóvenes como de mediana edad ($F_{(1,77)} = 6.077$; $p = 0.0159$).

El malondialdehído es la forma principal del aldehído resultante de la peroxidación lipídica de los tejidos, y es ampliamente usado como biomarcador de estrés oxidativo⁵²⁵. En la presente tesis, los grupos entrenados mostraron niveles más bajos de MDA en comparación con los sedentarios.

Ha sido establecido que el estrés oxidativo aumenta con la edad, y además podría servir de vínculo entre el envejecimiento y la pérdida de memoria⁵²⁶. Sin embargo, datos más recientes de nuestro propio laboratorio muestran que el daño oxidativo no se correlaciona con la edad, especialmente en la población geriátrica, sino con el estado de fragilidad. Esto originó la "teoría de la fragilidad de los radicales libres" que propone que el daño oxidativo está asociado con la fragilidad, pero no con la edad cronológica en sí misma⁵²⁷, lo cual apoya el hecho de no haber encontrado diferencias en los grupos respecto al factor edad.

Uno de los beneficios de la práctica regular de ejercicio físico es el aumento de la respuesta antioxidante el cual restaura la homeostasis redox no solo en el músculo esquelético, sino también en el cerebro^{523,528}.

Precisamente, la reducción de los niveles de MDA a nivel periférico, en MTG y YTG, podría ser el reflejo de la respuesta que acontece en varios tejidos incluyendo el

4. Resultados y discusión

cerebral, tal vez no por menor producción de radicales libres y especies reactivas, sino por un aumento tanto en la adaptación a los efectos del entrenamiento físico regular como en la defensa antioxidante endógena similar al que encontramos en sangre total, el cual previamente discutimos en la figura 4.3.

Otras investigaciones también encontraron menores niveles de MDA plasmático en sujetos entrenados comparados con sus controles⁵²⁹.

4.6. LOS NIVELES SÉRICOS EN REPOSO DE BDNF SON MODULADOS TANTO POR UN PROLONGADO PERÍODO DE ENTRENAMIENTO FÍSICO, COMO POR LA EDAD EN HUMANOS

La comparación de los niveles séricos de BDNF entre los grupos experimentales reveló un efecto tanto en la variable entrenamiento físico ($F_{(1,80)} = 50.11$; $p < 0.0001$) como en la variable edad ($F_{(1,80)} = 289.6$; $p < 0.0001$), así como una interacción entre ellas ($F_{(1,80)} = 11.94$; $p = 0.0009$). Las pruebas post-hoc mostraron un aumento en los niveles de BDNF con la edad, y una disminución con el entrenamiento físico que fue más marcada en el grupo joven, tal como se evidencia en la **Figura 4.10A**.

Previamente ha sido sugerido que existe una relación inversa entre los niveles periféricos de BDNF en reposo y la práctica habitual de actividad física o la aptitud cardiorrespiratoria^{530,531}. En la presente tesis doctoral encontramos una correlación inversa y estadísticamente significativa entre los niveles séricos de BDNF y el número de horas de ejercicio físico semanal realizado por los individuos jóvenes, ($r_{(33)} = -0.709$, $p < 0.0001$), y de mediana edad ($r_{(47)} = -0.32$, $p = 0.026$), tal como muestra la **figura 4.10B, C**.

Finalmente, la **Figura 4.10D** muestra una correlación positiva entre BDNF y MDA ($r_{(45)} = 0.434$, $p = 0.0029$) en los grupos de mediana edad.

4. Resultados y discusión

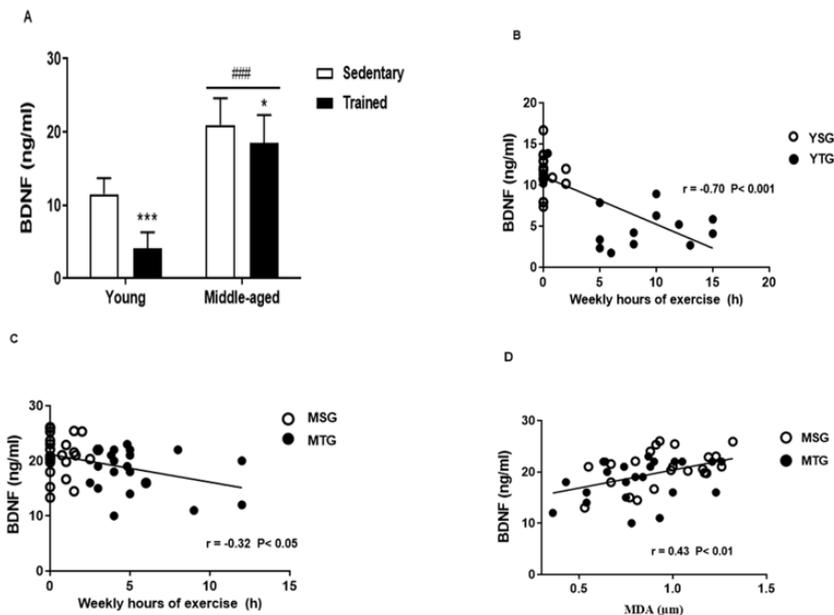


Figura 4.10. Niveles séricos de BDNF y su correlación con el malondialdehído y el número de horas semanales de ejercicio físico realizado en sujetos de mediana edad y jóvenes.

(A) Los niveles séricos de BDNF en reposo fueron medidos por ELISA en todos los grupos. Las barras representan la media \pm DE. La significación estadística fue evaluada usando ANOVA de dos vías. Prueba post-hoc de Bonferroni: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparado con su respectivo grupo sedentario; ### $p < 0.001$ comparado con su respectivo grupo joven. (B, C) Prueba de correlación de Spearman entre el número de horas de ejercicio físico semanal realizado y los niveles séricos de BDNF en individuos jóvenes (B) y de mediana edad (C). (D) Prueba de correlación de Spearman entre los niveles séricos de BDNF en reposo y los niveles plasmáticos de MDA, en los individuos de mediana edad.

BDNF es una neurotrofina que se ha identificado como un mediador crucial de los beneficios del ejercicio para la salud del cerebro⁵³². Se ha informado que los niveles de BDNF alcanzan su punto máximo en los años treinta (30-39 años) y que tienden a disminuir ligeramente en edades

posteriores: cuarenta (40-49 años) y cincuenta (50-59 años)⁵³³. Hemos encontrado un aumento significativo de los niveles de BDNF en suero en reposo en los sujetos de mediana edad en comparación con los jóvenes, tanto en los grupos sedentarios como en los entrenados. Los valores séricos de BDNF en reposo encontrados en los individuos de mediana edad duplicaron o incluso aumentaron sus niveles cuatro veces en comparación con los jóvenes. Esto nos indica que el efecto de la edad fue significativo en nuestro estudio.

Ha sido establecido que series cortas de ejercicio aeróbico de alta intensidad aumentan, de manera transitoria, los niveles plasmáticos y séricos de BDNF en humanos, los cuales regresan a sus niveles basales poco tiempo después (30-50 minutos) de interrumpir la actividad, y pueden continuar cayendo muy por debajo de los niveles basales a las 2 y 3 h post-ejercicio.

Sin embargo, el efecto del ejercicio aeróbico crónico (que oscila entre varias semanas a 1 año), aunque menos estudiado, tiende a mostrar que los niveles periféricos de BDNF en reposo también aumentan en cierta medida después de un período de entrenamiento de resistencia^{320,530,531,534,535}. Sin embargo, la relación entre la práctica de ejercicio físico durante toda la vida y los niveles basales en reposo de BDNF en suero en humanos sigue

4. Resultados y discusión

siendo desconocida. Varios hallazgos reportados en la literatura sugieren una asociación inversa entre el BDNF en reposo y la actividad física habitual o la aptitud cardiorrespiratoria.^{530,531,534–538}. Nuestros resultados son consistentes con estos estudios, ya que hemos encontrado una disminución significativa en los niveles de BDNF en suero en reposo tanto en el grupo de jóvenes entrenados como en los jugadores de rugby de mediana edad. Similar a nuestros resultados, Babaei y colaboradores encontraron niveles séricos más bajos de BDNF y mejores resultados al evaluar la función cognitiva en sujetos de mediana edad con más de 10 años de práctica de fútbol, y que continuaron entrenando regularmente después de su retiro, con respecto a sus homólogos sedentarios⁵³⁹.

En el presente estudio, las muestras de sangre se extrajeron al menos 24 h después del último ejercicio. Por lo tanto, la reducción significativa de BDNF en suero en hombres entrenados puede considerarse una adaptación al entrenamiento físico crónico, en lugar de una respuesta aguda a una sesión de ejercicio. Esta adaptación podría venir desde una captación más eficiente de la neurotrofina a nivel cerebral, lo cual podría deberse al aumento en el número de receptores a nivel cerebral potenciado por el entrenamiento físico, como se sabe que ocurre en roedores^{540–542}, lo cual podría proporcionar una mayor

neuroprotección en los sujetos físicamente activos en comparación con los controles sedentarios.

Bajo esta perspectiva, menos moléculas de BDNF tendrían la necesidad de cruzar la barrera hematoencefálica para buscar otros lugares de almacenamiento a nivel periférico, entre los que se encuentran las plaquetas, las cuales se sabe que almacenan el 90% del BDNF circulante⁵⁴³.

Por otra parte, ha sido establecido que BDNF puede contribuir en el proceso de reparación del tejido nervioso a distintos niveles⁵⁴⁴⁻⁵⁴⁷. El ejercicio físico induce estrés mecánico y oxidativo provocando lesiones tanto en los músculos como en los nervios^{548,549}, por lo que otra posible explicación de los menores niveles de BDNF a nivel periférico en los sujetos entrenados, podría deberse a la incorporación de la neurotrofina en otros tejidos, como el muscular, para contribuir a la reparación del daño generado por el esfuerzo físico.

Nofuji y colaboradores encontraron que los niveles séricos de BDNF aumentados luego de un ejercicio de alta intensidad, cayeron incluso por debajo de los niveles basales después de 30 y 60 minutos de haber realizado ejercicio solo en sujetos activos, mientras que en los sujetos sedentarios los valores tendieron a normalizarse con los iniciales.

4. Resultados y discusión

Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que, durante el reposo en los sujetos de los grupos entrenados, parte del BDNF circulante podría ir hacia el tejido muscular para unirse a su receptor y ayudar a reparar el daño generado durante el esfuerzo físico. Aunque hasta el momento no se ha descrito un mecanismo por el cual BDNF pueda llegar al lugar de la lesión, se sabe que células del sistema inmune como macrófagos y linfocitos expresan el receptor TrkB, por lo que mediante diapédesis, estos podrían transportar y liberar BDNF en el lugar de la inflamación, tal como se ha visto en modelos *in vitro*⁵⁵⁰⁻⁵⁵². Esta hipótesis es fuertemente apoyada por los resultados obtenidos por Clow y Jasmin (2010), quienes precisamente se centraron en determinar el papel de BDNF en la regeneración muscular. Para ello, los investigadores aislaron fibras musculares de ratones KO para BDNF en el músculo esquelético previamente inyectados con cardiotoxina, en los que encontraron menores niveles de Pax 7, miogenina, MyoD y miosina embrionaria (marcadores de regeneración muscular) cuando se compararon con sus controles, 5 días después del daño inducido (cuando los mioblastos empiezan a diferenciarse y fusionarse para reparar las fibras dañadas). Estos resultados fueron acompañados de un 40% menos de fibras regeneradas, y un 25% más de células mononucleares en el tejido del ratón KO. Sin embargo, dos días más tarde el porcentaje de fibras

regeneradas en el ratón KO alcanzó los niveles de su control, y la cantidad de células mononucleares retornó a valores del control, lo que hace pensar que la regeneración vista podría ser, en parte, debida al BDNF liberado desde las células del sistema inmune.

En el mismo estudio, pero sin previa inyección de cardiotoxina, los investigadores encontraron, *in vitro*, que la diferenciación miogénica en los ratones KO para BDNF a nivel muscular era menor que en sus controles, la cual se restableció luego de recibir tratamiento con BDNF exógeno.

En un estudio más reciente, Colombo y colaboradores (2013)⁵⁵³ confirmaron estos hallazgos al encontrar, *in vitro*, disminuida la diferenciación de mioblastos humanos luego de reducir la expresión y la actividad de BDNF mediante un ARN de interferencia y un anticuerpo específico de neutralización, respectivamente.

Así mismo, utilizando biopsias de pacientes con miopatía inflamatoria idiopática, estos investigadores encontraron que tanto macrófagos como linfocitos T fueron los encargados de liberar BDNF en las fibras regeneradas, en zonas cercanas a donde se encontraba su receptor de baja afinidad (p75), lo que sugirió que dichas células del sistema inmune contribuyen a la reparación del músculo

4. Resultados y discusión

esquelético utilizando BDNF como mediador, probablemente por unión a su receptor de baja afinidad.

Por otra parte, para entender el por qué del aumento de los niveles séricos de BDNF en nuestros grupos de mediana edad respecto a los jóvenes, debemos remitirnos a los experimentos realizados por Romanczyk y colaboradores (2002) y Webster y colaboradores (2011)^{281,554}. En ellos, los investigadores utilizaron tejido cerebral post mortem de neonatos, infantes, adolescentes, adultos jóvenes, adultos y personas mayores, para determinar los niveles de expresión del ARNm de TrkB en distintas zonas. Como era de esperarse, en ambos estudios los investigadores encontraron menor expresión del receptor de alta afinidad de BDNF en distintas zonas, a medida que el cerebro envejecía.

Por ejemplo, a nivel cortical, Romanczyk y colaboradores encontraron un pico en la expresión génica de TrkB en los adultos jóvenes principalmente en las capas II y III, que progresivamente fue disminuyendo con la edad hasta hacerse significativa en las personas mayores. Así mismo, el grupo de Webster encontraron que, a nivel general, la expresión más alta del receptor en todas las capas cerebrales se observó en el grupo de neonatos, con predisposición a ser mayor en las capas II y IV también durante la infancia, mientras que el grupo de personas

mayores tuvo una menor expresión comparada con los demás. De igual forma, un análisis correlacional entre los sujetos mostró una fuerte relación entre la edad y los niveles de expresión del ARNm de TrkB ($r = -0.68$; $p < 0.0001$).

Estos hallazgos anteriormente descritos ponen en consideración nuestra hipótesis de que, si a medida que pasan los años tenemos menor cantidad de receptores TrkB a nivel cerebral, el BDNF sintetizado tendrá menos sitios de unión aquí para ejercer su función señalizadora. Esto promoverá el ambiente necesario para que la mencionada neurotrofina cruce la barrera hematoencefálica en busca de más y mejores receptores que le permitan iniciar una de las acciones tróficas para las cuales ha sido generado. Esto podría explicar los mayores niveles de BDNF, a nivel periférico, encontrados en los individuos de nuestros grupos de mediana edad (MSG y MTG).

De esta forma, no sería extraño pensar que los individuos de MSG tuvieran menores receptores TrkB a nivel cerebral que los de MTG, lo cual podría comprometer su función hipocampal y contribuir a generar un decline en la cognición.

