

# El ejercicio físico voluntario como terapia para la enfermedad de Alzheimer: Estudio en ratones tripletransgénicos 3xTg-AD

Yoelvis García Mesa

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



# **EL EJERCICIO FÍSICO VOLUNTARIO COMO TERAPIA PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: ESTUDIO EN RATONES TRIPLETRANSGÉNICOS 3xTg-AD**

Tesis doctoral presentada por

**YOELVIS GARCÍA MESA**

Para optar al grado de

**Doctor por la Universidad de Barcelona**

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Coral Sanfeliu y la Dra. Rosa Cristòfol y con la colaboración de la Dra. Lydia Giménez, en el Departamento de Isquemia Cerebral y Neurodegeneración del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB, CSIC-IDIBAPS).

Barcelona, noviembre de 2010

PROGRAMA DE DOCOTORADO DE BIOMEDICINA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona,  
2010

**YOELVIS GARCÍA MESA**

**El interesado:**

Yoelvis García Mesa

**Las directoras:**

CORAL SANFELIU PUJOL

ROSA CRISTÒFOL MARÍNEZ

Departamento de Isquemia Cerebral y Neurodegeneración  
IIBB, CSIC-IDIBAPS

Este trabajo se ha realizado dentro del proyecto del Instituto de Salud Carlos III “Red temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad” (RETICEF) (RD06/0013/1004) y del proyecto “Counteracting Alzheimer’s disease progression: Effects of early-environmental treatments on the triple-transgenic 3xTgAD mice” (subproyecto 2) (062931), financiado por la Fundación La Marató de TV3.

*A Cirila Encarnación,*  
mi madre

## AGRADECIMIENTOS

---

El desarrollo de esta tesis doctoral ha sido llevado a cabo mediante la colaboración y el asesoramiento de muchas personas, investigadores y/o amigos. Es por esto que no haré un agradecimiento muy extensivo y particular, para evitar lastimar sensibilidades. No obstante no puedo pasar por alto:

- La confianza que depositaron en mi la Dra. Coral Sanfeliu y la Dra. Rosa Cristófol para llevar a cabo este proyecto de investigación. Sin su encarecida ayuda es probable que aún estaría trabajando y haciendo camino en el Opencor.
- La colaboración de la Dra. Lidia Giménez, que con mucho gusto me mostró y me ayudó a entender el camino de las técnicas conductuales.
- La ayuda y colaboración de todo el personal de los estabularios de la Facultad de Medicina y de la Facultad de Psicología de la Universidad de Barcelona, donde se obtuvieron 70 % de los resultados que se presentan en esta tesis.
- A todo el personal del IIBB, en especial a mi grupo de amigos/compañeros que de alguna manera u otra hicieron posible que mi estancia en el centro fuera más amena. Ningún Psicólogo es capaz de imaginar a ciencia cierta cuánto se liberó en nuestras “reuniones”. Ustedes hicieron que este tiempo en el instituto fuera muy placentero, los quiero. Noelia no olvidaré nuestros café y nuestras charlas diarias.
- A mi pareja y a mis amigos fuera del centro, que siempre han estado dispuestos a escuchar mis quejas y para celebrar mis triunfos. En especial a ti Francesc, que tan cerca has estado y tanto me has ayudado en estos tres años.
- A los compañeros del Dpto. de Fisiología de la Universidad de Valencia y los de la División de Neurociencias de la Universidad Pablo de Olavide en Sevilla, donde realicé dos estancias maravillosas. En especial a la Dra. M. Carmen Gómez y el Dr. Juan C. López.

- A RETICEF que financió mis dos estancias y parte del proyecto de tesis, ayudando también en mi formación y en la participación en congresos.
- Quiero hacer un agradecimiento especial a la Fundación La Marató de TV3. Gracias a su gran obra se ha podido financiar, casi en su totalidad, este bonito proyecto de investigación y mi, no menos importante, salario. Como ellos dicen en su página de internet, esta fundación se ha creado con la misión de fomentar y promover la investigación biomédica de excelencia, así como la sensibilización social sobre las enfermedades. Una vez más gracias.
- Al proyecto “Viure i conviure” de la obra social de la Caixa de Catalunya. Sin su ayuda no habría podido pagar mis estudios. Una mención especial a Ana García por la genial convivencia, ayuda y comprensión durante este tiempo. Convivir con usted Ana fue como participar de otra escuela. Gracias.
- Por último el agradecimiento más especial a mi madre, a quien además he dedicado esta tesis. No has estado directamente conmigo durante estos difíciles años pero tú me has enseñado a andar, a enfrentarme a la vida, a levantarme después de la caída, a luchar, a madrugar, me has mostrado el sentido de la responsabilidad, a no tener miedo a trabajar, a no escudarme en la enfermedad y tanto más... Ya ves, no he sido médico pero he logrado ser doctor.

## ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	2
1.1. Definición.....	2
1.2. Antecedentes históricos.....	2
1.3. Neurofisiología de la EA.....	3
1.3.1. Placas seniles.....	3
1.3.2. Ovillos neurofibrilares.....	5
1.3.3. Disfunción sináptica.....	7
1.3.4. Estrés oxidativo.....	8
1.3.4.1. Radicales libres.....	8
1.3.4.2. Oxidación de los lípidos.....	8
1.3.4.3. Defensas antioxidantes.....	9
1.3.5. Disfunción mitocondrial.....	10
1.4. Epidemiología de la EA.....	11
1.4.1. Enfermedad familiar.....	11
1.4.1.1. Mutaciones en APP.....	12
1.4.1.2. Mutaciones de PS-1 y PS-2.....	12
1.4.2. Enfermedad esporádica.....	14
1.4.3. Factores de riesgo.....	14
1.4.3.1. Apolipoproteína E (apoE).....	15
1.5. Diagnóstico.....	17
1.6. Tratamientos.....	18
1.6.1. Ejercicio físico.....	19
1.6.2. Melatonina.....	23
2. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA EA.....	26
2.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	27
2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> .....	27
2.3. La rata como modelo para la EA.....	28
2.4. El conejo como modelo para la EA.....	29
2.5. Modelos caninos.....	29
2.6. Modelos primates.....	30
2.7. Modelos de ratones transgénicos.....	31

2.7.1. Transgénicos con mutación <i>APP</i> , <i>PS-1</i> y/o <i>PS-2</i> .....	31
2.7.2. Transgénicos con taupatías.....	32
2.7.3. Modelo de 5 mutaciones.....	32
2.7.4. Modelo triple-transgénico .....	33
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
1. Objetivo General.....	38
2. Objetivos Específicos.....	38
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
1. ANIMALES.....	40
2. GENOTIPAGE POR PCR.....	40
2.1. Extracción de DNA.....	41
2.2. Técnica de PCR.....	41
2.3. Electroforesis y revelado.....	42
3. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....	42
3.1. Experimento 1.....	42
3.2. Experimento 2.....	42
3.3. Experimento 3.....	42
3.4. Experimento 4.....	43
3.5. Experimento 5.....	43
3.6. Experimento 6.....	43
4. TRATAMIENTOS.....	44
4.1. Ejercicio físico voluntario en rueda de actividad.....	44
4.2. Melatonina.....	44
4.3. Ovariectomía.....	44
4.3.1. Anestesia.....	44
4.3.2. Cirugía.....	44
5. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO.....	45
5.1. Reflejos visuales.....	45
5.2. Coordinación motora y equilibrio.....	45
5.3. Neofobia.....	46
5.4. Campo abierto.....	46



5.5. Caja oscura/iluminada.....	46
5.6. Tabla de agujeros.....	47
5.7. Aprendizaje espacial en laberinto acuático de Morris (MWM).....	47
5.7.1. Fase de aprendizaje de guía.....	47
5.7.2. Fase de adquisición o aprendizaje espacial .....	48
5.7.3. Prueba de retención del aprendizaje.....	48
6. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE ESTRÉS OXIDATIVO CEREBRAL ....	48
6.1. Homogenización.....	49
6.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	50
6.3. Determinación de la actividad de la GPx.....	50
6.4. Determinación de la actividad de la GR.....	51
6.5. Determinación de la actividad de las SOD.....	51
6.5.1. Determinación de la actividad de la SOD-total.....	52
6.5.2. Determinación de la actividad de la SOD-Mn.....	52
6.6. Determinación de los niveles de lípidos oxidados.....	52
6.6.1. Extracción de los LPO de la muestra.....	53
6.6.2. Medición de los LPO.....	53
6.6.3. Cálculos de los resultados.....	54
6.7. Determinación del Glutati6n total.....	54
6.8. Determinación del GSSG.....	55
6.9. Determinación del GSH.....	55
7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	56
7.1. Extracción de proteínas totales.....	56
7.2. Western blot.....	56
7.2.1. Preparación de las muestras.....	57
7.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	57
7.2.3. Transferencia.....	58
7.2.4. Detección Inmunológica.....	58
7.2.5. Detección y densitometría.....	59
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	60

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 1 VALOR PREVENTIVO Y TERAPÉUTICO DEL EJERCICIO FÍSICO VOLUNTARIO EN ETAPAS TEMPRANA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN EL RATÓN 3xTg-AD.....</b>	<b>62</b>
1. RESULTADOS.....	62
2. DISCUSIÓN.....	87
<b>CAPÍTULO 2 MELATONINA, EJERCICIO FÍSICO VOLUNTARIO O LA COMBINACIÓN DE AMBOS TRATAMIENTOS COMO TERAPIA PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....</b>	<b>94</b>
1. RESULTADOS.....	94
2. DISCUSIÓN.....	105
<b>CAPÍTULO 3 EFECTO TERAPÉUTICO DEL EJERCICIO FÍSICO VOLUNTARIO EN RATONES HEMBRAS 3xTg-AD DE AVANZADA EDAD.....</b>	<b>113</b>
1. RESULTADOS.....	113
2. DISCUSIÓN.....	124
<b>CAPÍTULO 4 EFECTO TERAPÉUTICO DEL EJERCICIO FÍSICO VOLUNTARIO EN RATONES HEMBRAS NTg Y 3xTg-AD OVARIECTOMIZADAS.....</b>	<b>131</b>
1. RESULTADOS.....	131
2. DISCUSIÓN.....	142
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>149</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>162</b>

## **INTRODUCCIÓN**



## 1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

### 1.1. Definición

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa, progresiva y compleja que fue descrita por primera vez hace más de 100 años. Está considerada dentro del grupo de las demencias, siendo de estas la más frecuente (López-Pousa et al., 1999). Clínicamente la enfermedad se presenta con la pérdida progresiva de la memoria de corto alcance y a medida que avanza se produce la pérdida de la memoria de larga duración y el pensamiento abstracto. En la etapa más tardía de la enfermedad los pacientes se vuelven confusos y pierden la orientación del lugar y del tiempo. Estas manifestaciones clínicas son el resultado de una serie de cambios moleculares que se producen en el cerebro del paciente. Estos cambios moleculares se producen con varias alteraciones histopatológicas que incluyen dos lesiones principales, las placas seniles extraneuronales y los ovillos neurofibrilares (ONF) (Selkoe, 2001). Se produce una degeneración de las neuronas involucradas en los procesos de la memoria, que incluye la muerte selectiva de algunas células nerviosas, la pérdida de sinapsis y la disminución en los niveles de determinados neurotransmisores (DeKosky and Scheff, 1990; Scheff et al., 1991; Masliah et al., 2001).