4.7. LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CATEPSINA B SON MODULADOS POR UN PERÍODO PROLONGADO DE ENTRENAMIENTO FÍSICO EN SUJETOS JÓVENES Y DE MEDIANA EDAD

La cisteína proteasa lisosomal CTSB es una miocina que se eleva en plasma después del entrenamiento físico en ratones, monos Rhesus y humanos. CTSB parece mediar los beneficios cognitivos y neurogénicos que el ejercicio físico induce a través de la expresión de BDNF²¹⁴. En la presente tesis hemos medido los niveles plasmáticos de CTSB en reposo en todos los grupos.

El análisis estadístico mostró efectos significativos tanto en el factor entrenamiento físico ($F_{(1,76)} = 22.04$; $p < 0.0001$) como en el factor edad ($F_{(1,76)} = 5.045$; $p = 0.0276$) (**Figura 4.11A**). Las **figuras 4.11B** y **C** muestran una correlación significativa inversa entre CTSB plasmática y el número de horas de ejercicio físico semanal en el grupo de individuos jóvenes ($r_{(32)} = -0.49$; $p = 0.004$), y en el de mediana edad ($r_{(44)} = -0.41$; $p = 0.005$). Estos resultados indican que CTSB se comportó de la misma manera que BDNF en respuesta al entrenamiento físico a largo plazo.

4. Resultados y discusión

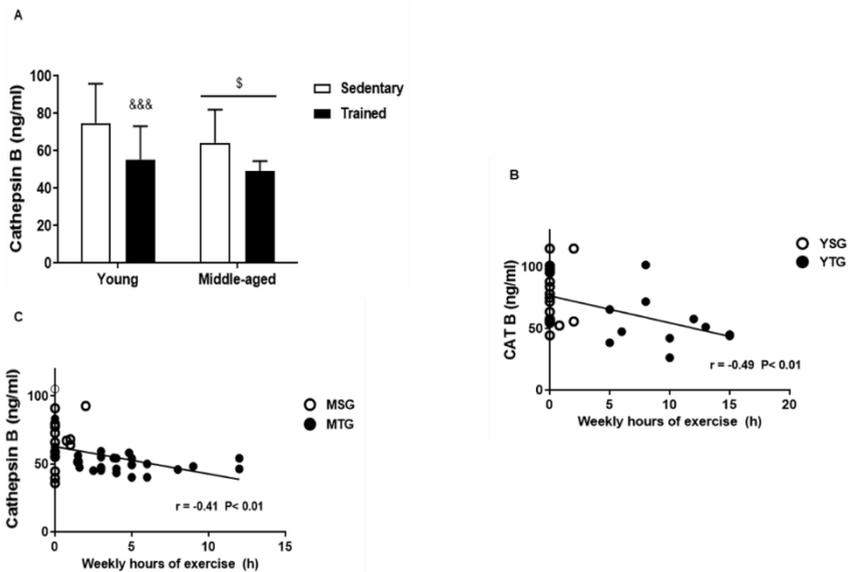


Figura 4.11. Niveles plasmáticos de Cathepsin B y su correlación con malondialdeído y el número de horas de ejercicio físico semanal, en sujetos jóvenes y de mediana edad.

(A) Niveles plasmáticos de Catepsina B en reposo en los grupos YSG, YTG, MSG y MTG. La significación estadística fue evaluada usando un ANOVA de dos vías. Las barras representan la media \pm DS. § $p < 0.05$ en el factor edad; §§§ $p < 0.001$ en el factor entrenamiento físico. (B, C) Pruebas de correlación de Spearman entre el número de horas de ejercicio físico semanal y los niveles plasmáticos de Cathepsina B en individuos jóvenes (B) y de mediana edad (C).

CTSB puede cruzar la barrera hematoencefálica para modular distintos eventos a nivel cerebral como la estimulación de la neurogénesis, el aprendizaje y la memoria, mediante la inducción de DCX y BDNF en el hipocampo de roedores²¹⁴.

Recientemente, Moon y colaboradores (2016)²¹⁴ encontraron que ratones WT que se ejercitaron de manera voluntaria mejoraron el desempeño en una prueba de

4. Resultados y discusión

memoria espacial, tuvieron un aumento de la neurogénesis del giro dentado y presentaron mayores niveles de CTSB en plasma y gastrocnemio, a diferencia de los ratones KO para CTSB. Igual que en roedores, los investigadores encontraron que monos Rhesus y humanos también tuvieron elevados niveles plasmáticos de CTSB en respuesta a un programa de ejercicio aeróbico de 4 meses, los cuales correlacionaron positivamente con los resultados en una prueba de atención y memoria en los humanos.

Para entender los alcances de esta proteína a nivel cerebral, el grupo de Moon estudió los efectos de la aplicación exógena de CTSB en células progenitoras del hipocampo, lo cual aumentó la expresión de ARNm y niveles de proteína de BDNF y DCX (del inglés *doublecortin*, un marcador de neurogénesis). De esta forma, los autores concluyeron que CTSB liberada por el músculo esquelético en respuesta a EF, cruza la barrera hematoencefálica y estimula la producción de BDNF y DCX en el hipocampo, desde donde modularía distintas vías de señalización relacionadas con la función cognitiva.

Pese a la evidencia anteriormente expuesta, varias investigaciones han encontrado un papel totalmente opuesto de CTSB, señalando una posible participación en la generación de $A\beta^{555-558}$. Por ejemplo, Cataldo & Nixon (1990) sugirieron que una modulación de esta proteasa

podría ser una herramienta terapéutica en el Alzheimer, debido a que encontraron CTSB en sitios extracelulares estrechamente asociados a las placas seniles, en cerebros de personas que padecieron EA⁵⁵⁹. Sin embargo, también ha sido demostrado que una inhibición de CTSB genera efectos beneficiosos en la reducción de A β y la formación de placa amiloidea⁵⁶⁰. Otras investigaciones han indicado que CTSB podría tener actividad β -secretasa^{561–563}.

Nuestros resultados de CTSB se asemejan a los hallados en BDNF, ya que encontramos una fuerte influencia en el factor ejercicio. Es decir, una disminución significativa de sus niveles plasmáticos en los grupos entrenados en comparación con los sedentarios. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que los niveles periféricos de CTSB y BDNF siguen el mismo patrón en los grupos MTG y YTG. Bajo esta perspectiva, similar a lo que ocurrió con BDNF, no podemos descartar una mayor eficiencia de la señalización de CTSB en los individuos de MTG y YTG lo que justificaría, en parte, sus menores niveles periféricos. Por lo tanto, es importante tener en consideración que más allá de la evidencia experimental de la participación de factores tróficos como BDNF y CTSB, no está clara la asociación entre sus niveles circulantes y la mejora de la función cognitiva⁵⁶⁴.

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis, podemos extraer las siguientes conclusiones:

Conclusión 1. El ejercicio físico a largo plazo aumenta la expresión de genes relacionados con el envejecimiento (SIRT3 y SIRT1), la defensa antioxidante endógena (CAT y SOD1) y disminuye la expresión de la citocina inflamatoria IL1 β y de los genes relacionados con la plasticidad y el trofismo neuronal (VEGFA y BDNF), en sujetos de mediana edad.

Conclusión 2. El ejercicio físico a largo plazo retrasa la pérdida de memoria en sujetos de mediana edad. Ésta correlaciona positivamente con el número de horas de ejercicio físico semanal. Pese a que no encontramos diferencias en otras variables cognitivas y neuropsicológicas, encontramos correlaciones positivas entre la cantidad de actividad física realizada con la atención, la memoria y las funciones ejecutivas.

Conclusión 3. La práctica de ejercicio físico a largo plazo disminuye los niveles periféricos basales de BDNF y CTSB en sujetos jóvenes y de mediana edad. Esta adaptación al entrenamiento podría ser debida a una captación más efectiva de dichas proteínas a nivel cerebral y muscular con el fin de potenciar vías de señalización relacionadas con la función cognitiva y la regeneración muscular.

5. Conclusiones

Conclusión 4. El ejercicio físico a largo plazo disminuye los niveles plasmáticos de MDA en sujetos jóvenes y de mediana edad, lo cual puede reflejar una adaptación de la defensa antioxidante endógena al entrenamiento.

El entrenamiento físico es una intervención efectiva en el mantenimiento de las funciones ejecutivas y en la prevención de la pérdida de memoria asociada a la edad. Esta protección se asocia con una modulación a nivel periférico de factores neurotróficos, de marcadores de daño oxidativo y del eje SIRT1-SIRT3.

6. REFERENCIAS

6. Referencias

1. Warburton, D. E. R., Gledhill, N. & Quinney, A. The effects of changes in musculoskeletal fitness on health. *Can. J. Appl. Physiol.* **26**, 161-216 (2001).
2. Warburton, D. E. R., Gledhill, N. & Quinney, A. Musculoskeletal fitness and health. *Can. J. Appl. Physiol.* **26**, 217-237 (2001).
3. Wallberg-Henriksson, H., Rincon, J. & Zierath, J. R. Exercise in the management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sport. Med.* **25**, 25-35 (1998).
4. Bird, S. R. & Hawley, J. A. Update on the effects of physical activity on insulin sensitivity in humans. *BMJ Open Sport and Exercise Medicine* **2**, (2017).
5. Prior, S. J. *et al.* Increased skeletal muscle capillarization independently enhances insulin sensitivity in older adults after exercise training and detraining. *Diabetes* **64**, 3386-3395 (2015).
6. Hood, D. A. *et al.* Exercise and the Regulation of Mitochondrial Turnover. en 99-127 (2015). doi:10.1016/bs.pmbts.2015.07.007
7. Ristow, M. *et al.* Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 8665-8670 (2009).
8. Domenech, E. & Viña, J. Moderate exercise is an antioxidant : Upregulation of antioxidant genes by training. **44**, 126-131 (2008).
9. Andersen, P. & Henriksson, J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J. Physiol.* **270**, 677-90 (1977).
10. Francescomarino, S. Di, Sciartilli, A., Valerio, V. Di, Baldassarre, A. Di & Gallina, S. The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Medicine* **39**, 797-812 (2009).
11. Hambrecht, R. *et al.* Effect of Exercise on Coronary Endothelial Function in Patients with Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* **342**, 454-460 (2000).
12. De la Rosa, A. *et al.* Long-term exercise training improves memory in middle-aged men and modulates peripheral levels of BDNF and Cathepsin B. *Sci. Rep.* **9**, 3337 (2019).

6. Referencias

13. Slentz, C. A. *et al.* Effects of the Amount of Exercise on Body Weight, Body Composition, and Measures of Central Obesity: STRRIDE - A Randomized Controlled Study. *Arch. Intern. Med.* **164**, 31-39 (2004).
14. Wei, M., Macera, C. A., Hornung, C. A. & Blair, S. N. Changes in lipids associated with change in regular exercise in free-living men. *J. Clin. Epidemiol.* **50**, 1137-1142 (1997).
15. Hamer, M. *et al.* Physical activity and inflammatory markers over 10 years: Follow-up in men and women from the whitehall II cohort study. *Circulation* **126**, 928-933 (2012).
16. Andreoli, A., Celi, M., Volpe, S. L., Sorge, R. & Tarantino, U. Long-term effect of exercise on bone mineral density and body composition in post-menopausal ex-elite athletes: A retrospective study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **66**, 69-74 (2012).
17. Pedersen, B. K. & Saltin, B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. 1-72 (2015). doi:10.1111/sms.12581
18. Eysenck, M. W. *Cognitive psychology : an international review.* (Wiley, 1990).
19. Benjafeld, J. G., Kingstone, A. & Smilek, D. *Cognition.* (Oxford University Press, 2010).
20. Zhang, J. *Cognitive Functions of the Brain: Perception, Attention and Memory.*
21. Lezak, M. D. Relationships between Personality Disorders, Social Disturbances, and Physical Disability Following Traumatic Brain Injury. *J. Head Trauma Rehabil.* **2**, 57-69 (1987).
22. Diamond, A. Executive Functions. *Annu. Rev.* (2012). doi:10.1146/annurev-psych-113011-143750
23. Anand, R., Gill, K. D. & Mahdi, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* **76**, 27-50 (2014).
24. Didic, M. *et al.* Hypothesis Which Memory System is Impaired First in Alzheimer's Disease? *J. Alzheimer's Dis.* **27**, 11-22 (2011).
25. Yesavage, J. A., Brooks, J. O., Taylor, J. & Tinklenberg, J. Development of aphasia, apraxia, and agnosia and decline in Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry* **150**, 742-747 (1993).

6. Referencias

26. dos Santos Picanco, L. C. *et al.* Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Curr. Med. Chem.* **25**, 3141-3159 (2018).
27. Alzheimer's Association. *2018 ALZHEIMER'S DISEASE FACTS AND FIGURES Includes a Special Report on the Financial and Personal Benefits of Early Diagnosis.* (2018).
28. Work. *World Health Organization; US National Institute of Aging. Global Health and Ageing. Geneva (CHE): WHO; 2011. Global Health and Aging*
29. Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A. & Evans, D. A. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* **80**, 1778-83 (2013).
30. Baumgart, M. *et al.* Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimers. Dement.* **11**, 718-26 (2015).
31. Profenno, L. A., Porsteinsson, A. P. & Faraone, S. V. Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders. *Biol. Psychiatry* **67**, 505-512 (2010).
32. Lindsay, J. *et al.* Risk Factors for Alzheimer's Disease: A Prospective Analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am. J. Epidemiol.* **156**, 445-453 (2002).
33. Morris, M. C. *et al.* MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement.* **11**, 1007-14 (2015).
34. Kukull, W. A. *et al.* Dementia and Alzheimer Disease Incidence. *Arch. Neurol.* **59**, 1737 (2002).
35. Evans, D. A. *et al.* Education and Other Measures of Socioeconomic Status and Risk of Incident Alzheimer Disease in a Defined Population of Older Persons. *Arch. Neurol.* **54**, 1399-1405 (1997).
36. Bherer, L., Erickson, K. I. & Liu-Ambrose, T. A review of the effects of physical activity and exercise on cognitive and brain functions in older adults. *J. Aging Res.* **2013**, 657508 (2013).
37. Sofi, F. *et al.* Physical activity and risk of cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *J. Intern. Med.* **269**, 107-117 (2011).

6. Referencias

38. Lautenschlager, N. T. *et al.* Effect of Physical Activity on Cognitive Function in Older Adults at Risk for Alzheimer Disease. *JAMA* **300**, 1027 (2008).
39. Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M. & Wilcock, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **66**, 137-147 (1999).
40. Sun, X., Jin, L. & Ling, P. Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug Discov. Ther.* **6**, 285-290 (2012).
41. Hardy, J. A. & Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184-5 (1992).
42. Aamodt, E. J. & Williams, R. C. Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments in vitro. *Biochemistry* **23**, 6023-31 (1984).
43. Kinney, J. W. *et al.* Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement. (New York, N. Y.)* **4**, 575-590 (2018).
44. El Khoury, J., Hickman, S. ., Thomas, C. ., Loike, J. . & Silverstein, S. . Microglia, Scavenger Receptors, and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* **19**, S81-S84 (1998).
45. Yan, S. Du *et al.* RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **382**, 685-691 (1996).
46. Marr, R. A. & Hafez, D. M. Amyloid-beta and Alzheimer's disease: the role of neprilysin-2 in amyloid-beta clearance. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 187 (2014).
47. Vitek, M. P. *et al.* Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 4766-4770 (1994).
48. Lee, C. Y. D. & Landreth, G. E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J. Neural Transm.* **117**, 949-960 (2010).
49. Chakrabarty, P. *et al.* Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses A β deposition *in vivo*: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J.* **24**, 548-559 (2010).