En el estudio patológico de los cerebros de los pacientes de la EA podemos observar un tamaño medio más pequeño que el de las personas sanas, atrofia cortical simétrica con afectación de todos los lóbulos, atrofia del lóbulo temporal medio y afectación de las áreas de asociación con respecto a las áreas motoras y sensoriales (Hof et al., 1990). Las estructuras subcorticales se hallan normalmente conservadas, excepto la amígdala que se encuentra gravemente afectada.

### 1.2. Antecedentes históricos

En 1901, en el hospital de enfermedades mentales de Frankfurt, ingresa una paciente de 51 años de edad, *Auguste Deter*, con un cuadro clínico de 5 años de evolución. Dicha paciente, después de haber comenzado con delirio, sufrió una pérdida de memoria rápida y progresiva, acompañada de alucinaciones, trastornos de conducta, desorientación, afectaciones del lenguaje; falleciendo el 8 de abril de 1906. La historia guarda el registro de esta señora como el primer caso descrito de la EA.

El doctor *Alzheimer* realizó el estudio histológico del cerebro de esta señora describiendo las placas seniles, los ONF y cambios cerebrales arterioescleróticos. *Emil*

*Kraepelin*, psiquiatra compañero de *Alois Alzheimer*, fue quien identificó los síntomas de la enfermedad como una entidad nosológica definida y *Alois Alzheimer* fue quien describió las características neuropatológicas por primera vez. El descubrimiento de la patología fue obra de ambos psiquiatras, que trabajaban en el mismo laboratorio, pero *Kraepelin* decidió nombrar la enfermedad “*Alzheimer*” en honor a su compañero y mentor, debido a la gran importancia que daba a encontrar la base neuropatológica de los desórdenes psiquiátricos.

### **1.3. Neurofisiología de la EA**

Como se ha comentado anteriormente la EA incluye dos lesiones principales, las placas seniles extraneuronales y los ONF. No obstante, a la EA también se han asociado la pérdida neuronal y de la función sináptica, con una disminución considerable de las sinapsis, anomalías mitocondriales y elevados niveles de marcadores de estrés oxidativo (Selkoe, 2001; Reddy and Beal, 2005; 2008; Reddy and McWeeney, 2006; LaFerla et al., 2007).

#### **1.3.1. Placas seniles**

Las placas seniles son masas argirófilas de material granular o filamentoso. Presentan en la periferia prolongaciones neuronales en degeneración y en la parte central fibrillas de la proteína amiloide de conformación  $\beta$  ( $A\beta$ ), principalmente (Glennner and Wong, 1984). Las placas seniles, así como los ONF, se pueden encontrar en cerebros de personas sanas de avanzada edad, cognitivamente normales, pero en la EA la distribución y densidad de estas alteraciones refleja una interrupción más importante de los circuitos corticales claves (Hof y Morrison, 1996).

El péptido  $A\beta$  se forma a partir de la proteína precursora de amiloide (APP) y es pequeño, de unos 4 kDa (Beyreuther and Masters, 1991). La APP está formada por un péptido señal, un dominio extracelular grande, un dominio transmembrana, que traspasa la membrana una única vez, y un dominio citoplasmático (Tanzi et al, 1988). El dominio extracelular es complejo, contiene una región globular rica en cisteínas y sitios de unión a heparina, cobre, cinc. Presenta un dominio ácido, rico en glutaminas, aspartatos y treoninas y los dominios glicosilados que incluyen una región promotora de crecimiento (Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1988; König et al., 1992).

La APP se puede encontrar en diferentes tejidos como una familia de moléculas de APP de diferentes tamaños. Como molécula es una glycoproteína que puede ser procesada

proteolíticamente por dos vías competitivas, la no amiloidogénica y la amiloidogénica (se forma A $\beta$ ) (Kang et al., 1987; Ponte et al., 1988).

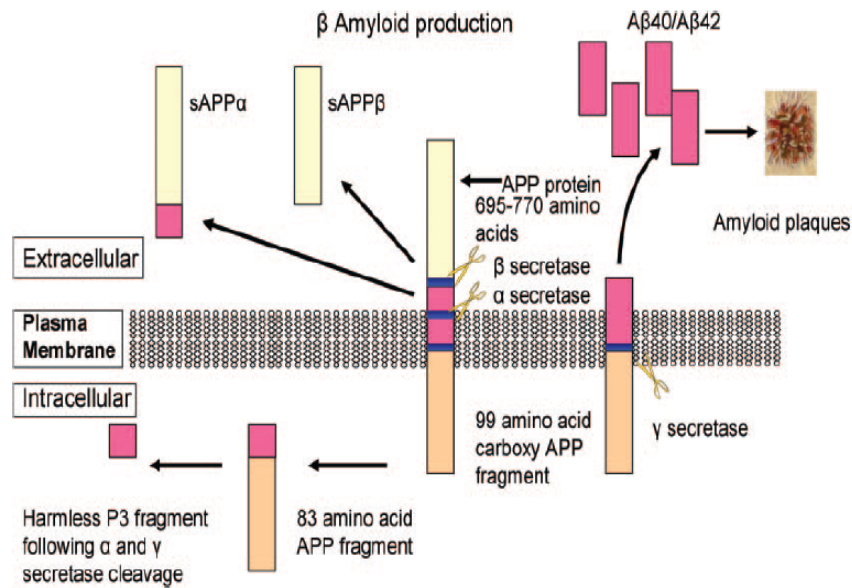


Figura 1. Mecanismo de procesamiento de la APP (Thomas and Fenech, 2007).

Este procesamiento de la APP (Figura 1) se realiza mediante la intervención de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas. En la vía no amiloidogénica la  $\alpha$ -secretasa corta dentro del dominio A $\beta$  de la APP y se produce el ectodominio  $\alpha$ -APP soluble y el fragmento C83 anclado a la membrana. Por esta vía se excluye la formación de A $\beta$  generando fragmentos no amiloidogénicos y una forma de APP que es secretada (Kang et al., 1987; Verdile et al., 2007). En la vía amiloidogénica la  $\beta$ -secretasa corta cerca de la región amino terminal del dominio A $\beta$  liberando otras formas solubles, la  $\beta$ -APPs y la región carboxilo terminal (C99) conteniendo el dominio A $\beta$ . El paso final de esta vía amiloidogénica es el corte del fragmento intramembranoso C99 por la  $\gamma$ -secretasa liberando péptidos A $\beta$  de diferentes tamaños lo cual puede afectar la solubilidad de A $\beta$ . Las formas más largas, de 42 y 43 aminoácidos (A $\beta$ -42 y A $\beta$ -43), se agregan dando lugar a la formación de las placas seniles (Kang et al., 1987; Verdile et al., 2007). Las formas más cortas, de 39 y 40 aminoácidos (A $\beta$ 39 y A $\beta$ 40), se pueden acumular alrededor de los vasos sanguíneos (Prelli et al., 1988). Esta A $\beta$  además de encontrarse formando los depósitos se puede hallar en forma soluble en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo de los enfermos y de individuos normales.

Hay muchos factores que pueden influir en el procesamiento de la APP y generar A $\beta$ , tales como la dieta, el estado hormonal y las mutaciones genéticas (ver refs. Gandy and

Petanceska, 2001; Verdile et al., 2004). En la EA que se produce tempranamente, generalmente hereditaria, las mutaciones en *APP*, *PS-1* y/o *PS-2* activan la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas y esta activación da lugar a la formación de  $A\beta$  (Mattson, 2004; Reddy and Beal, 2005). En la que se produce tardíamente, generalmente esporádica, ha sido propuesto que el estrés oxidativo puede causar la activación de la  $\beta$ -secretasa y facilitar la secreción de  $A\beta$  (Reddy, 2006). Mediante el estudio de ratones transgénicos se ha podido observar que la producción y acumulación de  $A\beta$  se incrementan de una manera edad-dependiente (Oddo et al., 2003b; Manczak et al., 2006)

En las últimas décadas son muchas las investigaciones que se han realizado para comprender la toxicidad de  $A\beta$  y la formación de las placas seniles. Se ha podido comprobar, en pacientes, que la  $A\beta$  intracelular precede los depósitos extracelulares y que los residuos  $A\beta$ -42 participan en la fibrillogénesis y en la formación de las placas (Gouras et al., 2000).

### **1.3.2. Ovillos neurofibrilares**

Los ONF están formados principalmente por haces de filamentos pareados de disposición helicoidal de la proteína tau (Kosik et al., 1986). La proteína tau está asociada a la formación de los microtúbulos que mantienen la estabilidad estructural de las neuronas y sirven de soporte en el transporte axonal (Figura 2). Esta proteína contiene un gran número de serinas y treoninas muchas de las cuales están fosforiladas en condiciones fisiológicas normales. Bajo condiciones patológicas tau comienza a hiperfosforilarse, lo cual quiere decir que tiene un grado más alto de sitios fisiológicos fosforilados así como sitios adicionales, sitio nuevos. La hiperfosforilación de tau hace que disminuya la unión de estas para la formación de los microtúbulos; aumentando la cantidad de tau soluble y las disgregación de los microtúbulos. Además tau está sujeta a la ubiquitinación, nitración, truncamiento, prolil-isomerización, glicosilación y modificación por glicación avanzada de productos finales. Estos procesamientos anormales, principalmente la hiperfosforilación, hacen que la proteína tau sea más resistente a la degradación proteolítica y se agregue para formar los ONF. Con la pérdida de la funcionalidad de tau, disminuye la neurotransmisión y el axón pierde su morfología, lo que conduce a que la neurona se degenera (Grundke-Iqbal et al., 1986; Lee et al., 1991; Götz et al., 2007).

Se ha observado que las células piramidales del córtex entorrinal son vulnerables a los ONF y a la degeneración resultante, sin embargo las células granuladas del giro dentado

son resistentes a la degeneración (Hof and Morrison, 1996). Por otra parte en el neocórtex también existen grupos de neuronas sensibles a la formación de ONF y a la degeneración y otros no lo son. Así las interneuronas inhibitoras no forman ONF y son resistentes a la degeneración (Hof et al., 1993; Sampson et al., 1997).

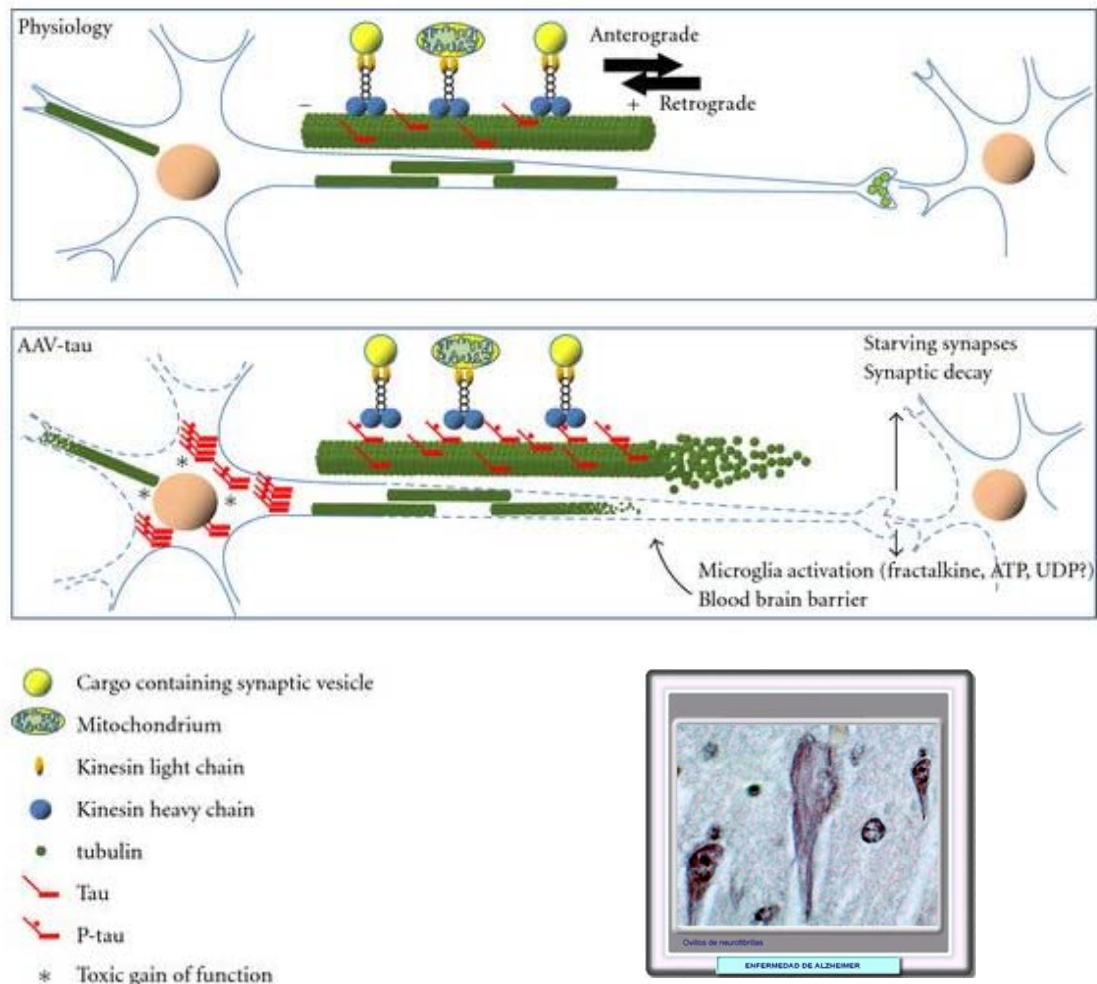


Figura 2. Modelo para la neurodegeneración mediada por Tau. En condiciones normales, la proteína Tau se regula bien a diferentes niveles: expresión de la isoforma, la fosforilación, unión de los microtúbulos, rotación; todo lo necesario para garantizar un transporte normal a lo largo de los microtúbulos en los axones y las dendritas. Debido a los proceso anormales que se pueden producir en Tau, ocurre una disminución en el transporte de las vesículas sinápticas, las mitocondrias o las proteínas, lo cual afecta los procesos dependientes de energía en las sinapsis, entre otros, que desencadenará en los procesos de degeneración neuronal y eventualmente puede llevar a la muerte neuronal. Estos procesos pueden contribuir a la activación de la microglía y astrogliá. Las células inflamatorias activadas secretan factores que no solo afectan a las neuronas, sino también otras células que constituyen la unidad de la barrera hemato-encefálica, provocando una mayor permeabilidad, lo que afecta negativamente a las neuronas.(Jaworski et al., 2010).



### 1.3.3 Disfunción sináptica

La afectación de las funciones sinápticas es un factor crucial que puede contribuir al declive cognitivo. La disminución en los niveles cognitivos se ha visto que se produce con el envejecimiento en humanos (Flicker et al., 1991), incluyendo cambios en el aprendizaje, la memoria y en la velocidad de los procesos mentales (Rubin et al., 1989; Flicker et al., 1991).

Durante el envejecimiento el número de las sinapsis y la transmisión de la señal decae considerablemente (Scheff et al., 1991). En varios estudios se ha correlacionado la pérdida sináptica con el decline cognitivo en la EA, mostrando un 25-30% de disminución de la sinapsis del córtex y un 15-35% por neurona cortical (DeKosky and Scheff, 1990; Terry et al., 1991; DeKosky et al., 1996). Otros estudios recientes revelan la disminución de los niveles de proteínas pre- (sinaptofisina) y post-sinápticas (sinaptopodina y PSD-95) en la EA comparados a sus controles (Bertoni-Freddari et al., 1996; Gyls et al., 2004; Almeida et al., 2005; Reddy and Beal, 2008). Estos estudios sugieren que la disminución sináptica y de las proteínas sinápticas están presentes en las zonas conocidas por ser afectadas por la EA. En la EA se ha visto, mediante estudios “*in vitro*” e “*in vivo*”, que la disfunción sináptica y la disminución de la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés long-term potentiation) pueden estar relacionadas a la presencia de A $\beta$  soluble (Cleary et al., 2005; Billings et al., 2005; Townsend et al., 2006).

Las neuronas piramidales que desarrollan largas proyecciones córtico-corticales son particularmente sensibles a la degeneración en la EA, lo que lleva a la interrupción de las conexiones entre distintas áreas del córtex de asociación. Sin embargo, las áreas motoras y sensoriales primarias sufren una pérdida neuronal mínima (Lewis et al., 1987; De Lacoste and White, 1993).

En cuanto a las sinapsis, tiene lugar una pérdida sináptica extensa en áreas de asociación, lo cual refleja la interrupción estructural de los circuitos. Por el contrario, las proyecciones subcorticales y la mayoría de las proyecciones talámicas quedan intactas, mientras la proyección colinérgica del núcleo basal de Meynert degenera como uno de los primeros eventos de la enfermedad (Coyle et al., 1983).

### **1.3.4 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se considera como la alteración que se produce en el equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras. Por tanto este desequilibrio puede producirse por un aumento de los agentes oxidantes, por una deficiencia de los antioxidantes o por ambos a la vez. Esta alteración generalmente conduce a dañar determinadas moléculas y puede reflejarse en las funciones fisiológicas.

Hay una extensiva evidencia y un amplio acuerdo de que el daño oxidativo producido en el cerebro por los radicales libres es un factor importante para un número considerable de enfermedades neurodegenerativas entre las que se encuentra la EA (Subbarao et al., 1990; Balazs and Leon 1994; Lovell et al., 1995; Sayre et al., 1997). Es por esto que en las últimas décadas se han realizado un considerable número de investigaciones sobre este tema, en los diferentes modelos para la EA (Li et al., 2004a; Schuessel et al., 2005; Esposito et al., 2006; Resende et al., 2008; Dumont et al., 2009a; García et al., 2009a,b; Giménez-Llort et al., 2010; Herring et al., 2010).

#### **1.3.4.1. Radicales libres**

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que tienen, en su orbital externo, uno o más electrones desapareados (Olanow, 1993). Debido a su gran reactividad tienen una vida media muy corta y suelen reaccionar rápidamente con otra molécula. Esta otra molécula estará dañada y se producirá un segundo radical; este proceso puede continuar indefinidamente (Esterbauer, 1985). Los radicales libres derivados del oxígeno e implicados en el estrés oxidativo son conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés reactive oxygen species), aunque también existen las especies reactivas de nitrógeno.

En la figura 3 se puede observar que en la reacción 2 se produce el  $H_2O_2$  que no tiene electrones desapareados. Este tipo de moléculas se conocen con el nombre de especies reactivas de oxígeno intermedias. La toxicidad de estas suele ser baja pero, como en el caso del  $H_2O_2$ , pueden atravesar la membrana y tienen una vida media-larga (Cadenas, 1995).

#### **1.3.4.2. Oxidación de los lípidos**

Los lípidos son biomoléculas muy susceptibles a ser atacadas por los radicales libres. Este proceso suele llamarse peroxidación lipídica y es una reacción en cadena, de

manera tal que el ataque de un solo radical libre puede producir un gran número de especies reactivas (Esterbauer, 1985). Los lípidos oxidados (LPO) pueden producir modificaciones en las membranas celulares, disminuyendo la permeabilidad, fluidez, mantenimiento de gradientes iónicos, etc. Debido al gran contenido de lípidos y de metabolitos de oxígeno, unido a las bajas defensas antioxidantes que podemos encontrar en el cerebro, este es considerado un órgano muy susceptible al estrés oxidativo (Reddy, 2006).



Figura 3. Radicales libres que se pueden formar desde el oxígeno (Reiter et al., 2001).