6. Referencias

50. Shafiqel, S. S. *et al.* Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J. Clin. Invest.* **117**, 1595-604 (2007).
51. Hickman, S. E., Allison, E. K. & El Khoury, J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* **28**, 8354-60 (2008).
52. Hsieh, H.-L. & Yang, C.-M. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res. Int.* **2013**, 484613 (2013).
53. Wee Yong, V. Inflammation in Neurological Disorders: A Help or a Hindrance? *Neurosci.* **16**, 408-420 (2010).
54. Meda, L. *et al.* Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . *Nature* **374**, 647-650 (1995).
55. Deslandes, A. *et al.* Exercise and Mental Health: Many Reasons to Move. *Neuropsychobiology* **59**, 191-198 (2009).
56. Eggermont, L., Swaab, D., Luiten, P. & Scherder, E. Exercise, cognition and Alzheimer's disease: More is not necessarily better. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **30**, 562-575 (2006).
57. Lista, I. & Sorrentino, G. Biological Mechanisms of Physical Activity in Preventing Cognitive Decline. *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**, 493-503 (2010).
58. Farmer, J. *et al.* Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male sprague-dawley rats in vivo. *Neuroscience* **124**, 71-79 (2004).
59. Cotman, C. W. & Berchtold, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **25**, 295-301 (2002).
60. Colcombe, S. & Kramer, A. F. Fitness effects on the cognitive function of older adults: A Meta-Analytic study. *Psychol. Sci.* **14**, 125-130 (2003).
61. Weuve, J. *et al.* Physical Activity, Including Walking, and Cognitive Function in Older Women. *JAMA* **292**, 1454 (2004).
62. Heyn, P., Abreu, B. C. & Ottenbacher, K. J. The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: A meta-analysis. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **85**, 1694-1704 (2004).

6. Referencias

63. Jernigan, T. L. *et al.* Effects of age on tissues and regions of the cerebrum and cerebellum. *Neurobiol. Aging* **22**, 581-594 (2001).
64. Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* **16**, 2027-33 (1996).
65. Heine, V. M., Maslam, S., Zareno, J., Joels, M. & Lucassen, P. J. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 131-144 (2004).
66. Laurin, D. *et al.* Physical Activity and Risk of Cognitive Impairment and Dementia in Elderly Persons. *Arch. Neurol.* **58**, 127-144 (2001).
67. Panza, G. A. *et al.* Can Exercise Improve Cognitive Symptoms of Alzheimer's Disease? *J. Am. Geriatr. Soc.* **66**, 487-495 (2018).
68. Weinstein, A. M. *et al.* The association between aerobic fitness and executive function is mediated by prefrontal cortex volume. *Brain. Behav. Immun.* **26**, 811-819 (2012).
69. Colcombe, S. J. *et al.* Aerobic Fitness Reduces Brain Tissue Loss in Aging Humans. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **58**, M176-M180 (2003).
70. Erickson, K. I. *et al.* Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 3017-3022 (2011).
71. Erickson, K. I. *et al.* Aerobic fitness is associated with hippocampal volume in elderly humans. *Hippocampus* **19**, 1030-9 (2009).
72. Makizako, H. *et al.* Moderate-Intensity Physical Activity, Hippocampal Volume, and Memory in Older Adults With Mild Cognitive Impairment. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **70**, 480-486 (2015).
73. Verstynen, T. D. *et al.* Caudate nucleus volume mediates the link between cardiorespiratory fitness and cognitive flexibility in older adults. *J. Aging Res.* **2012**, (2012).
74. Norton, S., Matthews, F. E., Barnes, D. E., Yaffe, K. & Brayne, C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: An analysis of population-based data. *Lancet Neurol.* **13**, 788-794 (2014).

6. Referencias

75. Spirduso, W. W. Reaction and Movement Time as a Function of age and Physical Activity Level. *J. Gerontol.* **30**, 435-440 (1975).
76. Lindsay, J. *et al.* Risk Factors for Alzheimer's Disease: A Prospective Analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am. J. Epidemiol.* **156**, 445-453 (2002).
77. Yoshitake, T. *et al.* Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Neurology* **45**, 1161-8 (1995).
78. Emery, C. F., Huppert, F. A. & Schein, R. L. Relationships among age, exercise, health, and cognitive function in a British sample. *Gerontologist* **35**, 378-85 (1995).
79. Hamer, M. & Chida, Y. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychol. Med.* **39**, 3 (2009).
80. Buchman, A. S. *et al.* Total daily physical activity and the risk of AD and cognitive decline in older adults. *Neurology* **78**, 1323-9 (2012).
81. Gligoroska, J. P. & Manchevska, S. The effect of physical activity on cognition - physiological mechanisms. *Mater. Sociomed.* **24**, 198-202 (2012).
82. Antunes, H. K. M. *et al.* Exercício físico e função cognitiva: uma revisão. *Rev. Bras. Med. do Esporte* **12**, 108-114 (2006).
83. Adlard, P. A., Perreau, V. M., Pop, V. & Cotman, C. W. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **25**, 4217-21 (2005).
84. Ohia-Nwoko, O., Montazari, S., Lau, Y.-S. & Eriksen, J. L. Long-term treadmill exercise attenuates tau pathology in P301S tau transgenic mice. *Mol. Neurodegener.* **9**, 54 (2014).
85. Bertsch, K. *et al.* Resting cerebral blood flow, attention, and aging. *Brain Res.* **1267**, 77-88 (2009).
86. Hagstadius, S. & Risberg, J. Regional cerebral blood flow characteristics and variations with age in resting normal subjects. *Brain Cogn.* **10**, 28-43 (1989).
87. Harada, C. N., Natelson Love, M. C. & Triebel, K. L. Normal cognitive aging. *Clin. Geriatr. Med.* **29**, 737-52 (2013).

6. Referencias

88. Park, D. C., Polk, T. A., Mikels, J. A., Taylor, S. F. & Marshuetz, C. Cerebral aging: integration of brain and behavioral models of cognitive function. *Dialogues Clin. Neurosci.* **3**, 151-65 (2001).
89. Heo, S. *et al.* Resting hippocampal blood flow, spatial memory and aging. *Brain Res.* **1315**, 119-27 (2010).
90. Parkes, L. M., Rashid, W., Chard, D. T. & Tofts, P. S. Normal cerebral perfusion measurements using arterial spin labeling: Reproducibility, stability, and age and gender effects. *Magn. Reson. Med.* **51**, 736-743 (2004).
91. LEENDERS, K. L. *et al.* CEREBRAL BLOOD FLOW, BLOOD VOLUME AND OXYGEN UTILIZATION. *Brain* **113**, 27-47 (1990).
92. Wolters, F. J. *et al.* Cerebral Perfusion and the Risk of Dementia. *Circulation* **136**, 719-728 (2017).
93. De Vis, J. B. *et al.* Arterial-spin-labeling (ASL) perfusion MRI predicts cognitive function in elderly individuals: A 4-year longitudinal study. *J. Magn. Reson. Imaging* **48**, 449-458 (2018).
94. Zhang, N., Gordon, M. L. & Goldberg, T. E. Cerebral blood flow measured by arterial spin labeling MRI at resting state in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **72**, 168-175 (2017).
95. Kalaria, R. N. Cerebral vessels in ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* **72**, 193-214 (1996).
96. Morrison, J. H. & Baxter, M. G. The ageing cortical synapse: Hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews Neuroscience* **13**, 240-250 (2012).
97. Austin, B. P. *et al.* Effects of Hypoperfusion in Alzheimer's Disease NIH Public Access. *J Alzheimers Dis* **26**, 123-133 (2011).
98. Asllani, I. *et al.* Multivariate and Univariate Analysis of Continuous Arterial Spin Labeling Perfusion MRI in Alzheimer's Disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28**, 725-736 (2008).
99. Binnewijzend, M. A. A. *et al.* Cerebral Blood Flow Measured with 3D Pseudocontinuous Arterial Spin-labeling MR Imaging in Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment: A Marker for Disease Severity. *Radiology* **267**, 221-230 (2013).

6. Referencias

100. Dietrich, H. H., Xiang, C., Han, B. H., Zipfel, G. J. & Holtzman, D. M. Soluble amyloid-beta, effect on cerebral arteriolar regulation and vascular cells. *Mol. Neurodegener.* **5**, 15 (2010).
101. Niwa, K. *et al.* Abeta 1-40-related reduction in functional hyperemia in mouse neocortex during somatosensory activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9735-40 (2000).
102. Suo, Z. *et al.* Soluble Alzheimers β -amyloid constricts the cerebral vasculature in vivo. *Neurosci. Lett.* **257**, 77-80 (1998).
103. Taddei, S. *et al.* Physical Activity Prevents Age-Related Impairment in Nitric Oxide Availability in Elderly Athletes. *Circulation* **101**, 2896-2901 (2000).
104. Burdette, J. H. *et al.* Using network science to evaluate exercise-associated brain changes in older adults. *Front. Aging Neurosci.* **2**, 23 (2010).
105. Ainslie, P. N. *et al.* Elevation in cerebral blood flow velocity with aerobic fitness throughout healthy human ageing. *J. Physiol.* **586**, 4005-4010 (2008).
106. Alfini, A. J. *et al.* Hippocampal and Cerebral Blood Flow after Exercise Cessation in Master Athletes. *Front. Aging Neurosci.* **8**, 184 (2016).
107. Chapman, S. B. *et al.* Shorter term aerobic exercise improves brain, cognition, and cardiovascular fitness in aging. *Front. Aging Neurosci.* **5**, 75 (2013).
108. Pereira, A. C. *et al.* An *in vivo* correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. **104**, (PNAS, 2007).
109. Sobol, N. A. *et al.* Effect of aerobic exercise on physical performance in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **12**, 1207-1215 (2016).
110. van der Kleij, L. A. *et al.* The effect of physical exercise on cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *NeuroImage Clin.* **20**, 650-654 (2018).
111. Steen Jensen, C. *et al.* Cerebrospinal Fluid Amyloid Beta and Tau Concentrations Are Not Modulated by 16 Weeks of Moderate- to High-Intensity Physical Exercise in Patients with Alzheimer Disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **42**, 146-158 (2016).

6. Referencias

112. Um, H.-S. *et al.* Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci. Res.* **69**, 161-173 (2011).
113. García-Mesa, Y. *et al.* Oxidative Stress Is a Central Target for Physical Exercise Neuroprotection Against Pathological Brain Aging. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **71**, 40-49 (2016).
114. Tapia-Rojas, C., Aranguiz, F., Varela-Nallar, L. & Inestrosa, N. C. Voluntary Running Attenuates Memory Loss, Decreases Neuropathological Changes and Induces Neurogenesis in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Brain Pathol.* **26**, 62-74 (2016).
115. Belarbi, K. *et al.* Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol. Dis.* **43**, 486-494 (2011).
116. Leem, Y.-H. *et al.* Repression of tau hyperphosphorylation by chronic endurance exercise in aged transgenic mouse model of tauopathies. *J. Neurosci. Res.* **87**, 2561-2570 (2009).
117. Richter, H. *et al.* Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Protection or symptom? *Behav. Brain Res.* **190**, 74-84 (2008).
118. García-Mesa, Y. *et al.* Physical Exercise Protects Against Alzheimer's Disease in 3xTg-AD Mice. *J. Alzheimer's Dis.* **24**, 421-454 (2011).
119. Wolf, S. A. *et al.* Cognitive and Physical Activity Differently Modulate Disease Progression in the Amyloid Precursor Protein (APP)-23 Model of Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* **60**, 1314-1323 (2006).
120. Liang, K. Y. *et al.* Exercise and Alzheimer's disease biomarkers in cognitively normal older adults. *Ann. Neurol.* **68**, 311-318 (2010).
121. Stillman, C. M. *et al.* Physical activity predicts reduced plasma β amyloid in the Cardiovascular Health Study. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **4**, 284-291 (2017).
122. Brown, B. M. *et al.* Physical activity and amyloid- β plasma and brain levels: results from the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle Study of Ageing. *Mol. Psychiatry* **18**, 875-881 (2013).

6. Referencias

123. Baker, L. D. *et al.* Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial. *Arch. Neurol.* **67**, 71-9 (2010).
124. STARKIE, R., OSTROWSKI, S. R., JAUFFRED, S., FEBBRAIO, M. & PEDERSEN, B. K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB J.* **17**, 884-886 (2003).
125. Gielen, S. *et al.* Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**, 861-868 (2003).
126. Chennaoui, M. *et al.* Effects of exercise on brain and peripheral inflammatory biomarkers induced by total sleep deprivation in rats. *J. Inflamm.* **12**, 56 (2015).
127. Hamer, M. *et al.* Physical Activity and Inflammatory Markers Over 10 Years. *Circulation* **126**, 928-933 (2012).
128. Ye, X., Qi, Q. & Franco, O. H. Associations of Physical Activity With Inflammatory Factors, Adipocytokines, and Metabolic Syndrome in Middle-Aged and Older Chinese People. (2009). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.833574
129. Reuben, D. B., Judd-Hamilton, L., Harris, T. B. & Seeman, T. E. The Associations Between Physical Activity and Inflammatory Markers in High-Functioning Older Persons: MacArthur Studies of Successful Aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* **51**, 1125-1130 (2003).
130. Colbert, L. H. *et al.* Physical Activity, Exercise, and Inflammatory Markers in Older Adults: Findings from The Health, Aging and Body Composition Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* **52**, 1098-1104 (2004).
131. Wannamethee, S. G. *et al.* Physical Activity and Hemostatic and Inflammatory Variables in Elderly Men. *Circulation* **105**, 1785-1790 (2002).
132. Taaffe, D. R., Harris, T. B., Ferrucci, L., Rowe, J. & Seeman, T. E. Cross-sectional and Prospective Relationships of Interleukin-6 and C-Reactive Protein With Physical Performance in Elderly Persons: MacArthur Studies of Successful Aging. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **55**, M709-M715 (2000).
133. Elosua, R. *et al.* Association Between Physical Activity, Physical Performance, and Inflammatory Biomarkers in an Elderly Population: The InCHIANTI Study. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **60**, 760-767 (2005).