#### 1.3.4.3. Defensas antioxidantes

Las moléculas que son capaces de detoxificar directa o indirectamente de los radicales libres son conocidas como depuradoras o antioxidantes. Entre ellas podemos mencionar la vitamina E y C, el  $\beta$ -caroteno, y la melatonina, entre otras (Sies and Stahl, 1995; Reiter et al., 1997a). Por otra parte el organismo ha creado una serie de mecanismos para protegerse de los radicales libres. Dentro de estos mecanismos existen una variedad de enzimas que pueden eliminar los radicales libres o sus intermediarios de los espacios intra o extracelular, produciendo productos no tóxicos. Algunas de las enzimas más conocidas con esta capacidad son la superóxido dismutasa (SOD, incluyendo la SOD-CuZn y la SOD-Mn), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR) (Reiter et al., 1997b).

La SOD, como su nombre lo indica, es un enzima que dismuta el radical superóxido en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y constituye el primer medio natural de defensa (McCord, 1974; Fridovich 1978).

Por su parte la GPx es una enzima muy valiosa que tiene un doble papel antioxidante. Además de funcionar como una peroxidasa, eliminando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, también puede funcionar reduciendo el anión peroxinitrito a otro no tóxico. Esta enzima necesita el glutatión reducido (GSH) como dador de equivalentes reductores para catalizar la reacción. Por tanto, para poder tener una adecuada actividad antioxidante, se considera importante la presencia de GSH (Sies et al., 1997).

El glutatión es un tiol no proteico, muy abundante en las células de los mamíferos. Está constituido por tres aminoácidos: el ácido glutámico, la cisteína y la glicina. Su estructura le confiere determinadas características que hacen que tenga una amplia funcionalidad en la célula. Lo podemos encontrar reducido (GSH) o oxidado (GSSG). El GSSG está compuesto por 2 moléculas de GSH, unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas. Particularmente el GSH puede jugar numerosas e importantes funciones metabólicas, como la de proteger la célula contra los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos (Viña et al., 2000).

Cuando el GSH es utilizado por la GPx para eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o el anión peroxinitrito, se produce el GSSG y este último es rápidamente reducido mediante la GR. Esta enzima utilizará el NADPH como cofactor, que es facilitado por la deshidrogenasa glucosa-6-fosfato. El complejo enzimático GPx/GR se encuentran predominantemente en el citosol, aunque existe cierta actividad en la mitocondria (Fujii et al., 2000).

### **1.3.5. Disfunción mitocondrial**

Las afectaciones que sufren las mitocondrias en la EA están muy relacionadas con el incremento del estrés oxidativo. De hecho muchos de los radicales libres son producidos en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Gibson et al., 1998; Reddy and Beal, 2008). Algunos investigadores han publicado que las anomalías mitocondriales se producen tanto en neuronas como en astrositos y que ambos tipos celulares pueden sufrir daños por los radicales libres (Hirai et al., 2001; Manczak et al., 2004; Abramov et al., 2004). El daño oxidativo de las mitocondrias, se ha sugerido que ocurre tempranamente en la progresión de la EA, antes inclusive que la patología A $\beta$  (Reddy et al., 2004; Manczak et al., 2004; 2006; Devi et al., 2006). En un estudio realizado “*postmortem*” con humanos, sanos y enfermos de Alzheimer, observaron un incremento del daño oxidativo del DNA mitocondrial en las neuronas piramidales de los enfermos (Hirai et al., 2001).

Las mitocondrias que se encuentran en las terminaciones sinápticas son sintetizadas en el cuerpo neuronal y luego son transportadas a las dendritas y axones para realizar allí sus funciones, como la producción de energía (Wong-Riley, 1989). Si la mitocondria del soma está dañada y es transportada al terminal sináptico puede contribuir allí al mal funcionamiento de la sinapsis. Mungarro-Menchaca et al. (2002) encontraron que el A $\beta$  puede potenciar la disfunción mitocondrial. Por otra parte, Gillardon et al. (2007) observaron en ratones transgénicos para la EA, que los oligómeros de A $\beta$  producían disminución de la energía metabólica en la fracción mitocondrial sinaptosomal. Algunos investigadores han sugerido que la disfunción de la mitocondria y la deficiencia del metabolismo energético son eventos tempranos y que correlacionan con las afectaciones cognitivas en la EA (Eckert et al., 2003; 2008; Hauptmann et al., 2006; Keil et al., 2006).

#### 1.4. Epidemiología de la EA

En los años siguientes al descubrimiento de la EA comenzaron a ser descritos una cantidad considerable de casos con una media de edad de 50 años y una duración de la enfermedad de 7 años. Actualmente la EA constituye la mayor causa de demencia del mundo. Se sugiere que el cerca del 13% de los Americanos mayores de 65 años padecen esta enfermedad y que esta cifra puede superar el 50% en mayores de 85 años (Kidd, 2008). La enfermedad se puede originar por herencia genética familiar o por origen desconocido. En la Tabla 1 mostramos la frecuencia de aparición de la EA según las causas principales por las cuales se puede producir (Bird, 2008).

Tabla 1. Causas por las que se puede producir la EA (Bird, 2008).

Cause	% of Cases
Chromosomal (Down syndrome)	<1%
Familial	~25%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Late-onset familial (AD2)</li> <li>• Early-onset familial AD (AD1, AD3, AD4)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 15%-25%</li> <li>• &lt;2%</li> </ul>
Unknown (includes genetic/environment interactions)	~75%

##### 1.4.1. Enfermedad familiar

La forma hereditaria suele despuntar en edades más tempranas, 40-65 años. El 5% de los casos hereditarios corresponde a mutaciones en el gen *APP* y las de los genes *PS-1* y

*PS-2* corresponden al 80% de estos tipos de casos. Es familiar porque estas mutaciones se heredan de padres a hijos. En la siguiente tabla mostramos estos genes con su localización cromosómica y su incidencia en la EA familiar (Bird, 2008).

Tabla 2. Genes y mutaciones implicados en la EA hereditaria autosómica dominante de inicio temprano (Early-Onset Familial Alzheimer Disease: EOFAD) (Bird, 2008)

<b>Locus Name</b>	<b>Proportion of EOFAD</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Chromosomal Locus</b>	<b>Protein Name</b>	<b>Test Availability</b>
AD3	20%-70%	<i>PS-1</i>	14q24.3	Presenilin-1	Clinical
AD1	10%-15%	<i>APP</i>	21q21	Amyloid beta A4 protein	Clinical
AD4	Rare	<i>PS-2</i>	1q31-q42	Presenilin-2	Clinical

#### 1.4.1.1. Mutaciones en *APP*

El gen que codifica para la *APP* está localizado en la región 21 del brazo largo del cromosoma 21. Está constituido por 17 exones de los cuales dos, el 16 y 17, codifican la porción de *APP* que da lugar a la formación del fragmento  $A\beta$ . Hay varias mutaciones descritas que afectan la expresión de este gen, entre ellas las que afectan al codón 717. La primera descrita, dentro de la región transmembrana, cerca del extremo C-terminal del dominio  $A\beta$ , consiste en la sustitución de la valina por una isoleucina (*APP717Val*→*Ile*) (Goate et al., 1991). Otras dos mutaciones que también afectan este mismo codón son la sustitución de la valina por una fenilalanina (*APP717Val*→*Phe*) (Murrell et al., 1991) ó por una glicina (*APP717*→*Gly*) (Chartier-Harlin et al., 1991).

#### 1.4.1.2. Mutaciones de *PS-1* y *PS-2*

Las presinilinas (*PS*) son proteínas de transmembrana integrales con unos 8 dominios transmembranales, unidos por secuencias hidrofílicas cortas (Levis-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995, Sherrington et al., 1995). Aunque se dice que existe una homología del 67% entre la secuencia de aminoácidos de ambas, estas contienen dos regiones no homólogas que le confieren la especificidad, *PS-1* y *PS-2*. Estas dos regiones son el extremo N-terminal y un gran “loop” hidrofílico situado entre las regiones transmembrana 6 y 7 que son divergentes y sobresalen hacia el citoplasma (De Strooper et al., 1997).

El gen que codifica para la *PS-1* se encuentra localizado en la región 24 del brazo largo del cromosoma 14 (Sherrington et al., 1995). El que codifica para la *PS-2* está localizado en la región 31-42 del brazo largo del cromosoma 1 (Levis-Lahad et al.,

1995; Rogaev et al., 1995). Ambos genes están constituidos por 12 exones, de los que de 3 a 12 son codificantes (Levis-Lahad et al., 1996; Rogaev et al., 1997).

Las PS parecen estar involucradas en la regulación de la proteólisis intramembranosa y clivaje de la APP. Se ha sugerido que pudieran ser cofactores de la  $\gamma$ -secretasa, análogos a la proteína activadora del procesamiento de esterol (Hua et al., 1996). Ha sido sugerido que la actividad enzimática tipo  $\gamma$ -secretasa dependiente de la PS-1 es crítica para el procesamiento de la APP. En experimentos realizados con ratones carentes de PS-1 se ha demostrado que las presinilinas juegan un papel importante en la generación de A $\beta$  ya que se ha observado que las células de estos ratones carecían totalmente de A $\beta$  (De Strooper et al., 1998; Naruse et al., 1998).

Más de 70 mutaciones diferentes han podido ser identificadas en *PS1* (Cruts et al., 1998). La mayoría de estas mutaciones se concentran en las regiones transmembranas 2, 3 y 6. Ha sido sugerido que el polimorfismo de *PS1* puede hacer que su expresión clínica sea diferente según la mutación, como acompañarse de convulsiones o paraparesia espástica. Las mutaciones de este gen dan lugar a la EA precoz, caracterizándose cada mutación por una edad específica de debut de la enfermedad. Por ejemplo, los que presentan mutaciones en la región 2 de transmembrana suelen debutar sobre los 45 años (Campion et al., 1995; Boteva et al., 1996; Crook et al., 1997; Yasuda et al., 1999; Finckh et al., 2000).

Las más de 6 mutaciones descritas para *PS-2* como responsables de la EA hereditaria se dice que son poco frecuentes (Cruts et al., 1998). Una baja regulación de la expresión del gen *PS-2* es un evento precoz en la EA de inicio tardío. Dos de las mutaciones descritas están en la región 2 de transmembrana y suelen causar EA de debut tardío. Las demás mutaciones suelen dar lugar a la EA precoz (Levis-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995; Lao et al., 1998).

Estas dos proteínas, cuando están mutadas, parecen responsables de las formas más precoces de EA y se piensa que esto es debido a la exacerbación de la vía patológica de maduración de la APP. Controlar la concentración de PS podría tener repercusiones drásticas sobre la fisiología celular, como ha sido sugerido por el hecho de que los inhibidores de los proteasomas potencian drásticamente el fenotipo de las presenilinas normales y patogénicas relacionadas con el procesamiento de la APP. Los resultados de estas mutaciones generalmente conllevan, en cultivos celulares, a una mayor producción de A $\beta$ -42, con un aumento de la relación A $\beta$ -42/A $\beta$ -40 (Scheuner et al., 1996; Borchelt et al., 1997).

Las mutaciones de *PS-1* y *PS-2* se consideran mutaciones puntuales, que consisten en el cambio de un aminoácido por otro en la estructura primaria de las mismas. Estas mutaciones de las PS son conservadoras desde el punto de vista clínico, probablemente porque mutaciones más drásticas interfieren con las funciones fisiológicas vitales de las presinilinas haciendo que los individuos portadores no sean viables (Shen et al., 1997; Wong et al., 1997).

#### **1.4.2. Enfermedad esporádica**

La gran mayoría de casos de la EA son de origen desconocido y se piensa que varios riesgos de tipos ambientales, biológicos, psicosociales o genéticos pueden ayudar a que se desarrolle la enfermedad. Esta es la forma conocida como esporádica; es decir que los pacientes no tienen antecedentes genéticos que puedan ser totalmente responsables de su manifestación (St George-Hyslop, 2000; Poirier, 2000; Holmes, 2002). Solo una pequeña proporción (menos del 10 %) de los casos de la EA son causados por mutaciones no hereditarias y probablemente sea la combinación de estas mutaciones con la influencia de factores ambientales los que producen la EA.

#### **1.4.3. Factores de riesgo**

Como factores de riesgo nos referimos a los factores más presentes antes de padecer la enfermedad y que se han visto relacionados con una mayor frecuencia de aparición de la misma. Como se ha comentado, los factores de riesgos pueden ser biológicos (incluidos los genéticos), psicosociales, de personalidad, ambientales en general pero uno solo de estos, como los genéticos, no son suficientes para causar la enfermedad, sino que incrementan grandemente la probabilidad de padecerla con respecto a la población normal (Tilley et al., 1998; Poirier, 2000; Buxbaum et al., 2000; Bird, 2008).

Debido a que en diferentes estudios epidemiológicos se ha visto que existe un marcado aumento de la frecuencia de la enfermedad en relación a la edad (Evans et al., 1989; Rocca et al., 1990; Hofman et al., 1991), ha sido sugerida esta como el mayor factor de riesgo no genético para padecer la EA (Schonberger et al., 2001). Los estudios recientes ponen de manifiesto que la frecuencia de la enfermedad se duplica cada 5 años con el aumento de la edad. Entre los 70 y 74 años la frecuencia es de un 4.1% pero esta aumenta hasta el 32% en sujetos de 85 y 89 años (Zhang et al., 1990; Rocca et al., 1990; Ott et al., 1995).



En cuanto al sexo las investigaciones muestran una mayor frecuencia en mujeres que en hombres (Molsa et al., 1982; Jorm et al., 1987; Gussekloo et al., 1995) pero en general se acepta que hay un mayor porcentaje en las mujeres, muy probablemente por su mayor supervivencia. No obstante hay trabajos que lo relacionan con el descenso en el nivel de los estrógenos, cuando la mujer llega a la menopausia, lo que podría dañar la sustancia blanca cerebral (Martínez Lage et al., 2000). En la siguiente tabla mostramos diferentes factores de riesgo no genéticos para padecer la enfermedad, que se recogen en la literatura.

Tabla 3. Factores de riesgo considerados como que pueden influir en padecer la EA (Elaboración propia a partir de Siest et al., 1995; Bird, 2008; Lahiri and Maloney, 2010).

Biológicos	Psicosociales	Personalidad
<ul style="list-style-type: none"> <li>• apoE</li> <li>• Edad avanzada</li> <li>• Historial familiar de demencia</li> <li>• Síndrome de Down</li> <li>• Alteraciones de los cromosomas 14 y 21</li> <li>• Muchos lazos lunares</li> <li>• Trauma craneal</li> <li>• Edad alta de la madre</li> <li>• Edad baja del padre</li> <li>• Sexo femenino</li> <li>• Zonas geográficas: Europa, Africa y América</li> <li>• Raza: Afroamericanos</li> <li>• Tóxicos (tabaco, alcohol, aluminio, otros)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bajo nivel cultural</li> <li>• Comportamientos psicosociales inactivos</li> <li>• Pocas relaciones sociales</li> <li>• Inactividad física</li> <li>• Trabajos manuales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Depresivos</li> <li>• Sumisos</li> <li>• Introversos</li> <li>• Pesimistas</li> </ul>

Debido a que el gen de la apolipoproteína E4 (apoE) ha sido establecido como el mayor factor de riesgo genético para padecer la EA le dedicamos una sección en este capítulo. Se calcula que el riesgo de padecerla aumenta con la presencia de un alelo  $\epsilon 4$  y se decuplica si los dos alelos presentes son  $\epsilon 4$  (Corder et al., 1993; Meyer et al., 1998).

#### 1.4.3.1. Apolipoproteína E (apoE)

La apoE está constituida por una única cadena polipeptídica de 299 aminoácidos y está formada por dos dominios estructurales independientes que corresponden a dos funciones diferentes (Weisgraber, 1994). El sitio de interacción con el receptor se encuentra ubicado en el extremo N-terminal, donde también podemos encontrar una región rica en aminoácidos básicos (Weisgraber et al., 1986; Cardin et al., 1988). Los aminoácidos del extremo C-terminal son los responsables de la interacción de apoE con

los lípidos y de la asociación con las lipoproteínas de muy baja densidad (Sparrow et al., 1992).

Esta proteína presenta 3 isoformas diferentes llamadas E2, E3, E4; siendo E3 la isoforma más frecuente en la población general (Rall and Mahley, 1992). La apoE se puede sintetizar principalmente en el hígado y en el cerebro, aunque se ha visto que también se puede sintetizar en otros tejidos, incluyendo los macrófagos y monocitos (Basu et al., 1982). Participa en la distribución del colesterol entre las células de los tejidos donde se sintetiza y este colesterol se emplea en diferentes procesos de biosíntesis, como la síntesis de membranas o la producción de hormonas esteroideas (Mahley, 1988). No obstante, en humanos otras funciones también le han sido otorgadas, entre las que podemos citar la de inmunoregulación (Cardin et al., 1988), regeneración de los nervios (Handelmann et al., 1992) y la activación de enzimas lipolíticas como la lipasa hepática, la lipasa lipoproteica y la lecitín-colesterol acetiltransferasa (Thuren et al., 1991; 1992).

Las tres isoformas de apoE se diferencian por su afinidad por el receptor lipoproteínas de baja afinidad. E3 y E4 tienen la misma afinidad, mientras E2 presenta una actividad de interacción drásticamente disminuida al 1% en comparación a las otras dos isoformas. La presencia de E4 se ha asociado a niveles elevados de colesterol (Boerwinkle et al., 1987).

Las frecuencias alélicas de APOE $\epsilon$ 2, APOE $\epsilon$ 3 y APOE $\epsilon$ 4 se han determinado en la población general de muchas regiones del mundo, siendo la más frecuente APOE $\epsilon$ 3. En Europa la distribución de la frecuencias del alelo  $\epsilon$ 4 presenta un gradiente que suele disminuir de sur a norte y en la costa mediterránea española es del 13,0%. En las poblaciones asiáticas esta frecuencia es muy baja al contrario de las poblaciones africanas donde suele ser más altas (Siest et al., 1995).

El polimorfismo del locus apoE actúa como factor de riesgo heredable y afecta la susceptibilidad genética para la EA esporádica de comienzo tardío (Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). El alelo APOE $\epsilon$ 4 está asociado al comienzo temprano de la EA (Corder et al., 1993) y el alelo APOE $\epsilon$ 2 disminuye el riesgo de aparición de la enfermedad (Corder et al., 1994).

Como cada individuo puede heredar dos alelos, el riesgo y la edad de comienzo variará con los diferentes genotipos. Así los portadores de dos APOE $\epsilon$ 4 presentan el mayor riesgo, ya que se ha demostrado que el alelo APOE $\epsilon$ 4 aumenta el riesgo de manera dosis-dependiente (Corder et al., 1993; Meyer et al., 1998) y precipita el comienzo de la

enfermedad (Corder et al., 1993). El alelo APOE $\epsilon$ 4 se ha asociado al debut precoz tanto de la EA esporádica (Chartier-Harlin et al., 1994; Van Duijn et al., 1994) como de la hereditaria (Houlden et al., 1998). En la tabla 4 se pueden encontrar el riesgo de padecer la EA según estimación de la frecuencia alélicas y genotípicas de la apoE encontradas en un estudio realizado en adultos con historial familiar de EA, en ambos sexos (Vernarelli et al., 2010).

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de la apoE encontrada en adultos con historial familiar de EA (Tomado de Vernarelli et al., 2010).

APOE genotype	Sex	Ethnicity	Lifetime risk (%)
$\epsilon$ 2 $\epsilon$ 3	F	White	19
		African American	36
	M	White	13
		African American	33
$\epsilon$ 3 $\epsilon$ 3	F	White	29
		African American	49
	M	White	18
		African American	41
$\epsilon$ 2 $\epsilon$ 4	F	White	49
		African American	69
	M	White	25
		African American	48
$\epsilon$ 3 $\epsilon$ 4	F	White	52
		African American	73
	M	White	29
		African American	56
$\epsilon$ 4 $\epsilon$ 4	F	White	57
		African American	74
	M	White	56
		African American	77

### 1.5. Diagnóstico

En la EA la manifestación de los primeros síntomas comienzan mucho después de haber comenzado los cambios neuropatológicos (formación de las placas y de los NF) (Selkoe, 1997). No obstante, debido a lo complejo de la enfermedad y a que varias demencias comparten sintomatología, el diagnóstico confirmatorio de la EA sólo se puede realizar mediante el estudio histopatológico “*postmortem*”. Se necesita demostrar la abundancia de placas seniles, la presencia de los ONF y la degeneración neuronal; lo

cual solo se puede realizar con una biopsia cerebral o autopsia “*postmortem*” (Cacabelos, 1993).