6. Referencias

134. Ravaglia, G. *et al.* The Clock-Drawing Test in Elderly Italian Community Dwellers: Associations with Sociodemographic Status and Risk Factors for Vascular Cognitive Impairment. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **16**, 287-295 (2003).
135. Baune, B. T. *et al.* Association between IL-8 cytokine and cognitive performance in an elderly general population—The MEMO-Study. *Neurobiol. Aging* **29**, 937-944 (2008).
136. Yaffe, K. *et al.* Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and white elders. *Neurology* **61**, 76-80 (2003).
137. Teunissen, C. . *et al.* Inflammation markers in relation to cognition in a healthy aging population. *J. Neuroimmunol.* **134**, 142-150 (2003).
138. Yan, H. *et al.* Effect of moderate exercise on immune senescence in men. *Eur. J. Appl. Physiol.* **86**, 105-111 (2001).
139. Thijssen, D. H. J. *et al.* Haematopoietic stem cells and endothelial progenitor cells in healthy men: effect of aging and training. *Aging Cell* **5**, 495-503 (2006).
140. Woods, J. . *et al.* Effects of 6 months of moderate aerobic exercise training on immune function in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* **109**, 1-19 (1999).
141. Fairey, A. S. *et al.* Randomized controlled trial of exercise and blood immune function in postmenopausal breast cancer survivors. *J. Appl. Physiol.* **98**, 1534-1540 (2005).
142. Sellami, M. *et al.* Effects of Acute and Chronic Exercise on Immunological Parameters in the Elderly Aged: Can Physical Activity Counteract the Effects of Aging? *Front. Immunol.* **9**, 2187 (2018).
143. Nichol, K. E. *et al.* Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. *J. Neuroinflammation* **5**, 13 (2008).
144. Gomes da Silva, S. *et al.* Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. *J. Neuroinflammation* **10**, 827 (2013).
145. Wong, W. T. Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 22 (2013).

6. Referencias

146. Schuitemaker, A. *et al.* Microglial activation in healthy aging. *Neurobiol. Aging* **33**, 1067-1072 (2012).
147. Perry, V. H. & Holmes, C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 217-224 (2014).
148. Li, J.-W., Zong, Y., Cao, X.-P., Tan, L. & Tan, L. Microglial priming in Alzheimer's disease. *Ann. Transl. Med.* **6**, 176 (2018).
149. Barrientos, R. M. *et al.* Little exercise, big effects: reversing aging and infection-induced memory deficits, and underlying processes. *J. Neurosci.* **31**, 11578-86 (2011).
150. Kohman, R. A., Bhattacharya, T. K., Wojcik, E. & Rhodes, J. S. Exercise reduces activation of microglia isolated from hippocampus and brain of aged mice. *J. Neuroinflammation* **10**, 114 (2013).
151. Kohman, R. A., DeYoung, E. K., Bhattacharya, T. K., Peterson, L. N. & Rhodes, J. S. Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain. Behav. Immun.* **26**, 803-810 (2012).
152. Covington, J. D. & Bajpeyi, S. The sirtuins: Markers of metabolic health. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 79-91 (2016).
153. Sebastiań, C., Satterstrom, F. K., Haigis, M. C. & Mostoslavsky, R. From sirtuin biology to human diseases: An update. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 42444-42452 (2012).
154. Jęsko, H. & Strosznajder, R. P. Sirtuins and their interactions with transcription factors and poly(ADP-ribose) polymerases. *Folia Neuropathologica* **54**, 213-233 (2016).
155. Kupis, W., Pałyga, J., Tomal, E. & Niewiadomska, E. The role of sirtuins in cellular homeostasis. *Journal of Physiology and Biochemistry* **72**, 371-380 (2016).
156. Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R. & Denu, J. M. Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14178-14182 (2000).
157. Kleszcz, R., Paluszczak, J. & Baer-Dubowska, W. Targeting aberrant cancer metabolism - The role of sirtuins. *Pharmacological Reports* **67**, 1068-1080 (2015).

6. Referencias

158. Cantó, C. & Auwerx, J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Current Opinion in Lipidology* **20**, 98-105 (2009).
159. Merksamer, P. I. *et al.* The sirtuins, oxidative stress and aging: An emerging link. *Aging (Albany, NY)*. **5**, 144-150 (2013).
160. Masri, S. & Sassone-Corsi, P. Sirtuins and the circadian clock: Bridging chromatin and metabolism. *Science Signaling* **7**, (2014).
161. Satoh, A., Imai, S. I. & Guarente, L. The brain, sirtuins, and aging. *Nature Reviews Neuroscience* **18**, 362-374 (2017).
162. Feldman, J. L., Baeza, J. & Denu, J. M. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by Mammalian Sirtuins. *J. Biol. Chem.* **288**, 31350-31356 (2013).
163. Dali-Youcef, N. *et al.* Sirtuins: The «magnificent seven», function, metabolism and longevity. *Annals of Medicine* **39**, 335-345 (2007).
164. Grabowska, W., Sikora, E. & Bielak-Zmijewska, A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology* **18**, 447-476 (2017).
165. Pallàs, M. *et al.* Modulation of SIRT1 expression in different neurodegenerative models and human pathologies. *Neuroscience* **154**, 1388-1397 (2008).
166. Quintas, A., De Solís, A. J., Díez-Guerra, F. J., Carrascosa, J. M. & Bogónez, E. Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus. Prevention by late onset caloric restriction. *Exp. Gerontol.* **47**, 198-201 (2012).
167. Tang, B. L. Sirtuins as modifiers of Parkinson's disease pathology. *J. Neurosci. Res.* **95**, 930-942 (2017).
168. L., V. *et al.* Influence of age and physical exercise on sirtuin activity in humans. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **27**, 497-507 (2013).
169. Koltai, E. *et al.* Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 21-28 (2010).
170. de Guia, R. M. *et al.* Aerobic and resistance exercise training reverses age-dependent decline in NAD⁺ salvage capacity in human skeletal muscle. *Physiol. Rep.* **7**, (2019).

6. Referencias

171. Michán, S. *et al.* SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **30**, 9695-9707 (2010).
172. Saharan, S., Jhaveri, D. J. & Bartlett, P. F. SIRT1 regulates the neurogenic potential of neural precursors in the adult subventricular zone and hippocampus. *J. Neurosci. Res.* **91**, 642-659 (2013).
173. Codocedo, J. F., Allard, C., Godoy, J. A., Varela-Nallar, L. & Inestrosa, N. C. SIRT1 Regulates Dendritic Development in Hippocampal Neurons. *PLoS One* **7**, (2012).
174. Gao, J. *et al.* A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* **466**, 1105-1109 (2010).
175. Abe, N. *et al.* Altered sirtuin deacetylase gene expression in patients with a mood disorder. *J. Psychiatr. Res.* **45**, 1106-1112 (2011).
176. Corpas, R. *et al.* SIRT1 Overexpression in Mouse Hippocampus Induces Cognitive Enhancement Through Proteostatic and Neurotrophic Mechanisms. *Mol. Neurobiol.* **54**, 5604-5619 (2017).
177. Donmez, G. & Outeiro, T. F. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration. *EMBO Mol. Med.* **5**, 344-352 (2013).
178. Chung, S. *et al.* Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **501**, 79-90 (2010).
179. Qin, W. *et al.* Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J. Biol. Chem.* **281**, 21745-21754 (2006).
180. Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K. & Fahrenholz, F. Up-regulation of the α -secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J.* **23**, 1643-1654 (2009).
181. Jęsko, H., Wencel, P., Strosznajder, R. P. & Strosznajder, J. B. Sirtuins and Their Roles in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. *Neurochem. Res.* **42**, 876-890 (2017).
182. El Hayek, L. *et al.* Lactate Mediates the Effects of Exercise on Learning and Memory through SIRT1-Dependent Activation of Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). *J. Neurosci.* **39**, 2369-2382 (2019).

6. Referencias

183. Gurd, B. J. *et al.* Nuclear SIRT1 activity, but not protein content, regulates mitochondrial biogenesis in rat and human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **301**, R67-R75 (2011).
184. Ferrara, N. *et al.* Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. *Rejuvenation Res.* **11**, 139-150 (2008).
185. Gurd, B. J., Perry, C. G. R., Heigenhauser, G. & Spriet, L. L. High-intensity interval training increases SIRT1 activity in human skeletal muscle Skeletal muscle fatigue View project Mitochondrial bioenergetic dysfunction in muscle weakness disorders View project. (2014). doi:10.1139/H10-030
186. Taka, C. *et al.* SIRT1 and FOXO1 mRNA expression in PBMC correlates to physical activity in COPD patients. *Int. J. COPD* **12**, 3237-3244 (2017).
187. Lombard, D. B. *et al.* Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8807-8814 (2007).
188. Gurd, B. J., Holloway, G. P., Yoshida, Y. & Bonen, A. In mammalian muscle, SIRT3 is present in mitochondria and not in the nucleus; And SIRT3 is upregulated by chronic muscle contraction in an adenosine monophosphate-activated protein kinase-independent manner. *Metabolism.* **61**, 733-741 (2012).
189. Ahn, B. H. *et al.* A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14447-14452 (2008).
190. Sack, M. C. N. & Finkel, T. Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
191. Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M. D., Verdin, E. & Chen, D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab.* **12**, 662-667 (2010).
192. Tao, R. *et al.* Sirt3-Mediated Deacetylation of Evolutionarily Conserved Lysine 122 Regulates MnSOD Activity in Response to Stress. *Mol. Cell* **40**, 893-904 (2010).
193. Cheng, A. *et al.* Mitochondrial SIRT3 Mediates Adaptive Responses of Neurons to Exercise and Metabolic and Excitatory Challenges. *Cell Metab.* **23**, 128-142 (2016).

6. Referencias

194. Joseph, A.-M. *et al.* The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals. *Aging Cell* **11**, 801-809 (2012).
195. Lanza, I. R. *et al.* Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes* **57**, 2933-2942 (2008).
196. Palacios, O. M. *et al.* Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle. *Aging (Albany, NY)*. **1**, 771-783 (2009).
197. Koltai, E. *et al.* Master athletes have higher miR-7, SIRT3 and SOD2 expression in skeletal muscle than age-matched sedentary controls. *Redox Biol.* **19**, 46-51 (2018).
198. Sidorova-Darmos, E. *et al.* Differential expression of sirtuin family members in the developing, adult, and aged rat brain. *Front. Aging Neurosci.* **6**, (2014).
199. Fuke, S., Kubota-Sakashita, M., Kasahara, T., Shigeyoshi, Y. & Kato, T. Regional variation in mitochondrial DNA copy number in mouse brain. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807**, 270-274 (2011).
200. Xavier, J. M., Rodrigues, C. M. P. & Solá, S. Mitochondria: Major Regulators of Neural Development. *Neuroscientist* **22**, 346-58 (2016).
201. Tyagi, A. *et al.* SIRT3 deficiency-induced mitochondrial dysfunction and inflammasome formation in the brain. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
202. Yin, J. *et al.* Amyloid- β Increases Tau by Mediating Sirtuin 3 in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **55**, 8592-8601 (2018).
203. Han, P. *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects against β -amyloid toxicity. *Neurobiol. Aging* **35**, 2064-2071 (2014).
204. Weir, H. J. M. *et al.* CNS SIRT3 Expression Is Altered by Reactive Oxygen Species and in Alzheimer's Disease. *PLoS One* **7**, e48225 (2012).
205. Chapman, H. A., Riese, R. J. & Shi, G.-P. EMERGING ROLES FOR CYSTEINE PROTEASES IN HUMAN BIOLOGY. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 63-88 (1997).

6. Referencias

206. Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T. & Cazzulo, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1824**, 195-206 (2012).
207. Turk, V. *et al.* Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 68-88 (2012).
208. Mort, J. S. & Buttle, D. J. Cathepsin B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 715-720 (1997).
209. Bendiske, J. & Bahr, B. A. Lysosomal Activation Is a Compensatory Response Against Protein Accumulation and Associated Synaptopathogenesis—An Approach for Slowing Alzheimer Disease? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 451-463 (2003).
210. Felbor, U. *et al.* Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7883-8 (2002).
211. Mueller-Stainer, S. *et al.* Antiamyloidogenic and Neuroprotective Functions of Cathepsin B: Implications for Alzheimer's Disease. *Neuron* **51**, 703-714 (2006).
212. Embury, C. M. *et al.* Cathepsin B Improves β -Amyloidosis and Learning and Memory in Models of Alzheimer's Disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1-13 (2016). doi:10.1007/s11481-016-9721-6
213. Reiser, J., Adair, B. & Reinheckel, T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 3421-3431 (2010).
214. Moon, H. Y. *et al.* Running-Induced Systemic Cathepsin B Secretion Is Associated with Memory Function. *Cell Metab.* **24**, 332-340 (2016).
215. Norheim, F. *et al.* Proteomic identification of secreted proteins from human skeletal muscle cells and expression in response to strength training. *Am. J. Physiol. Metab.* **301**, E1013-E1021 (2011).
216. Birling, M.-C. & Price, J. Influence of growth factors on neuronal differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 878-884 (1995).
217. Thoenen, H. *et al.* Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* **270**, 593-8 (1995).

218. Gary, R. & Barde, Y. PHYSIOLOGY OF THE NEUROTROPHINS. 289-317 (1996).
219. Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 677-736 (2001).
220. Tartaglia, N. *et al.* Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 37585-93 (2001).
221. Altar, C. A. *et al.* Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* **389**, 856-60 (1997).
222. Davies, A. M. Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *EMBO J.* **22**, 2537-45 (2003).
223. Kokaia, Z. *et al.* Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 6711-6715 (1993).
224. Miranda, R. C., Sohrabji, F. & Toran-Allerand, C. D. Neuronal colocalization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggests a potential for autocrine interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 6439-6443 (1993).
225. Davies, A. M. Paracrine and autocrine actions of neurotrophic factors. *Neurochem. Res.* **21**, 749-753 (1996).
226. Thoenen, H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. en 183-191 (2000). doi:10.1016/S0079-6123(00)28016-3
227. Schinder, A. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **23**, 639-645 (2000).
228. Ying, Z., Roy, R. R., Edgerton, V. R. & Gómez-Pinilla, F. Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. *Brain Res.* **987**, 93-99 (2003).
229. Levi-Montalcini, R. & Hamburger, V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* **116**, 321-361 (1951).

6. Referencias

230. Snider, W. D. *et al.* Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell* **77**, 627-638 (1994).
231. Chan, J. R., Cosgaya, J. M., Wu, Y. J. & Shooter, E. M. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14661-8 (2001).
232. Xiao, N. & Le, Q.-T. Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **64**, 89-99 (2016).
233. Hallböök, F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 616-621 (1999).
234. Chevrel, G., Hohlfeld, R. & Sendtner, M. The role of neurotrophins in muscle under physiological and pathological conditions. *Muscle Nerve* **33**, 462-76 (2006).
235. Salehi, A., Delcroix, J.-D. & Mobley, W. C. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci.* **26**, 73-80 (2003).
236. Salehi, A., Delcroix, J.-D. & Swaab, D. F. Alzheimer's disease and NGF signaling. *J. Neural Transm.* **111**, 323-45 (2004).
237. Sofroniew, M. V, Howe, C. L. & Mobley, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1217-81 (2001).
238. BARDE, Y. A., LINDSAY, R. M., MONARD, D. & THOENEN, H. New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurones. *Nature* **274**, 818-818 (1978).
239. Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K. & Barde, Y. A. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **344**, 339-341 (1990).
240. Berkemeier, L. R. *et al.* Neurotrophin-5: A novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7**, 857-866 (1991).
241. McAllister, A. K., Katz, L. C. & Lo, D. C. NEUROTROPHINS AND SYNAPTIC PLASTICITY. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 295-318 (1999).