A pesar de que no hay actualmente un test diagnóstico definitivo para la EA se puede establecer el diagnóstico basado en los criterios clínicos según la historia del paciente, el examen físico, las pruebas neuropsicológicas y diferentes estudios de laboratorio. De esta manera se va documentando la progresión del paciente y se van excluyendo otras causas. Es por tanto un problema el diagnóstico precoz de la enfermedad; no obstante el diagnóstico previo a la confirmación mediante autopsia es correcto en el 80-90% de las veces (Mayeux et al., 1998).

El uso del genotipo APOE también ha sido sugerido como una herramienta para el diagnóstico diferencial de la EA en pacientes que ya comienzan a tener los primeros síntomas de la enfermedad o con signos probables. Varios estudios han demostrado que el valor predictivo para los genotipos APOE $\epsilon$ 3/APOE $\epsilon$ 4 y APOE $\epsilon$ 4/APOE $\epsilon$ 4 se aproxima al 99,5% (Kakulas et al., 1996; Welsh-Bohmer et al., 1997). Estos genotipos se ha dicho que son responsables del 65% de los casos de la EA de origen tardío, aproximadamente (Saunders et al., 1993).

En un trabajo donde se estudiaron más de 2000 pacientes de 26 centros especializados en la EA, se evaluó el diagnóstico clínico y el “*postmortem*” junto al genotipo APOE y se concluyó que se puede lograr un diagnóstico específico si utiliza la combinación clínica al genotipo APOE (Mayeux et al., 1998). No obstante, el genotipo de APOE aislado, no conduce a un diagnóstico concluyente ya que la ausencia del alelo APOE $\epsilon$ 4 no significa que el individuo no pueda a desarrollar la enfermedad.

## 1.6. Tratamientos

Desde el descubrimiento de la EA y hasta nuestros días muchos han sido las investigaciones realizadas con el objetivo de comprender el proceso de esta enfermedad; así como en la búsqueda de un tratamiento efectivo para cortar el curso de la misma. Como tratamiento efectivo entendemos aquel que interrumpe la enfermedad en un paso obligatorio y temprano, antes de que comience la cascada de eventos progresivos que llevan a la neurodegeneración.

Si bien es cierto que mucho se ha avanzado en la comprensión bioquímica, molecular y clínica de la EA, mejorando en un alto grado la calidad de vida de los pacientes, no se ha podido encontrar un tratamiento que sea lo suficientemente efectivo para parar el

avance progresivo de esta patología. No obstante, podemos considerar cuatro clases potenciales de fármacos para el tratamiento de esta patología (Selkoe, 1997; Bird, 2008):

- 1- Los inhibidores de proteasas, que disminuyen parcialmente la actividad de las enzimas involucradas en la formación de A $\beta$  ( $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas).
- 2- Compuestos que se unen a A $\beta$  extracelular para actuar sobre su agregación y prevenir la formación de fibrillas amiloideas citotóxicas.
- 3- Drogas con acción anti-inflamatoria específicas para el cerebro que bloquean la activación microglial, la liberación de las citoquinas y la respuesta de la fase aguda que tiene lugar en las regiones cerebrales afectadas.
- 4- Compuestos como los antioxidantes, los bloqueadores de los canales de calcio neuronales o los antiapoptóticos que interfieren en los mecanismos de toxicidad mediada por A $\beta$ .

En los últimos años ha tomado fuerza el tratamiento de la enfermedad mediante técnicas de intervención conductual que pueden afectar beneficiosamente la salud cerebral y general del organismo, como el EF y el enriquecimiento ambiental. Este último consiste en incrementar la estimulación y proporcionar oportunidades más ricas y variadas de interacción con el entorno social y físico. Nosotros en este estudio hemos utilizado el tratamiento de EF y el tratamiento con melatonina, un potente antioxidante, que pasamos a considerar en las siguientes secciones de este capítulo.

### **1.6.1. Ejercicio físico**

Al comenzar esta sección debemos aclarar el concepto de EF pues suele confundirse con actividad física. La actividad física se define como cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos, que origine consumo de energía. Por su parte el EF es una subcategoría de la actividad física que, debido a que es planificada, estructurada y repetida, mantiene o mejora las funciones del organismo.

Algunos investigadores consideran el EF como una intervención conductual para mejorar la salud y la plasticidad cerebral (Cotman and Berchtold, 2002). Hay estudios recientes que sugieren que el estilo de vida puede afectar en el comienzo y en la progresión de la EA y que el EF puede ser una terapia suficiente para inhibir el curso normal de la misma (Laurin et al., 2001; Pope et al., 2003; Heyn et al., 2004). No obstante, los investigadores difieren del valor preventivo o terapéutico del ejercicio,

discutiendo sobre su empleo en etapas tempranas o avanzadas de la enfermedad. En la tabla 5 se muestran ciertas recomendaciones de cómo emplear el EF para obtener sus efectos beneficiosos.

Tabla 5. Recomendaciones de cómo emplear el ejercicio físico para obtener mejoras clínicas (Elsawy and Higgins, 2010).

<i>Clinical recommendation</i>	<i>Evidence rating</i>
To promote and maintain health, older adults should participate in moderate-intensity aerobic activity for at least 30 minutes on five days of the week, or vigorous-intensity aerobic activity for at least 20 minutes on three days of the week.	A
Moderate- and vigorous-intensity activity can be combined to meet the minimum recommendation for aerobic activity.	B
To promote and maintain health and physical independence, older adults should perform musclestrengthening activities on at least two days of the week.	B
Participation in more than the minimum recommended amount of aerobic and muscle-strengthening activities leads to additional health benefits and higher levels of fitness.	A
To reduce the risk of falls and related injuries, community-dwelling older adults with substantial risk of falling should perform exercises that maintain or improve balance.	A
To maintain the flexibility necessary for regular physical activity and daily life, older adults should perform activities that maintain or increase flexibility for at least 10 minutes on at least two days of the week.	B
Older adults should have a plan for obtaining sufficient physical activity that addresses each recommended type of activity.	C

*The recommendations are based on American College of Sports Medicine/American Heart Association guidelines. A = consistent, good-quality patient-oriented evidence; B = inconsistent or limited-quality patient-oriented evidence; C = consensus, disease-oriented evidence, usual practice, expert opinion, or case series. For information about the SORT evidence rating system, go to <http://www.aafp.org/afpsort.xml>.*

El EF está asociado con el incremento de la necesidad de ATP y el aumento del metabolismo anaeróbico o aeróbico, lo cual da como resultado el aumento de ROS. Todo parece indicar que este aumento del estrés oxidativo provoca una sobre-regulación de las enzimas que intervienen en la eliminación/prevenición de los daños oxidativos. Se sugiere que los efectos del ejercicio se parecen a las características de la hormesis y que sus beneficios pueden ser debido a su capacidad de aumentar los niveles de ROS. Se ha sugerido que la vulnerabilidad del cuerpo al estrés oxidativo y las enfermedades está considerablemente aumentada en un modo de vida sedentario comparado a uno físicamente activo (Mattson et al., 2004; Vaynman et al., 2006; Gómez-Pinilla, 2008; Radak et al., 2008a,b).

El efecto protector del EF para disminuir el estrés oxidativo, como los LPO o las proteínas oxidadas, con activación o no de enzimas antioxidantes, ha podido ser observado en diferentes modelos animales (Radak et al., 2001a; Ogonovszky et al., 2005; García et al., 2009a,b; Giménez-Llort et al., 2010). Además, se ha visto que el EF puede actuar activando o aumentando diversos factores neurotróficos que promueven la

neurogénesis y/o la protección neuronal. En la figura 4 se muestra una propuesta del mecanismo a través del cual el EF puede actuar en mejorar la salud y la plasticidad cerebral (Cotman and Berchtold, 2002). Según estos investigadores el efecto beneficioso del EF se produce por la activación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés Brain-derived neurotrophic factor). Sin embargo, se han mostrado evidencias de que quien desencadena la cascada de reacciones puede ser el factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1 del inglés insulin-like growth factor 1) (ver ref. Llorens-Martín et al., 2008).

La práctica regular de EF se ha asociado con una disminución de la mortalidad global ajustada por la edad y con un aumento de la esperanza de vida en más de dos años sobre la media poblacional. Además, ha sido publicado que puede aumentar la vida media de roedores en un 9% (Navarro et al., 2004). Por otra parte se ha sugerido que la práctica regular de EF disminuye la incidencia de una amplia gama de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como enfermedades del corazón, diabetes tipo II, artritis reumatoidea, ciertos tipos de cáncer, Parkinson y EA (Hoffman-Goetz, 1998; Gómez-Pinilla, 2008; Radak et al., 2008a,b).

Los diferentes estudios en modelos animales revelan las ventajas del EF sobre la salud y la función cerebral, muestran los efectos beneficiosos del inicio temprano de acceso a corto o largo plazo a una rueda de actividad, reduciendo el desarrollo de déficit cognoscitivos (Adlard et al., 2005; Nichol et al., 2007; Parachikova et al., 2008; Pietropaolo et al., 2008b; García et al., 2009a,b). Pero el EF también se ha visto que puede actuar sobre las afectaciones conductuales que afectan al enfermo de Alzheimer, como la ansiedad, la emotividad y los aspectos motores (Pietropaolo et al., 2008b; García et al., 2009a,b; Yuede et al., 2009; Giménez-Llort et al., 2010). Una propuesta de cómo el EF puede actuar sobre la ansiedad se muestra en la figura 5.

Ha sido mostrado que un mal funcionamiento del eje hipotalámico-pituitaria-adrenal (HPA) puede traducirse en afectaciones del ritmo circadiano y por consiguiente conductuales, emocionales, sociales, cognitivas y de las funciones fisiológicas (Bob et al., 2008; Kiessling et al., 2010). El EF ha sido sugerido que podría influir en el buen funcionamiento de este eje (Stranahan et al., 2009), por ejemplo aumentando la eficiencia de las glándulas adrenales (Campbell et al., 2010; Mazzardo-Martins et al., 2010).