6. Referencias

242. Curtis, R. *et al.* Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron* **14**, 1201-1211 (1995).
243. Villanueva, R. & Villanueva, R. Neurobiology of Major Depressive Disorder. *Neural Plast.* **2013**, 1-7 (2013).
244. Barde, Y.-A., Edgar, D. & Thoenen, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 549-553 (1982).
245. Leibrock, J. *et al.* Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **341**, 149-152 (1989).
246. Rosenfeld, R. D. *et al.* Purification and Identification of Brain-Derived Neurotrophic Factor from Human Serum. *Protein Expr. Purif.* **6**, 465-471 (1995).
247. Poduslo, J. F. & Curran, G. L. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **36**, 280-6 (1996).
248. Pan, W., Banks, W. A., Fasold, M. B., Bluth, J. & Kastin, A. J. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* **37**, 1553-61 (1998).
249. Karege, F., Schwald, M. & Cisse, M. *Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. Neuroscience Letters* **328**, (2002).
250. Kyeremanteng, C., James, J., MacKay, J. & Merali, Z. A Study of Brain and Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Protein in Wistar and Wistar-Kyoto Rat Strains after Electroconvulsive Stimulus. *Pharmacopsychiatry* **45**, 244-249 (2012).
251. Mowla, S. J. *et al.* Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 12660-12666 (2001).
252. Hempstead, B. Dissecting the Diverse Actions of Pro- and Mature Neurotrophins. *Curr. Alzheimer Res.* **3**, 19-24 (2006).
253. Klein, R. *et al.* The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* **66**, 395-403 (1991).
254. Shelton, D. L. *et al.* Human trks: Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Expression of Extracellular Domain Immunoadhesins. *J. Neurosci.* **15**, 477-491 (1995).

6. Referencias

255. Tyler, W. J., Alonso, M., Bramham, C. R. & Pozzo-Miller, L. D. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn. Mem.* **9**, 224-37 (2002).
256. Matthews, V. B. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* **52**, 1409-18 (2009).
257. Kermani, P. & Hempstead, B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **17**, 140-3 (2007).
258. Kawamura, K., Kawamura, N., Mulders, S. M., Sollewijn Gelpke, M. D. & Hsueh, A. J. W. Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9206-11 (2005).
259. Kerschensteiner, M. *et al.* Activated Human T Cells, B Cells, and Monocytes Produce Brain-derived Neurotrophic Factor In Vitro and in Inflammatory Brain Lesions: A Neuroprotective Role of Inflammation? *J. Exp. Med.* **189**, 865-870 (1999).
260. Cassiman, D., Deneef, C., Desmet, V. J. & Roskams, T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* **33**, 148-58 (2001).
261. Lommatzsch, M. *et al.* Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions. *Am. J. Pathol.* **155**, 1183-93 (1999).
262. Nakahashi, T. *et al.* Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett.* **470**, 113-7 (2000).
263. Besser, M. & Wank, R. Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J. Immunol.* **162**, 6303-6 (1999).
264. Tsukinoki, K. *et al.* Immobilization Stress Induces BDNF in Rat Submandibular Glands. *J. Dent. Res.* **85**, 844-848 (2006).

6. Referencias

265. Tsukinoki, K. *et al.* Submandibular Glands Contribute to Increases in Plasma BDNF Levels. *J. Dent. Res.* **86**, 260-264 (2007).
266. Kemi, C. *et al.* Differential regulation of neurotrophin expression in human bronchial smooth muscle cells. *Respir. Res.* **7**, 18 (2006).
267. Rasmussen, P. *et al.* Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp. Physiol.* **94**, 1062-1069 (2009).
268. Greenberg, M. E., Xu, B., Lu, B. & Hempstead, B. L. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci.* **29**, 12764-7 (2009).
269. Park, H. & Poo, M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 7-23 (2013).
270. Garoflos, E., Stamatakis, A., Mantelas, A., Philippidis, H. & Stylianopoulou, F. Cellular mechanisms underlying an effect of "early handling" on pCREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus. *Brain Res.* **1052**, 187-195 (2005).
271. Johnson-Farley, N. N., Patel, K., Kim, D. & Cowen, D. S. Interaction of FGF-2 with IGF-1 and BDNF in stimulating Akt, ERK, and neuronal survival in hippocampal cultures. *Brain Res.* **1154**, 40-49 (2007).
272. Christie, B. R. *et al.* Exercising our brains: how physical activity impacts synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Neuromolecular Med.* **10**, 47-58 (2008).
273. Brunet, A. *et al.* Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* **96**, 857-868 (1999).
274. Luikart, B. W. *et al.* Neurotrophin-Dependent Dendritic Filopodial Motility: A Convergence on PI3K Signaling. *J. Neurosci.* **28**, 7006-7012 (2008).
275. Shaywitz, A. J. & Greenberg, M. E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 821-61 (1999).
276. Gass, P. & Riva, M. A. CREB, neurogenesis and depression. *Bioessays* **29**, 957-61 (2007).

6. Referencias

277. Balogh, A. *et al.* Overexpression of CREB protein protects from tunicamycin-induced apoptosis in various rat cell types. *Apoptosis* **19**, 1080-1098 (2014).
278. Jain, V., Baitharu, I., Prasad, D. & Ilavazhagan, G. Enriched environment prevents hypobaric hypoxia induced memory impairment and neurodegeneration: role of BDNF/PI3K/GSK3 β pathway coupled with CREB activation. *PLoS One* **8**, e62235 (2013).
279. Ortega-Martínez, S. A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **8**, (2015).
280. Erickson, K. I. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *J. Neurosci.* **30**, 5368-75 (2010).
281. Webster, M. J., Herman, M. M., Kleinman, J. E. & Shannon Weickert, C. *BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampus and temporal cortex during the human lifespan.* *Gene Expression Patterns* **6**, (2006).
282. Yasutake, C., Kuroda, K., Yanagawa, T., Okamura, T. & Yoneda, H. Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **256**, 402-6 (2006).
283. Komulainen, P. *et al.* Neurobiology of Learning and Memory BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women : The DR ' s EXTRA Study q. (2008). doi:10.1016/j.nlm.2008.07.014
284. Squinto, S. P. *et al.* trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* **65**, 885-893 (1991).
285. Patapoutian, A. & Reichardt, L. F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 272-280 (2001).
286. Allsopp, T. E., Robinson, M., Wyatt, S. & Davies, A. M. TrkA mediates an NGF survival response in NGF-independent sensory neurons but not in parasympathetic neurons. *Gene Ther.* **1 Suppl 1**, S59 (1994).
287. Fariñas, I. & Reichardt, L. F. Neurotrophic factors and their receptors: implications of genetic studies.

6. Referencias

288. Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction*. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 609-642 (2003).
289. Zhang, Y., Moheban, D. B., Conway, B. R., Bhattacharyya, A. & Segal, R. A. Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J. Neurosci.* **20**, 5671-8 (2000).
290. Ginty, D. D. & Segal, R. A. Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 268-274 (2002).
291. Smeyne, R. J. *et al.* Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* **368**, 246-249 (1994).
292. Crowley, C. *et al.* Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* **76**, 1001-11 (1994).
293. Klein, R. *et al.* Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* **75**, 113-122 (1993).
294. Frade, J. M. & Barde, Y.-A. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *BioEssays* **20**, 137-145 (1998).
295. Bronfman, F. C. & Fainzilber, M. Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep.* **5**, 867-71 (2004).
296. Barker, P. A. & Shooter, E. M. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* **13**, 203-215 (1994).
297. Kraemer, B. R., Yoon, S. O. & Carter, B. D. The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. *Handb. Exp. Pharmacol.* **220**, 121-64 (2014).
298. Hamanoue, M. *et al.* p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 28-40 (1999).
299. Burke, M. A. & Bothwell, M. p75 neurotrophin receptor mediates neurotrophin activation of NF-kappa B and induction of iNOS expression in P19 neurons. *J. Neurobiol.* **55**, 191-203 (2003).
300. Carter, B. D. *et al.* Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* **272**, 542-5 (1996).

6. Referencias

301. Aloyz, R. S. *et al.* p53 Is Essential for Developmental Neuron Death as Regulated by the TrkA and p75 Neurotrophin Receptors. *J. Cell Biol.* **143**, 1691-1703 (1998).
302. Barrett, G. L. & Bartlett, P. F. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6501-5 (1994).
303. Berchtold, N. C., Chinn, G., Chou, M., Kesslak, J. P. & Cotman, C. W. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience* **133**, 853-861 (2005).
304. Maejima, H., Kanemura, N., Kokubun, T., Murata, K. & Takayanagi, K. Exercise enhances cognitive function and neurotrophin expression in the hippocampus accompanied by changes in epigenetic programming in senescence-accelerated mice. *Neurosci. Lett.* **665**, 67-73 (2018).
305. Winter, B. *et al.* High impact running improves learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* **87**, 597-609 (2007).
306. Kim, T.-W., Choi, H.-H. & Chung, Y.-R. Treadmill exercise alleviates impairment of cognitive function by enhancing hippocampal neuroplasticity in the high-fat diet-induced obese mice. *J. Exerc. Rehabil.* **12**, 156-62 (2016).
307. Klein, A. B. *et al.* Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **14**, 347-353 (2011).
308. Holsinger, R. M. D., Schnarr, J., Henry, P., Castelo, V. T. & Fahnestock, M. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Mol. Brain Res.* **76**, 347-354 (2000).
309. Phillips, H. S. *et al.* BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* **7**, 695-702 (1991).
310. Duyckaerts, C., Potier, M.-C. & Delatour, B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* **115**, 5-38 (2007).

6. Referencias

311. van Dooren, T., Dewachter, I., Borghgraef, P. & van Leuven, F. Transgenic Mouse Models for APP Processing and Alzheimer's Disease: Early and Late Defects. en 45-63 (2005). doi:10.1007/0-387-23226-5_2
312. Spires, T. L. & Hyman, B. T. Transgenic Models of Alzheimer's Disease: Learning from Animals. *NeuroRX* **2**, 423-437 (2005).
313. Elder, G. A., Gama Sosa, M. A. & De Gasperi, R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt. Sinai J. Med.* **77**, 69-81 (2010).
314. German, D. C. & Eisch, A. J. Mouse Models of Alzheimer's Disease: Insight into Treatment. *Rev. Neurosci.* **15**, 353-370 (2004).
315. MCGOWAN, E., ERIKSEN, J. & HUTTON, M. A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet.* **22**, 281-289 (2006).
316. Yaffe, K., Barnes, D., Nevitt, M., Lui, L.-Y. & Covinsky, K. A Prospective Study of Physical Activity and Cognitive Decline in Elderly Women. *Arch. Intern. Med.* **161**, 1703 (2001).
317. Weuve, J. Physical Activity, Including Walking, and Cognitive Function in Older Women. *JAMA* **292**, 1454 (2004).
318. Choi, S. H. *et al.* Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. *Science (80-.)*. **361**, eaan8821 (2018).
319. Gold, S. M. *et al.* Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. *J. Neuroimmunol.* **138**, 99-105 (2003).
320. Zoladz, J. A. *et al.* ENDURANCE TRAINING INCREASES PLASMA BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR CONCENTRATION IN YOUNG HEALTHY MEN. *J. Physiol. Pharmacol.* **59**, 119-132 (2008).
321. Tang, S. W., Chu, E., Hui, T., Helmeste, D. & Law, C. *Influence of exercise on serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in healthy human subjects.* *Neuroscience Letters* **431**, (2008).
322. Seifert, T. *et al.* Endurance training enhances BDNF release from the human brain. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R372-7 (2010).

6. Referencias

323. Rojas Vega, S. *et al.* Acute BDNF and cortisol response to low intensity exercise and following ramp incremental exercise to exhaustion in humans. *Brain Res.* **1121**, 59-65 (2006).
324. Cho, H.-C. *et al.* The concentrations of serum, plasma and platelet BDNF are all increased by treadmill VO₂max performance in healthy college men. *Neurosci. Lett.* **519**, 78-83 (2012).
325. BRUNELLI, A. *et al.* Acute Exercise Modulates BDNF and pro-BDNF Protein Content in Immune Cells. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **44**, 1871-1880 (2012).
326. Griffin, É. W. *et al.* Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. *Physiol. Behav.* **104**, 934-941 (2011).
327. Ferris, L. T., Williams, J. S. & Shen, C.-L. The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. *Med. Sci. Sports Exerc.* **39**, 728-34 (2007).
328. Aughan, S. U. E. V *et al.* The effects of multimodal exercise on cognitive and physical functioning and brain-derived neurotrophic factor in older women : a randomised controlled trial. 1-6 (2014). doi:10.1093/ageing/afu010
329. Kramer, A. F. *et al.* Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* **400**, 418-419 (1999).
330. Colcombe, S. J. *et al.* Aerobic exercise training increases brain volume in aging humans. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **61**, 1166-70 (2006).
331. Langlois, F. *et al.* Benefits of Physical Exercise Training on Cognition and Quality of Life in Frail Older Adults. *Journals Gerontol. Ser. B Psychol. Sci. Soc. Sci.* **68**, 400-404 (2013).
332. Young, J., Angevaren, M., Rusted, J. & Tabet, N. Aerobic exercise to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. *Cochrane database Syst. Rev.* **4**, CD005381 (2015).
333. Burns, J. M. *et al.* Cardiorespiratory fitness and brain atrophy in early Alzheimer disease. *Neurology* **71**, 210-6 (2008).
334. Coelho, F. G. de M. *et al.* Acute aerobic exercise increases brain-derived neurotrophic factor levels in elderly with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **39**, 401-8 (2014).

6. Referencias

335. Sies, H., Cadenas, E., Symons, M. C. R. & Scott, G. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **311**, 617-31 (1985).
336. Jones, D. P. Redefining oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling* **8**, 1865-1879 (2006).
337. Sies, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* **4**, 180-183 (2015).
338. Diplock, A. T. *et al.* Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.* **80 Suppl 1**, S77-112 (1998).
339. Gracy, R. ., Talent, J. ., Kong, Y. & Conrad, C. . Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **428**, 17-22 (1999).
340. Elejalde Guerra, J. I. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Interna* **18**, 50-59 (2001).
341. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine. Free Radicals in Biology and Medicine* (Oxford University Press, 2015). doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001
342. Gutiérrez-Salinas, J. *et al.* Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Rev Esp Med Quir* **19**, (2014).
343. Melo, R. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. *Cell Biol. Int.* **27**, 853-861 (2003).
344. Henríquez-Olguin, C. *et al.* Cytosolic ROS production by NADPH oxidase 2 regulates muscle glucose uptake during exercise. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
345. Gomez-Cabrera, M.-C. *et al.* Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr* **87**, 142-9 (2008).
346. Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S. & Floyd, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. en *Free Radical Biology and Medicine* **28**, 1456-1462 (2000).

6. Referencias

347. Yamada, T. *et al.* Activation of p38 MAPK by oxidative stress underlying epirubicin-induced vascular endothelial cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1285-1293 (2012).
348. Wittmann, C. *et al.* Hydrogen peroxide in inflammation: Messenger, guide, and assassin. *Advances in Hematology* **2012**, (2012).
349. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**, 44-84 (2007).
350. Cadenas, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 79-110 (1989).
351. Weiss, S. J. Tissue Destruction by Neutrophils. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198902093200606> (2010).
352. Kornbrust, D. J. & Mavis, R. D. Microsomal lipid peroxidation. II. Stimulation by carbon tetrachloride. *Mol. Pharmacol.* **17**, 408-14 (1980).
353. Hu, Y. P. *et al.* Reactive Oxygen Species Mediated Prostaglandin E2 Contributes to Acute Response of Epithelial Injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, (2017).
354. Jackson, M. J., Pye, D. & Palomero, J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **102**, 1664-1670 (2007).
355. Boveris, A. & Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707-716 (1973).
356. Kanter, M. M. Free radicals, exercise, and antioxidant supplementation. *Int. J. Sport Nutr.* **4**, 205-220 (1994).
357. St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. & Brand, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **277**, 44784-44790 (2002).
358. Kavazis, A. N. *et al.* Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 842-850 (2009).
359. Meo, S. Di & Venditti, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *NeuroSignals* **10**, 125-140 (2001).

6. Referencias

360. Herrero, A. & Barja, G. ADP-Regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I- or complex II-linked substrates: Implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 241-249 (1997).
361. Aviello, G. & Knaus, U. G. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract review-article. *Mucosal Immunology* **11**, 1011-1023 (2018).
362. Genestra, M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling* **19**, 1807-1819 (2007).
363. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**, 47-95 (2002).
364. Ugartondo Casadevall, V. Caracterización de derivados obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. (Barcelona, 2009).
365. Aikens, J. & Dix, T. A. Effect of solution ionic strength on lipid peroxidation initiation by the perhydroxyl (xanthine oxidase-derived) and peroxy radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 263-7
366. Aikens, J. & Dix, T. A. Hydrodioxy (Perhydroxyl), Peroxy, and Hydroxyl Radical-Initiated Lipid Peroxidation of Large Unilamellar Vesicles (Liposomes): Comparative and Mechanistic Studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 516-525 (1993).
367. Choe, M., Jackson, C. & Yu, B. P. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 977-984 (1995).
368. Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E. & Sato, K. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 201S-205S (1991).
369. Halliwell, B. & Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 715S-725S (1993).
370. Gaschler, M. M. & Stockwell, B. R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **482**, 419-425 (2017).
371. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* **344**, 721-724 (1994).

6. Referencias

372. Barrera, G. *et al.* Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants* **7**, (2018).
373. Nielsen, H. Covalent binding of peroxidized phospholipid to protein: III. Reaction of individual phospholipids with different proteins. *Lipids* **16**, 215-222 (1981).
374. Valenzuela, A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.* **48**, 301-309 (1991).
375. Marks, D. S., Hopf, T. A. & Sander, C. Protein structure prediction from sequence variation. *Nature Biotechnology* **30**, 1072-1080 (2012).
376. Stadtman, E. R. Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.* **40**, 1250-1258 (2006).
377. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. & Milzani, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin. Chem.* **52**, 601-623 (2006).
378. Wolff, S. P. & Dean, R. T. Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem. J.* **234**, 399-403 (1986).
379. Wolff, S. P., Garner, A. & Dean, R. T. Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 27-31 (1986).
380. Freeman, B. A. & Crapo, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**, 412-26 (1982).
381. Grune, T., Reinheckel, T. & Davies, K. J. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* **11**, 526-34 (1997).
382. Stadtman, E. Protein oxidation and aging. *Science (80-.)*. **257**, 1220-1224 (1992).
383. Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150-166 (2005).
384. BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E. & FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Ann. Bot.* **91**, 179-194 (2003).

6. Referencias

385. Blake, D. R., Allen, R. E. & Lunec, J. Free radicals in biological systems--a review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull.* **43**, 371-85 (1987).
386. Greenwald, R. A. & Moy, W. W. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* **23**, 455-63 (1980).
387. Steenken, S. & Jovanovic, S. V. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 617-618 (1997).
388. Dizdaroglu, M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett.* **315**, 1-6 (1993).
389. Svoboda, P. *et al.* Urinary 8-Hydroxyguanine May Be a Better Marker of Oxidative Stress Than 8-Hydroxydeoxyguanosine in Relation to the Life Spans of Various Species. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 985-992 (2006).
390. Anson, R. M. & Bohr, V. A. Mitochondria, oxidative DNA damage, and aging. *J. Am. Aging Assoc.* **23**, 199-218 (2000).
391. Demple, B. & Linn, S. 5,6-Saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res.* **10**, 3781-3789 (1982).
392. Higuchi, Y. & Linn, S. Purification of All Forms of HeLa Cell Mitochondrial DNA and Assessment of Damage to It Caused by Hydrogen Peroxide Treatment of Mitochondria or Cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 7950-7956 (1995).
393. Randerath, E., Danna, T. F. & Randerath, K. DNA damage induced by cigarette smoke condensate in vitro as assayed by ³²P-postlabeling. Comparison with cigarette smoke-associated DNA adduct profiles in vivo. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **268**, 139-153 (1992).
394. Webster, N. R. & Nunn, J. F. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br. J. Anaesth.* **60**, 98-108 (1988).
395. Cerutti, P. A. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **227**, 375-81 (1985).
396. Gros, L., Sapparbaev, M. K. & Laval, J. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* **21**, 8905-8925 (2002).

6. Referencias

397. Demple, B. Regulation of Bacterial Oxidative Stress Genes. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 315-337 (1991).
398. Imlay, J. A. & Linn, S. DNA Damage and Oxygen Radical Toxicity. *Science (80-.)*. **240**, (1988).
399. Justo, C. & Venereo Gutiérrez, R. DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES. *Rev Cuba. Med Milit* **31**, 126-33 (2002).
400. Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R.-D. V. & Huang, P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1343-74 (2008).
401. Chihuailaf, R. H., Contreras, P. A. & Wittwer, F. G. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health.
402. Membrillo Ortega, A. *et al.* Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: una revisión. *Interciencia* **28**, 699-704 (2003).
403. Hicks, J. J., Torres-Ramos, Y. D. & Sierra-Vargas, M. P. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Rev. Endocrinol. y Nutr.* **14**, 223-226 (2006).
404. Culotta, V. C., Yang, M. & O'Halloran, T. V. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**, 747-758 (2006).
405. Karnati, S., Lüers, G., Pfreimer, S. & Baumgart-Vogt, E. Mammalian SOD2 is exclusively located in mitochondria and not present in peroxisomes. *Histochem. Cell Biol.* **140**, 105-117 (2013).
406. Powers, S. K. & Jackson, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* **88**, 1243-76 (2008).
407. Zámocký, M. & Koller, F. Understanding the structure and function of catalases: Clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **72**, 19-66 (1999).
408. Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P. C. Review Diversity of structures and properties among catalases. *C. Cell. Mol. Life Sci* **61**, 192-208 (2004).

6. Referencias

409. Drevet, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Mol. Cell. Endocrinol.* **250**, 70-79 (2006).
410. Brigelius-Flohé, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. en *Biological Chemistry* **387**, 1329-1335 (2006).
411. Björnstedt, M., Kumar, S., Björkhem, L., Spyrou, G. & Holmgren, A. Selenium and the Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *Biomed. Environ. Sci.* **10**, 271-279 (1997).
412. Holmgren, A. *et al.* Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems: Scheme 1. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1375-1377 (2005).
413. Björnstedt, M. *The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase Sysdiet View project Enantiomeric glycerides View project. Article in Journal of Biological Chemistry* (1994).
414. Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M. & Kensler, T. W. Enhanced Expression of the Transcription Factor Nrf2 by Cancer Chemopreventive Agents: Role of Antioxidant Response Element-Like Sequences in the nrf2 Promoter. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2883-2892 (2002).
415. Chanas, S. A. *et al.* Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem. J.* **365**, 405-416 (2002).
416. Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z. & Brigelius-Flohe, R. The GI-GPx Gene Is a Target for Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4914-4923 (2005).
417. Rotblat, B., Melino, G. & Knight, R. A. NRF2 and p53: Januses in cancer? *Oncotarget* **3**, 1272-1283 (2012).
418. Done, A. J. & Traustadóttir, T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biology* **10**, 191-199 (2016).
419. Sardesai, V. M. Role of Antioxidants in Health Maintenance. *Nutr. Clin. Pract.* **10**, 19-25 (1995).
420. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85 (1990).

6. Referencias

421. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. & Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 577-586 (2005).
422. Hensley, K. *et al.* New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine* **36**, 1-15 (2004).
423. Naziroğlu, M. & Butterworth, P. J. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can. J. Appl. Physiol.* **30**, 172-185 (2005).
424. Consideration of the evidence on childhood obesity for the Commission on Ending Childhood Obesity. *World Heal. Organ.*
425. Craig, C. L. *et al.* International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med. Sci. Sports Exerc.* **35**, 1381-95 (2003).
426. Folsom, A. R., Jacobs, D. R., Caspersen, C. J., Gomez-Marín, O. & Knudsen, J. Test-retest reliability of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire. *J. Chronic Dis.* **39**, 505-511 (1986).
427. Buschke, H. Cued recall in Amnesia. *J. Clin. Neuropsychol.* **6**, 433-440 (1984).
428. Grober, E. & Buschke, H. Genuine memory deficits in dementia. *Dev. Neuropsychol.* **3**, 13-36 (1987).
429. Llinàs-Reglà, J. *et al.* The Trail Making Test. *Assessment* **24**, 183-196 (2017).
430. Smith, A. Symbol digits modalities test Los Angeles: western psychological services. en *Western Psychological Services* 83-91 (1968).
431. Manual for the Wechsler Adult Intelligence Scale. - PsycNET. Disponible en: <https://psycnet.apa.org/record/1955-07334-000>. (Accedido: 5.ª marzo 2020)
432. Anderson, P. J. Leader of the Pack - Neuropsychological Assessment, 5 th Edition , Muriel Lezak, Diane B. Howieson, Erin D. Bigler, & Daniel Tranel. 2012. New York: Oxford University Press, 1161 pp., \$125.00 (HB). . *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **19**, 488-489 (2013).

6. Referencias

433. Golden, C. A Manual for the Clinical and Experimental Use of the Stroop Color and Word Test. *Fac. Books B. Chapters* (1978).
434. Robbins, T. W. *et al.* Cambridge neuropsychological test automated battery (CANTAB): A factor analytic study of a large sample of normal elderly volunteers. *Dementia* **5**, 266-281 (1994).
435. HAMILTON, M. THE ASSESSMENT OF ANXIETY STATES BY RATING. *Br. J. Med. Psychol.* **32**, 50-55 (1959).
436. HAMILTON, M. A rating scale for depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **23**, 56-62 (1960).
437. Buysse, D. J., Reynolds, C. F., Monk, T. H., Berman, S. R. & Kupfer, D. J. The Pittsburgh sleep quality index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* **28**, 193-213 (1989).
438. Zelinski, E. M. & Schaie, K. W. The Memory Functioning Questionnaire for assessment of memory complaints in adulthood and old age Discriminating High Fall Risk on an Inpatient Rehabilitation Unit View project Lifespan Intellectual abilities and personality View project. *Artic. Psychol. Aging* (1990). doi:10.1037/0882-7974.5.4.482
439. Solé-Padullés, C. *et al.* Brain structure and function related to cognitive reserve variables in normal aging, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **30**, 1114-1124 (2009).
440. Zhong, L. *et al.* A rapid and cost-effective method for genotyping apolipoprotein e gene polymorphism. *Mol. Neurodegener.* **11**, (2016).
441. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-75 (1951).
442. Olson, B. J. S. C. & Markwell, J. Assays for Determination of Protein Concentration. en *Current Protocols in Protein Science* 3.4.1-3.4.29 (John Wiley & Sons, Inc., 2007). doi:10.1002/0471140864.ps0304s48
443. Wong, S. H. *et al.* Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* **33**, 214-20 (1987).

6. Referencias

444. Stadtman, E. R. Protein oxidation and aging. *Science* **257**, 1220-4 (1992).
445. Stadtman, E. R. Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 797-821 (1993).
446. Davies, K. J. A., Delsignore, M. E. & Lin, S. W. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals 11. MODIFICATION OF AMINO ACIDS**. **262**, (1987).
447. Levine, R. L. *Oxidative Modification of Glutamine Synthetase Downloaded from. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **258**, (1983).
448. Pognonec, P., Katop, H. & Roederl, R. G. *The Helix-Loop-Helix/Leucine Repeat Transcription Factor USF Can Be Functionally Regulated in a Redox-dependent Manner**. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **267**, (1992).
449. Neubauer, O. *et al.* Time course-dependent changes in the transcriptome of human skeletal muscle during recovery from endurance exercise: from inflammation to adaptive remodeling. *J. Appl. Physiol.* **116**, 274-287 (2014).
450. Brown, M. D. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Experimental Physiology* **88**, 645-658 (2003).
451. Vital, T. M. *et al.* Physical exercise and vascular endothelial growth factor (VEGF) in elderly: A systematic review. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **59**, 234-239 (2014).
452. Archer, T. Physical exercise alleviates debilities of normal aging and Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* **123**, 221-238 (2011).
453. Duman, R. S. Neurotrophic factors and regulation of mood: Role of exercise, diet and metabolism. en *Neurobiology of Aging* **26**, 88-93 (Elsevier Inc., 2005).
454. Fabel, K. *et al.* VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. **18**, (2003).
455. Bolijn, S. & Lucassen, P. J. How the Body Talks to the Brain; Peripheral Mediators of Physical Activity-Induced Proliferation in the Adult Hippocampus. *Brain Plast.* **1**, 5-27 (2016).

6. Referencias

456. Müller-McNicoll, M., Rossbach, O., Hui, J. & Medenbach, J. Auto-regulatory feedback by RNA-binding proteins. *J. Mol. Cell Biol.* **11**, 930-939 (2019).
457. Pucci, B. *et al.* Sirtuins: The molecular basis of beneficial effects of physical activity. *Internal and Emergency Medicine* **8**, 23-25 (2013).
458. Bayod, S. *et al.* Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues. *Exp. Gerontol.* **47**, 925-935 (2012).
459. Kumar, R. *et al.* Identification of serum sirtuins as novel noninvasive protein markers for frailty. *Aging Cell* **13**, 975-980 (2014).
460. Kumar, R. *et al.* Sirtuin1: A Promising Serum Protein Marker for Early Detection of Alzheimer's Disease. *PLoS One* **8**, (2013).
461. Julien, C. *et al.* Sirtuin 1 Reduction Parallels the Accumulation of Tau in Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 48-58 (2009).
462. Lee, J. *et al.* SIRT3 deregulation is linked to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Aging Cell* **17**, e12679 (2018).
463. Zeng, L. *et al.* Age-related decrease in the mitochondrial sirtuin deacetylase sirt3 expression associated with ROS accumulation in the auditory cortex of the mimetic aging rat model. *PLoS One* **9**, (2014).
464. Porter, G. A., Urciuoli, W. R., Brookes, P. S. & Nadtochiy, S. M. SIRT3 deficiency exacerbates ischemia-reperfusion injury: implication for aged hearts. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **306**, H1602-H1609 (2014).
465. Revilla, S. *et al.* Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain. *Neuropharmacology* **81**, 55-63 (2014).
466. Bo, H. *et al.* Exercise-Induced Neuroprotection of Hippocampus in APP/PS1 Transgenic Mice via Upregulation of Mitochondrial 8-Oxoguanine DNA Glycosylase. (2014). doi:10.1155/2014/834502
467. McDonnell, E., Peterson, B. S., Bomze, H. M. & Hirschey, M. D. SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **26**, 486-492 (2015).