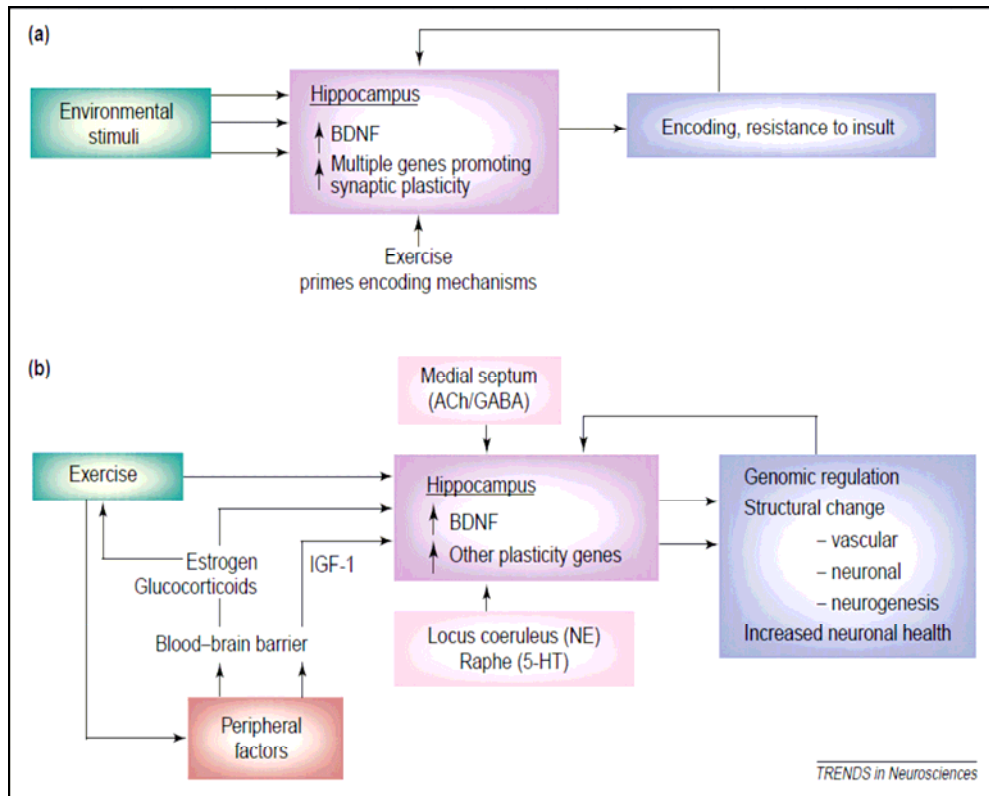


Figura 4. Mecanismo por el cual el EF voluntario puede actuar para mejorar la salud y plasticidad sináptica. (a) Podría actuar como una puerta que prepara el hipocampo para responder a la estimulación ambiental, al mismo tiempo garantizar la viabilidad de las neuronas para resistir el insulto. Estas respuestas, a su vez, se retroalimentan para fortalecer el cerebro de una forma uso-dependiente. (b) El EF puede mediar la mejora de la codificación de la información y de la resistencia neuronal, involucrando factores neurotróficos como el BDNF. El BDNF controla la expresión de múltiples factores en el hipocampo (Cotman and Berchtold, 2002).

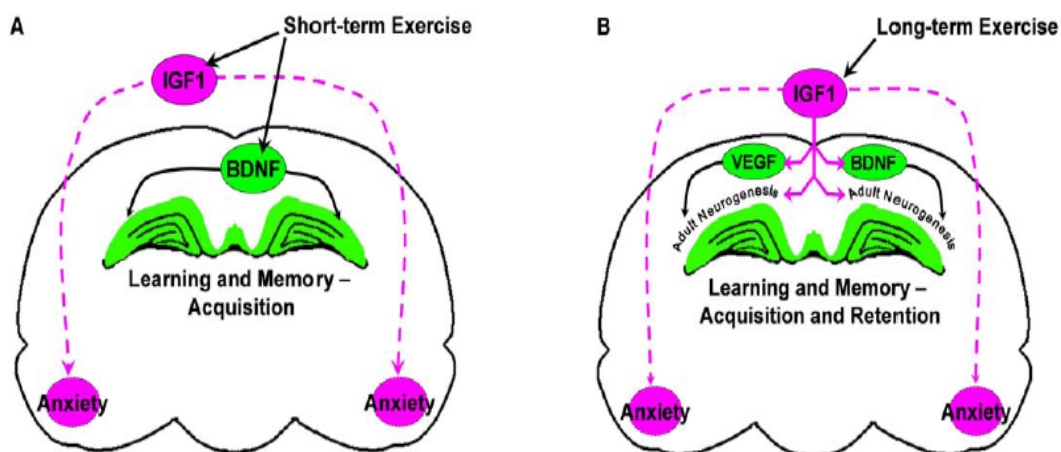


Figura 5. Propuesta de cómo el ejercicio, mediante la activación de factores de crecimiento, puede actuar en la mejora conductual y en la memoria. (A) Propuesta de mecanismo cuando se aplica un corto período de EF. (B) Propuesta de mecanismo cuando se aplica un largo período de EF (Llorens-Martín et al., 2008).



Por otra parte también ha sido descrita la capacidad del EF de actuar sobre proteínas pre- y post-sinápticas (Hu et al., 2009), aumentando la neurogénesis y la sinaptogénesis (van Praag et al., 1999; Eadie et al., 2005). Y es que, como se ha dicho con anterioridad, la pérdida de la función sináptica, lo cual incluye proteínas sinápticas, ha sido sugerido como una de las principales afectaciones neurológicas que se producen en la EA (DeKosky and Scheff, 1990; Scheff et al., 1990; Terry et al., 1991). Además, también ha sido descrito que el EF puede aumentar la capacidad de expresar LTP “*in vitro*” e “*in vivo*”, en animales adultos (van Praag et al., 1999; Farmer et al., 2004; Christie et al., 2005) y la LTP esta involucrada en los procesos relacionados con la memoria.

Entre las proteínas cerebrales más citadas que pueden ser reguladas por el EF, vinculadas a las mejoras de la salud cerebral, se incluyen el BDNF (ver refs. Vaynman et al., 2004a,b; 2007; Gomez-Pinilla et al., 2007; Macías et al., 2007; Goekint et al., 2008; Griesbach et al., 2009), la sinaptofisina la sinaptofisina (Vaynman et al., 2006; Heschem et al., 2009; Macías et al., 2009), la sinapsina (Gómez-Pinilla et al., 2001; Vaynman et al., 2004b; 2006), la subunidad NR2B del receptor NMDA (Farmer et al., 2004), el CREB (Vaynman et al., 2003; 2004a) y en menor medida el factor neurotrófico de crecimiento de la glía (GDNF del inglés glial-derived neurotrophic factor) (Kleim et al., 2003; Tajiri et al., 2010).

### **1.6.2. Melatonina**

La melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina), un metabolito del triptófano, es una indoleamina sintetizada rítmicamente durante las noches, en la glándula pineal (Axelrod, 1974; Reiter, 1991). Aunque ha sido mostrado que otros órganos y tejidos también producen melatonina, incluidos la retina, el intestino, los ovarios, testículos y médula ósea (Tan et al., 1999). Una vez formada en la glándula pineal, la melatonina no se almacena sino que es liberada a los capilares y al líquido cerebroespinal y puede llegar a todos los tejidos del organismo en un corto período de tiempo (Cardinali and Pévet, 1998; Arendt, 2000; Tricoire et al., 2002; Macchi and Bruce, 2004). La cantidad de melatonina que llega a los tejidos puede ser diferente. Por ejemplo, los niveles de melatonina liberados al líquido cerebroespinal fueron encontrados 5 a 10 veces mayores que los de la sangre, medidos simultáneamente (Tricoire et al., 2002). También se ha visto que el tejido cerebral puede tener mayores niveles de melatonina que otros tejidos corporales (Reiter and Tan, 2002).

Como ya se ha dicho esta indoleamina puede llegar a todos los tejidos, como al tracto gastrointestinal (TGI) de los mamíferos, que ha sido demostrado mediante diferentes métodos experimentales (Bubenik et al., 1977; 1992; Stebelová et al., 2010). Sin embargo, el papel fisiológico de esta indoleamina en el TGI aún no está bien comprendido y se ha dicho que puede influir en el tránsito del quimo a través del TGI (Bubenik and Dhanvantari, 1989), participar en el control de la motilidad autónoma del intestino (Merle et al., 2000) y que puede estar involucrada en la secreción de bicarbonatos en el duodeno (Sjöblom and Flemström, 2004).

La melatonina puede sufrir modificaciones en determinados órganos y tejidos y se ha podido documentar las propiedades antioxidantes de algunos de sus metabolitos como el 3-hidroximelatonina cíclico, el *N1*-acetil-*N2*-formil-5-metoxikynuramina (Allegra et al., 2003) y el *N1*-acetil-5-metoxikynuramina con un alto poder antioxidante (Ressmeyer et al., 2003). A esta hormona se le han atribuido un número de funciones fisiológicas, entre las que se incluyen la de regular los ritmos circadianos, mejorar la respuesta inmunitaria y la de ser un potente antioxidante, capaz de inducir las enzimas antioxidantes (Tan et al., 1993; Leon et al., 2004; Zhou et al., 2008). Los niveles de melatonina de la sangre han sido correlacionados positivamente con el estado antioxidante total de esta (Benot et al., 1998; 1999). Muy probablemente la capacidad de inducir las enzimas, así como otros efectos genómicos de la melatonina, estén relacionados con la presencia de sitios de unión en la membrana nuclear, mostrados por Acuña-Castroviejo et al. (1994), que le permitirían cierta actividad en el genoma.

La melatonina posee dos propiedades principales, su solubilidad (en agua y en lípidos) que le permite una fácil distribución en las células, y su habilidad de atravesar la barrera hematoencefálica para entrar en las neuronas y en la glía (Reiter, 1995; 1998). Estas propiedades le permiten interaccionar con receptores específicos de membrana (Dubocovich et al., 2000), con receptores nucleares (Wiesenberg et al., 1998) y con proteínas intracelulares tales como calmodulina (Antón-Tay et al., 1998), quinona reductasa 2 (Mailliet et al., 2004) o con proteínas asociadas a tubulina (Cardinali et al., 1997). Entre estas propiedades recientemente se han sumado que la melatonina juega un papel neuroprotector muy importante contra los péptidos de A $\beta$  (Pappolla et al., 1998; Chyan et al., 1999; Olivieri et al., 2001) y en evitar la hiperfosforilación de tau, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”, por parte de proteínas kinasas y fosfatas (Liu and Wang 2002; Li et al., 2004b; 2005; Wang et al., 2004a,b; Deng et al., 2005; Wang et al., 2005).