6. Referencias

468. Ansari, A. *et al.* Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell* **16**, 4-16 (2017).
469. Li, H. *et al.* Honokiol Alleviates Cognitive Deficits of Alzheimer's Disease (PS1 V97L) Transgenic Mice by Activating Mitochondrial SIRT3. *J. Alzheimer's Dis.* **64**, 291-302 (2018).
470. Kwon, S. *et al.* Obesity and aging diminish sirtuin 1 (SIRT1)-mediated deacetylation of SIRT3, leading to hyperacetylation and decreased activity and stability of SIRT3. *J. Biol. Chem.* **292**, 17312-17323 (2017).
471. Hirschey, M. D., Shimazu, T., Capra, J. A., Pollard, K. S. & Verdin, E. SIRT1 and SIRT3 deacetylate homologous substrates: AceCS1,2 and HMGCS1,2. *Aging (Albany. NY)*. **3**, 635-642 (2011).
472. Bell, E. L. & Guarente, L. The SirT3 Divining Rod Points to Oxidative Stress. *Molecular Cell* **42**, 561-568 (2011).
473. Chen, T. *et al.* Sirt1-Sirt3 axis regulates human blood-brain barrier permeability in response to ischemia. *Redox Biol.* **14**, 229-236 (2018).
474. Bouzid, M. A., Filaire, E., Matran, R., Robin, S. & Fabre, C. Lifelong Voluntary Exercise Modulates Age-Related Changes in Oxidative Stress. *Int. J. Sports Med.* **39**, 21-28 (2018).
475. Vinña, J. *et al.* Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by Antioxidants. *IUBMB Life* **50**, 271-277 (2001).
476. Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H. & Atalay, M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: The balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxidants and Redox Signaling* **18**, 1208-1246 (2013).
477. Brites, F. D. *et al.* Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin. Sci.* **96**, 381-385 (1999).
478. Gabbett, T., King, T. & Jenkins, D. Applied physiology of rugby league. *Sports Medicine* **38**, 119-138 (2008).
479. Teixeira, V., Valente, H., Casal, S., Marques, F. & Moreira, P. Antioxidant status, oxidative stress, and damage in elite trained kayakers and canoeists and sedentary controls. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **19**, 443-456 (2009).

6. Referencias

480. MA Melikoglu, M. K. D. K. I. S. I. K. K. S. The effect of regular long term training on antioxidant enzymatic activities. *J Sport. Med Phys Fit.* **48**, 388-390 (2008).
481. Evelson, P. *et al.* Higher antioxidant defences in plasma and low density lipoproteins from rugby players. *Eur. J. Clin. Invest.* **32**, 818-825 (2002).
482. de Souza, R. F. *et al.* Endurance training on rodent brain antioxidant capacity: A meta-analysis. *Neuroscience Research* **145**, 1-9 (2019).
483. Brown-Borg, H. M. & Rakoczy, S. G. Catalase expression in delayed and premature aging mouse models. *Exp. Gerontol.* **35**, 199-212 (2000).
484. Lawler, J. M. *et al.* Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: Effects of fiber type and age. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **265**, (1993).
485. Şentürk, Ü., Aktekin, B. & Aktekin, M. *The Effect of One Year's Swimming Exercise on Oxidant Stress and Antioxidant Capacity in Aged Rats.* (2004).
486. Cardoso, B. R., Hare, D. J., Bush, A. I. & Roberts, B. R. Glutathione peroxidase 4: a new player in neurodegeneration? *Mol. Psychiatry* **22**, 328-335 (2017).
487. Han, J., Liu, X., Li, Y., Zhang, J. & Yu, H. Sirt1/Nrf2 signalling pathway prevents cognitive impairment in diabetic rats through anti-oxidative stress induced by miRNA-23b-3p expression. *Mol. Med. Rep.* **17**, 8414-8422 (2018).
488. Huang, K. *et al.* Sirt1 resists advanced glycation end products-induced expressions of fibronectin and TGF- β 1 by activating the Nrf2/ARE pathway in glomerular mesangial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 528-540 (2013).
489. Allison, M. A., Jensky, N. E., Marshall, S. J., Bertoni, A. G. & Cushman, M. Sedentary behavior and adiposity-associated inflammation: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Am. J. Prev. Med.* **42**, 8-13 (2012).
490. Healy, G. N., Matthews, C. E., Dunstan, D. W., Winkler, E. A. H. & Owen, N. Sedentary time and cardio-metabolic biomarkers in US adults: NHANES 200306. *Eur. Heart J.* **32**, 590-597 (2011).

6. Referencias

491. Bradburn, S., Sarginson, J. & Murgatroyd, C. A. Association of peripheral interleukin-6 with global cognitive decline in non-demented adults: A meta-analysis of prospective studies. *Frontiers in Aging Neuroscience* **9**, (2018).
492. Rea, I. M. *et al.* Age and age-related diseases: Role of inflammation triggers and cytokines. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
493. Woods, J. A., Wilund, K. R., Martin, S. A. & Kistler, B. M. Exercise, inflammation and aging. *Aging and Disease* **3**, 130-140 (2012).
494. Abramson, J. L. & Vaccarino, V. Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults. *Arch. Intern. Med.* **162**, 1286-1292 (2002).
495. JANKORD, R. & JEMIOLO, B. Influence of Physical Activity on Serum IL-6 and IL-10 Levels in Healthy Older Men. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **36**, 960-964 (2004).
496. Pilling, L. C. *et al.* Gene expression markers of age-related inflammation in two human cohorts. *Exp. Gerontol.* **70**, 37-45 (2015).
497. Marsland, A. L. *et al.* Interleukin-6 Covaries Inversely With Cognitive Performance Among Middle-Aged Community Volunteers. *Psychosom. Med.* **68**, 895-903 (2006).
498. Lekander, M. *et al.* Cytokines and memory across the mature life span of women. *Scand. J. Psychol.* **52**, 229-235 (2011).
499. Singh, V. K. & Guthikonda, P. Circulating cytokines in Alzheimer's disease. *J. Psychiatr. Res.* **31**, 657-660 (1997).
500. Braida, D. *et al.* Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice. *Behav. Brain Res.* **153**, 423-429 (2004).
501. Petersen, R. C., Smith, G. E., Ivnik, R. J., Kokmen, E. & Tangalos, E. G. Memory function in very early Alzheimer's disease. *Neurology* **44**, 867-872 (1994).
502. Grober, E., Lipton, R. B., Hall, C. & Crystal, H. Memory impairment on free and cued selective reminding predicts dementia. *Neurology* **54**, 827-832 (2000).

6. Referencias

503. Ngandu, T. *et al.* A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* **385**, 2255-63 (2015).
504. Polidori, M. C., Nelles, G. & Pientka, L. Prevention of Dementia: Focus on Lifestyle. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2010**, (2010).
505. Colcombe, S. & Kramer, A. F. FITNESS EFFECTS ON THE COGNITIVE FUNCTION OF OLDER ADULTS: A Meta-Analytic Study. **14**, (2003).
506. van Boxtel, M. P. *et al.* Aerobic capacity and cognitive performance in a cross-sectional aging study. *Med. Sci. Sports Exerc.* **29**, 1357-65 (1997).
507. Rogers, R. L. *et al.* After Reaching Retirement Age Physical Activity Sustains Cerebral Perfusion and Cognition. *J. Am. Geriatr. Soc.* **38**, 123-128 (1990).
508. Karen, H. *et al.* Alterações Cognitivas em Idosas Decorrentes do Exercício Físico Sistematizado. *Rev. da Sobama Dezembro* **6**, 27-33 (2001).
509. Griffin, É. W. *et al.* Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. *Physiol. Behav.* **104**, 934-41 (2011).
510. Ruscheweyh, R. *et al.* Physical activity and memory functions: An interventional study. *Neurobiol. Aging* **32**, 1304-1319 (2011).
511. Williams, P. & Lord, S. R. Effects of group exercise on cognitive functioning and mood in older women. *Aust. N. Z. J. Public Health* **21**, 45-52 (1997).
512. TULVING, E. & OSLER, S. EFFECTIVENESS OF RETRIEVAL CUES IN MEMORY FOR WORDS. *J. Exp. Psychol.* **77**, 593-601 (1968).
513. Grober, E., Sanders, A. E., Hall, C. & Lipton, R. B. Free and cued selective reminding identifies very mild dementia in primary care. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **24**, 284-290 (2010).
514. STRICKS, L., PITTMAN, J., JACOBS, D. M., SANO, M. & STERN, Y. Normative data for a brief neuropsychological battery administered to English- and Spanish-speaking community-dwelling elders. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **4**, 311-318 (1998).

6. Referencias

515. Campo, P. Normative data and reliability for a Spanish version of the verbal Selective Reminding Test. *Arch. Clin. Neuropsychol.* **19**, 421-435 (2004).
516. Grober, E., Lipton, R. B., Katz, M. & Sliwinski, M. Demographic influences on free and cued selective reminding performance in older persons. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* **20**, 221-226 (1998).
517. Kleinloog, J. P. D. *et al.* Aerobic Exercise Training Improves Cerebral Blood Flow and Executive Function: A Randomized, Controlled Cross-Over Trial in Sedentary Older Men. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 333 (2019).
518. Kawashima, R. *et al.* Human cerebellum plays an important role in memory-timed finger movement: an fMRI study. *J. Neurophysiol.* **83**, 1079-87 (2000).
519. Henke, K., Buck, A., Weber, B. & Wieser, H. G. Human hippocampus establishes associations in memory. *Hippocampus* **7**, 249-256 (1997).
520. Isaacs, K. R., Anderson, B. J., Alcantara, A. A., Black, J. E. & Greenough, W. T. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **12**, 110-9 (1992).
521. Brown, B. S. *et al.* Chronic response of rat brain norepinephrine and serotonin levels to endurance training. *J. Appl. Physiol.* **46**, 19-23 (1979).
522. Inglés, M. *et al.* Active paraplegics are protected against exercise-induced oxidative damage through the induction of antioxidant enzymes. *Spinal Cord* **54**, 830-837 (2016).
523. García-Mesa, Y. *et al.* Physical exercise neuroprotects ovariectomized 3xTg-AD mice through BDNF mechanisms. *Psychoneuroendocrinology* **45**, 154-166 (2014).
524. Rahnama, N., Gaeini, A. A. & Hamedinia, M. R. [Oxidative stress responses in physical education students during 8 weeks aerobic training. *J. Sports Med. Phys. Fitness* **47**, 119-23 (2007).
525. Aikensf, J. *Perspectives Mechanisms and Biological Relevance of Lipid Peroxidation Initiation.* *Chem. Res. Toxicol* **6**, (1993).
526. Viña, J., Lloret, A., Ortí, R. & Alonso, D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: Prevention of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* **25**, 117-123 (2004).

6. Referencias

527. Viña, J., Borras, C. & Gomez-Cabrera, M. C. A free radical theory of frailty. *Free Radical Biology and Medicine* **124**, 358-363 (2018).
528. Liu, J. *et al.* Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol.* **89**, 21-8 (2000).
529. Bloomer, R. J. & Fisher-Wellman, K. H. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gend. Med.* **5**, 218-228 (2008).
530. Nofuji, Y. *et al.* Decreased serum brain-derived neurotrophic factor in trained men. *Neurosci. Lett.* **437**, 29-32 (2008).
531. Chan, K. L., Tong, K. Y. & Yip, S. P. Relationship of serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and health-related lifestyle in healthy human subjects. *Neurosci. Lett.* **447**, 124-8 (2008).
532. Cotman, C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* **25**, 295-301 (2002).
533. KatoH-Semba, R. *et al.* Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls. *Int. J. Dev. Neurosci.* **25**, 367-372 (2007).
534. Cho, H. *et al.* The concentrations of serum, plasma and platelet BDNF are all increased by treadmill VO₂max performance in healthy college men. *Neurosci. Lett.* **519**, 78-83 (2012).
535. Currie, J., Ramsbottom, R., Ludlow, H., Nevill, A. & Gilder, M. Cardio-respiratory fitness, habitual physical activity and serum brain derived neurotrophic factor (BDNF) in men and women. *Neurosci. Lett.* **451**, 152-5 (2009).
536. Schmolesky, M. T., Webb, D. L. & Hansen, R. A. The effects of aerobic exercise intensity and duration on levels of brain-derived neurotrophic factor in healthy men. *J. Sports Sci. Med.* **12**, 502-11 (2013).
537. Jung, S. H., Kim, J., Davis, J. M., Blair, S. N. & Cho, H. Association among basal serum BDNF, cardiorespiratory fitness and cardiovascular disease risk factors in untrained healthy Korean men. *Eur. J. Appl. Physiol.* **111**, 303-11 (2011).
538. Kim, Y. II. *The impact of exercise training on basal BDNF in athletic adolescents.*

6. Referencias

539. Babaei, P., Damirchi, A., Mehdipoor, M. & Tehrani, B. S. Long term habitual exercise is associated with lower resting level of serum BDNF. *Neurosci. Lett.* **566**, 304-308 (2014).
540. Austin, M. W. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a potential mechanism of the effects of acute exercise on cognitive performance. *J. Sport Heal. Sci.* **4**, 14-23 (2014).
541. Kim, M. W. *et al.* Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res.* **1052**, 16-21 (2005).
542. Liu, Y.-F. *et al.* Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J. Physiol.* **587**, 3221-31 (2009).
543. Fujimura, H. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb. Haemost.* **87**, 728-34 (2002).
544. Mitsumoto, H. *et al.* Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science (80-)*. **265**, 1107-1110 (1994).
545. Gransee, H. M., Zhan, W.-Z., Sieck, G. C. & Mantilla, C. B. Localized delivery of brain-derived neurotrophic factor-expressing mesenchymal stem cells enhances functional recovery following cervical spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **32**, 185-93 (2015).
546. Zhang, Z.-J. *et al.* Human umbilical cord blood stem cells and brain-derived neurotrophic factor for optic nerve injury: a biomechanical evaluation. *Neural Regen. Res.* **10**, 1134-8 (2015).
547. Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Kanter, J. L. & He, Z. PTEN/mTOR and axon regeneration. *Exp. Neurol.* **223**, 45-50 (2010).
548. Gomez-Cabrera, M.-C. *et al.* Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br. J. Nutr.* **96**, S31-S33 (2006).
549. Sanchis-Gomar, F. *et al.* Allopurinol prevents cardiac and skeletal muscle damage in professional soccer players. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* **25**, e110-e115 (2015).

6. Referencias

550. Kerschensteiner, M. *et al.* Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* **189**, 865-70 (1999).
551. Schenone, A., Gill, J. S., Zacharias, D. A. & Windebank, A. J. Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* **64**, 141-149 (1996).
552. Barouch, R., Appel, E., Kazimirsky, G. & Brodie, C. Macrophages express neurotrophins and neurotrophin receptors. *J. Neuroimmunol.* **112**, 72-77 (2001).
553. Autocrine and immune cell-derived BDNF in human skeletal muscle: implications for myogenesis and tissue regeneration. - PubMed - NCBI. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775641>.
554. Romanczyk, T. B. *et al.* Alterations in trkB mRNA in the human prefrontal cortex throughout the lifespan. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 269-280 (2002).
555. Cataldo, A. M., Hamilton, D. J., Barnett, J. L., Paskevich, P. A. & Nixon, R. A. Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **16**, 186-99 (1996).
556. Cataldo, A. M. *et al.* A β localization in abnormal endosomes: association with earliest A β elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol. Aging* **25**, 1263-1272 (2004).
557. Hook, V. *et al.* Inhibition of cathepsin B reduces b-amyloid production in regulated secretory vesicles of neuronal chromaffin cells: evidence for cathepsin B as a candidate b-secretase of Alzheimer's disease. *Biol. Chem* **386**, 931-940 (2005).
558. Mackay, E. A. *et al.* A Possible Role for Cathepsins D, E, and B in the Processing of beta-amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Biochem.* **244**, 414-425 (1997).
559. Cataldo, A. M. & Nixon, R. A. *Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, (1990).

6. Referencias

560. Zheng, X. *et al.* Z-Phe-Ala-diazomethylketone (PADK) disrupts and remodels early oligomer states of the Alzheimer disease A β 42 protein. *J. Biol. Chem.* **287**, 6084-6088 (2012).
561. Hook, G., Yu, J., Toneff, T., Kindy, M. & Hook, V. Brain pyroglutamate amyloid- β is produced by cathepsin b and is reduced by the cysteine protease inhibitor E64d, representing a potential alzheimer's disease therapeutic. *J. Alzheimer's Dis.* **41**, 129-149 (2014).
562. Hook, G., Hook, V. Y. H. & Kindy, M. Cysteine protease inhibitors reduce brain β -amyloid and β -secretase activity in vivo and are potential Alzheimer's disease therapeutics. *Biol. Chem.* **388**, 979-983 (2007).
563. Schechter, I. & Ziv, E. Cathepsins S, B and L with aminopeptidases display β -secretase activity associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biol. Chem.* **392**, 555-569 (2011).
564. Kim, S. *et al.* Roles of myokines in exercise-induced improvement of neuropsychiatric function. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **471**, 491-505 (2019).

7. ANEXOS

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y CAPÍTULOS DE LIBRO DEL DOCTORANDO

- De la Rosa A, Gomez-Cabrera MC, Vinue A, Gonzalez-Navarro H, Sanchez-Andres JV, Viña J. **Overexpression of Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase preserves mouse pancreatic beta cells function until late in life (Manuscript submitted to Diabetes, marzo de 2020)**
- De la Rosa A, Solana E, Corpas R, Bartrés-Faz D, Pallàs M, Vina J, Sanfeliu C, Gomez-Cabrera MC. **Long-term exercise training improves memory in middle-aged men and modulates peripheral levels of BDNF and Cathepsin B. Scientific Reports (2019).**
- Arc-Chagnaud Coralie, Millan F, Salvador-Pascual A, Correas A, Olaso-Gonzalez G, De la Rosa Gonzalez A, Carretero A, Gomez-Cabrera M-C, Viña J. **Reversal of age-associated frailty by controlled physical exercise: The pre-clinical and clinical evidences. Sports Medicine and Health Science. (2019).**

7. Anexos

- Corpas R, Solana E, De la Rosa A, Sarroca S, Griñán-Ferré C, Oriol M, Corbella E, Rodríguez-Farré E, Vina J, Pallàs M, Bartrés-Faz D, Gomez-Cabrera MC and Sanfeliu C (2019). **Peripheral Maintenance of the Axis SIRT1-SIRT3 at Youth Level May Contribute to Brain Resilience in Middle-Aged Amateur Rugby Players.** *Front. Aging Neurosci.*
- De la Rosa A, Olaso-Gonzalez G, Arc-Chagnaud Coralie, Millan F, Salvador-Pascual A, Garcia-Lucerga C, Blasco-Lafarga C, García-Domínguez E, Carretero A, Correas A G, Viña J, Gomez-Cabrera MC. **Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease.** *Journal of Sport and Health Science.* (2020)
- Viña José, Olaso-González Gloria, Arc Chagnaud Coralie, De la Rosa A, Gómez-Cabrera MC. **Modulating oxidant levels to promote healthy ageing.** *Journal of Antioxidants and Redox Signaling.* (2020)

- ✓ De la Rosa A, Olaso-González G, García-Domínguez E, Arc-Chagnaud C, Millán F, Correas AG, Gómez-Cabrera MC. **Alzheimer: don't forget to move.** Capítulo de libro *para la sociedad valenciana de Geriatria y Gerontología*.

- ✓ Arc-Chagnaud C, Millán F, Correas AG, De la Rosa A, García-Domínguez E, Olaso-González G, Viña J. **Ejercicio físico personalizado para la reversión de la fragilidad asociada a la edad: evidencias preclínicas y clínicas.** Capítulo de libro *para la sociedad valenciana de Geriatria y Gerontología*.

- ✓ Correas AG, Arc-Chagnaud, De la Rosa A, Millán F, García-Domínguez E, Olaso-González G, Viña J. **Enfermedad de Alzheimer: enfermedades metabólicas y sus consecuencias.** Capítulo de libro *para la sociedad valenciana de Geriatria y Gerontología*.

7. Anexos



Overexpression of Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase preserves mouse pancreatic β -cells function until late in life

Journal:	<i>Diabetes</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Brief Report: Pathophysiology
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	De la Rosa, Adrian; Freshage Research Group, Faculty of Medicine, University of Valencia and CIBERFES, Physiology Gomez-Cabrera, Maria del Carmen; Freshage Research Group, Faculty of Medicine, University of Valencia and CIBERFES, Physiology Vinue, Angela; Institute of Health Research INCLIVA, Institute of Health Research INCLIVA González-Navarro, Herminia; Institute of Health Research INCLIVA, Institute of Health Research INCLIVA Sanchez-Andres, Juan V.; University Jaume I, Medicine Vina, Jose; Universitat de Valencia, Departamento de Fisiologia;

Article | Open Access | Published: 04 March 2019

Long-term exercise training improves memory in middle-aged men and modulates peripheral levels of BDNF and Cathepsin B

Adrián De la Rosa, Elisabeth Solana, Rubén Corpas, David Bartrés-Faz, Mercè Pallàs, Jose Vina, Coral Sanfeliu  & Mari Carmen Gomez-Cabrera 

Scientific Reports 9, Article number: 3337 (2019) | Cite this article

4729 Accesses | 4 Citations | 42 Altmetric | Metrics

Abstract

Aging is accompanied by a decline in memory and other brain functions. Physical exercise may mitigate this decline through the modulation of factors participating in the crosstalk between skeletal muscle and the brain, such as neurotrophins and oxidative stress parameters. We aimed to determine whether long term exercise training (35 ± 15 years) promotes memory maintenance in middle-aged men, and to characterize the changes in neurotrophic factors and lipid oxidation markers in peripheral blood samples in both middle-aged and young men. The neuropsychological analysis showed significant improvements in memory through the Free and Cued Immediate Recall tests, in the middle-aged trained individuals when compared to the sedentary ones. We found a significant decrease in the resting serum BDNF and plasma Cathepsin B (CTSB) levels in the trained groups at both middle and young ages. BDNF and CTSB levels were inversely correlated with weekly hours of exercise. We also found a significant decrease in plasma malondialdehyde, an index of lipid peroxidation, in middle-aged and young trained subjects. The positive impact of long-term exercise training by delaying the onset of physiological memory loss and the associated neurotrophic and redox peripheral modulation, suggests the effectiveness of exercise as preventive strategy against age-related memory loss and neurodegeneration.

Peripheral Maintenance of the Axis SIRT1-SIRT3 at Youth Level May Contribute to Brain Resilience in Middle-Aged Amateur Rugby Players

Rubén Corpas¹, Elisabeth Solana², Adrian De la Rosa³, Sara Sarroca⁴, Christian Griñán-Ferré⁵, Mireia Oriol⁶, Emili Corbella⁷, Eduard Rodríguez-Farré⁸, Jose Vina⁹, Mercè Pallàs¹⁰, David Bartrés-Faz², Mari Carmen Gomez-Cabrera^{2,11} and Coral Sanfeliu^{2,11}

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Biomedical Research Centre Network for Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Barcelona, Spain

²Departament de Medicina, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

³Resilience Research Group, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Centro de Investigación Biomédica en Red Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario/INCLIVA, Valencia, Spain

⁴Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Clinic Institute of Nephrology and Urology (ICNU), Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁶Unitat de Risc Vascular Medicina Interna, Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL, CIBER Fisiopatologia Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Barcelona, Spain

Physical exercise performed regularly is known to improve health and to reduce the risk of age-related diseases. Furthermore, there is some evidence of cognitive improvement in physically active middle-aged and older adults. We hypothesized that long-term physically active middle-aged men may have developed brain resilience that can be detected with the analysis of peripheral blood markers. We aimed to analyze the activation of pathways potentially modulated by physical activity in a cohort of healthy amateur rugby players ($n = 24$) and control subjects with low physical activity ($n = 25$) aged 45–65 years. We had previously reported neuropsychological improvement in immediate memory responses in the player group compared to the controls. Here, we tested the expression of selected genes of longevity, inflammation, redox homeostasis, and trophic signaling in whole blood mRNA. Analyses were also performed on blood samples of young (aged 15–25 years) control subjects with low physical activity ($n = 21$). Physical activity and other lifestyle factors were thoroughly recorded with standardized questionnaires. Interestingly, middle-aged control subjects showed lower levels of expression of SIRT1, SIRT3, CAT, and SOD1 than the young controls, although rugby players maintained the expression levels of these genes at a young-like level. Middle-aged players showed lower levels of IL1B than the non-physically active groups. However, there was a tendency towards a decrease in trophic and transduction factors in middle-aged groups as compared to the young controls. A statistical study of Spearman's correlations supported a positive effect of sporting activity on memory and executive functions, and on peripheral gene expression of SIRT1, SIRT3 and downstream genes, in the middle-aged rugby players. Our results indicate that the SIRT1-SIRT3 axis, and associated neuroprotective signaling, may contribute to the anti-aging resilience of the brain mediated by physical exercise.



Review

Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease

Adrian De la Rosa ^{a,1}, Gloria Olaso-Gonzalez ^{a,1}, Coralie Arc-Chagnaud ^{a,2}, Fernando Millan ^a, Andrea Salvador-Pascual ^a, Consolacion García-Lucerga ^a, Cristina Blasco-Lafarga ^a, Esther Garcia-Dominguez ^a, Aitor Carretero ^a, Angela G. Correas ^a, Jose Viña ^{a,2,3,4,5,6}, Mari Carmen Gomez-Cabrera ^{a,2,3,4,5,6}

■ Show more

<https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.01.004>

Get rights and content

Under a Creative Commons license

open access

Highlights

- Low levels of physical activity are a risk factor associated with Alzheimer's disease.
- Older adults who exercise are more likely to maintain cognition.
- Exercise modulates amyloid β turnover, inflammation, synthesis, and release of neurotrophins, and cerebral blood flow.

Abstract

Dementia is one of the greatest global challenges for health and social care in the 21st century. Alzheimer's disease (AD), the most common type of dementia, is by no means an inevitable consequence of growing old. Several lifestyle factors may increase, or reduce, an individual's risk of developing AD.

Much has been written over the ages about the benefits of exercise and physical activity. Among the risk factors associated with AD is a low level of physical activity. The relationship between physical and mental health was established several years ago.

In this review, we discuss the role of exercise (aerobic and resistance) training as a therapeutic strategy for the treatment and prevention of AD. Older adults who exercise are more likely to maintain cognition. We address the main protective mechanism on brain function modulated by physical exercise by examining both human and animal studies. We will pay especial attention to the potential role of exercise in the modulation of amyloid β turnover, inflammation, synthesis and release of neurotrophins, and improvements in cerebral blood flow.

Promoting changes in lifestyle in presymptomatic and predementia disease stages may have the potential for delaying one-third of dementias worldwide. Multimodal interventions that include the adoption of an active lifestyle should be recommended for older populations.



Reversal of age-associated frailty by controlled physical exercise: The pre-clinical and clinical evidences

physical exercise: The pre-clinical and clinical evidences

C. Arc-Chagnaud ^{a, b, 1}, F. Millan ^{a, 1}, A. Salvador-Pascual ^a, A.G. Correas ^a, G. Olaso-Gonzalez ^a, A. De la Rosa ^a, A. Carretero ^a, M.C. Gomez-Cabrera ^{a, 2}, J. Viña ^{a, 2}

▣ Show more

<https://doi.org/10.1016/j.smhs.2019.08.007>

Get rights and content

Under a Creative Commons license

open access

Abstract

Demographic aging is one of the most serious challenges facing our society. Although we live longer, we do not live better because it is considered that approximately 16–20% of our life is spent in late-life morbidity. Older people have the greatest risk of developing frailty increasing the risk of presenting various adverse health events such as low quality of life, disability, hospitalization and even death. Frail men and women over 65 years old have lower muscle quality and muscle mass and higher percentage of body fat than non-frail people of the same age. In this review we will address the main physiological changes in the muscular and nervous system associated to aging. More specifically we will review the changes in muscle mass, quality, and strength relating them with the decrease in capillarization and muscular oxidative capacity as well as with the alterations in protein synthesis in the muscle with aging. The last section of the manuscript will be devoted to the animal models of frailty and the indexes developed to measure frailty in these models. We will finally address the importance of exercise training as an intervention to delay or even reverse frailty.

Antioxidants & Redox Signaling, Ahead of Print |

Modulating Oxidant Levels to Promote Healthy Aging

Jose Viña, Gloria Olaso-Gonzalez , Coralie Arc-Chagnaud, Adrián De la Rosa, and Mari Carmen Gomez-Cabrera

Published Online: 16 Mar 2020 | <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8036>

 [View Article](#)

 Tools  Share

Abstract

Significance: Free radicals although originally thought of as damaging molecules, inevitable side effects of the utilization of oxygen by cells, are now considered as signals that by modifying, among others, the thiol–disulfide balance regulate many cell processes from metabolism to cell cycle.

Recent Advances: This review discusses the importance of the modulation of the oxidant levels through physiological strategies such as physical exercise or genetic manipulations such as the overexpression of antioxidant enzymes, in the promotion of healthy aging.

Critical Issues: We have divided the review into five different sections. In the first two sections of the article “Oxidants are signals” and “Exercise training is an antioxidant,” we discuss the main sources of free radicals during muscle contraction and their role, as hormetic substances, in the regulation of two main muscle adaptations to exercise in skeletal muscle; that is, mitochondrial biogenesis and the endogenous antioxidant defense. In the third section of the review, we deal with “the energy collapse in aging.” The increased rate of reactive oxygen species (ROS) production and the low rate of mitochondria biosynthesis in the old cells are examined. Finally, in the fourth and fifth sections entitled “Overexpression of antioxidant enzymes in healthy aging” and “Exercise, longevity, and frailty,” we consider the importance of the potentiation of the cellular defenses in health span and in life span.

Future Directions: A correct manipulation of the ROS generation, directing these species to their physiological signaling role and preventing their deleterious effects, would allow the promotion of healthy aging.