Existen 3 subtipos diferentes de receptores de membranas para la melatonina, los de alta afinidad MT1 y MT2 y el receptor putativo MT3, cada uno con un perfil farmacológico y distribución diferente (Reppert et al., 1995; Reppert, 1997; Dubocovich et al., 2000). En el sistema nervioso central (SNC) la actividad de la melatonina esta mediada por dos receptores que son insensitivos durante el día pero sensibles al atardecer y al oscurecer (MT2; causa los cambio de fase) y durante las fases tempranas del período nocturno (MT1; disminuye el rango de descarga neuronal) (Dubocovich et al., 2003). El aumento de la secreción de melatonina durante la noche está asociada con el incremento en la predisposición al sueño vía interacción con el receptor MT1 del SNC (Lavie, 2001).

Numerosos estudios han mostrado que la producción de melatonina por la glándula pineal disminuye durante los procesos de envejecimiento (Reiter, 1992) y que los pacientes con demencias tienen una disminución más profunda de esta hormona (Mishima et al., 1994; Liu et al., 1999). Esta pérdida, detectada en fluido cerebroespinal, ha sido asociada con la progresión de la neuropatología de la EA (Zhou et al., 2003). Además, en los pacientes con la EA ha sido observada una disminución de la expresión de los receptores MT2 del hipocampo (Savaskan et al., 2005). La EA es una patología neurodegenerativa asociada a la edad con graves trastornos del ritmo sueño/vigilia (McCurry et al., 2000) y este trastorno ha sido asociado a una irregularidad en la secreción de melatonina (Mishima et al., 1999).

Es por esto que clínicamente la melatonina ha sido utilizada para inducir el sueño, considerándose bien tolerada y segura, con dosis diarias entre los 0.1 a 1000 mg (Holliman and Chyka, 1997). En los pacientes con la EA, particularmente, la suplementación con melatonina ha sido sugerida para mejorar la ritmicidad circadiana, disminuyendo la conducta agitada, la confusión y para producir mejoras en la memoria (Brusco et al., 1998; 2000; Cohen-Mansfield et al., 2000; Cardinali et al., 2002a,b). También ha sido empleada debido a su capacidad de reducir la formación de A $\beta$  así como su agregación y neurotoxicidad (Reiter et al., 2001). Por otra parte se ha sugerido su papel en varios procesos conductuales como la percepción del dolor, la ansiedad y la depresión (Lakin et al., 1981; Mantovani et al., 2003; Kurtuncu et al., 2004), quizás a través de su interacción con la transmisión GABAérgica (Golombek et al., 1996).

## **2. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA EA**

Un factor limitante para el avance rápido de las investigaciones en esta patología ha sido el pequeño número de modelos animales adecuados para la investigación. La utilización de los modelos animales ha ido en incremento para entender la etiología y la patofisiología de las enfermedades neurodegenerativas y tiene un componente esencial en el desarrollo de intervenciones terapéuticas para estas enfermedades.

Un número de modelos han sido desarrollados para simular algunas semejanzas específicas a la EA tales como las relacionadas con A $\beta$  (Price et al., 2000; Janus et al., 2001a,b), con los ONF (Arendt et al., 1994, 1995), relacionadas a las funciones de las PS (Scheuner et al., 1996; Chui et al., 1999) y para estudiar la influencia del estrés oxidativo en el desarrollo y progreso de esta enfermedad (Li et al., 2004a; Schuessel et al., 2005). Desafortunadamente ninguno de estos modelos puede simular completamente la pérdida cognitiva y de la memoria o las anomalías bioquímicas e histopatológicas observadas en los pacientes de EA (Van Groen and Kadish, 2005; Tayebati, 2006). No obstante el desarrollo de un modelo ideal de la EA es vital para poder comprender totalmente la patogénesis de la enfermedad y explorar estrategias de prevención y tratamientos para esta devastadora patología neurodegenerativa (Albensi, 2001).

Los modelos animales deben ser capaces de desarrollar los síntomas, las lesiones o las causas de la enfermedad. Es así que podemos encontrar modelos que nos ayudan a entender los síntomas pero no nos dan información para comprender como ocurren las lesiones patológicas. Otros nos dan información de las lesiones y de los síntomas que se producen pero no de las causas que las producen. En ocasiones el desarrollo satisfactorio de un tipo de lesión patológica es insuficiente para disparar el desarrollo de la otra lesión. Consecuentemente, las manifestaciones concomitantes de las placas y de los ONF requieren la introducción de múltiples transgenes en un mismo ratón, el cual generalmente tiene que cruzarse para obtener varias líneas transgénicas independientes. Otra alternativa para obtener estas manifestaciones es mediante microinyección en el cerebro de un ratón simple transgénico de la otra proteína patológica (Götz et al., 2001; Lewis et al., 2001).

Cada investigador tiene en sus manos y es su decisión que modelo puede necesitar para realizar sus investigaciones. En este trabajo hemos utilizado el modelo de ratón triple transgénico (3xTgAD) debido a que consideramos que hoy por hoy es el mejor modelo

disponible y que simula más adecuadamente la enfermedad. En las siguientes secciones comentamos algunos de los modelos encontrados en la literatura.

### **2.1. *Caenorhabditis elegans***

El *Caenorhabditis elegans* es un gusano nemátodo, mide aproximadamente 1 mm de longitud, y vive en ambientes templados. Ha sido un importante modelo de estudio para la biología, muy especialmente para la genética del desarrollo, a partir de los años 70. Este gusano se ha sido utilizado para modelar aspectos de diferentes enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Lakso et al., 2003; Ved et al., 2005; Kuwahara et al., 2006), la enfermedad de Huntington (Faber et al., 2002), Esclerosis Lateral Amiotrófica (Oeda et al., 2001) y la EA (Link, 1995, Link et al, 2001, 2003). El descubrimiento de genes y proteínas específicas asociados a la enfermedad y el desarrollo de técnicas adecuadas para la creación de animales transgénicos ha hecho posible la creación de una gran variedad de este tipo de modelo. *C. elegans* se ha utilizado para incluir el gen que codifica para A $\beta$  y estudiar la cascada que se produce tras la formación de las placas (Link et al, 2001), observándose un incremento en los niveles de proteínas carbonílicas que son biomarcadores del estrés oxidativo (Yatin et al., 1999).

Una de las principales ventajas de este modelo radica en su corto ciclo de vida que hace posible que se puedan construir los transgénicos y realizar los experimentos rápidamente. Como modelo de esta enfermedad puede ser un buen soporte para estudiar la toxicidad de A $\beta$ , la inducción de estrés oxidativo (Moreira et al., 2005) y la disrupción de la membrana (Demuro et al., 2005). Evidentemente este modelo no se puede utilizar para estudiar diferentes procesos de la enfermedad como puede ser la activación glial o la pérdida cognitiva.

### **2.2. *Drosophila melanogaster***

La mosca *Drosophila melanogaster* es una especie utilizada frecuentemente en experimentación genética, dado que posee un reducido número de cromosomas (4 pares) y un breve ciclo de vida (15-21 días). Aproximadamente el 61% de los genes de enfermedades humanas que se conocen tienen una contrapartida identificable en su genoma, el 50% de las secuencias proteínicas de la mosca tienen análogos en los mamíferos. Se reproducen rápidamente así que se pueden estudiar varias generaciones en un corto período de tiempo.

Se han creado modelos transgénicos de *Drosophila* que expresan la proteína humana tau para poder estudiar así las taupatías, enfermedades dentro de las cuales se encuentra la EA; no obstante podemos decir que la proteína tau homóloga de *Drosophila* exhibe un 66 % de similitud a la tau humana y muestra un número de importantes semejanzas tales como los dominios de unión a los microtúbulos, los cuales son necesarios para estabilización del citoesqueleto (Heidary and Fortín, 2001).

La mayor cantidad de estudios han estado encaminados a identificar las kinasas que juegan un papel en la fosforilación de tau (Mershin et al., 2004; Mudher et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Plattner et al., 2006) y la función de tau en el citoesqueleto sináptico y en el transporte axonal (Ubhi et al., 2007).

Por otra parte también se han creado transgénicos de *Drosophila melanogaster* que expresan la proteína APP humana para estudiar el transporte y la acumulación axonal de marcadores sinápticos (Rusu et al., 2007).

### **2.3. La rata como modelo para la EA**

Uno de los primeros modelos animales que se creó para estudiar la enfermedad fue mediante la inyección directa del péptido A $\beta$  en el cerebro de ratas. En estos animales microinyectados se puede observar la formación de depósitos de A $\beta$ , que exhiben las características morfológicas y bioquímicas típicas de las observadas en humanos (ver ref. Soto, 1999). En nuestro laboratorio se ha utilizado este modelo, inyectando intracerebroventricularmente durante 4 semanas A $\beta$  (40-42), agentes pro-oxidantes (butionina sulfoximina (BSO), sulfato de hierro (FeSO<sub>4</sub>)) y la combinación de ellos (García-Matas et al., 2010). El tratamiento de combinación mostró un mayor deterioro cognitivo, medido mediante el laberinto acuático de Morris (MWM, del inglés Morris Water Maze).

Otro modelo se crea mediante la administración de aluminio durante una etapa de la vida del animal. El aluminio se ha descrito como una neurotoxina y ha sido asociado durante décadas a la EA esporádica (Xu et al., 1992; Andrásí et al., 2005; Walton, 2006). Este metal es capaz de producir daños oxidativos en regiones vulnerables a los cambios de la EA en humanos e induce la formación de tau hiperfosforilada. Se ha descrito que este modelo exhibe un deterioro progresivo de la memoria y desarrolla la EA en edades avanzadas (Walton, 2007).

En varios estudios se han utilizado vectores virales adeno asociados, agentes de transferencia de genes que resultan estables, expresando el transgen determinado en las

neuronas por largo tiempo (During et al., 2003, Tenenbaum et al., 2004, Wang et al., 2003). Estos adenovirus se han utilizado para llevar la diana de expresión de péptidos de A $\beta$  a los hipocampos de ratas adultas y estudiar el papel de ellos en la patogénesis y en el déficit cognitivo en la EA (Lawlor et al., 2007).

Un modelo recientemente creado y utilizado, ha sido mediante la inyección de D-galactosa por vía intraperitoneal durante un largo período de tiempo en ratas ovariectomizadas. Este modelo se basa en la teoría de que la privación de estrógenos y el estrés oxidativo actúan sinérgicamente para el desarrollo y progresión de la EA. Estas ratas exhiben un alto grado de pérdidas cognitivas y de la memoria, presentan pérdida de neuronas colinérgicas en el córtex frontal y degeneración sináptica en hipocampos y corteza cerebral. En sus hipocampos se pueden observar las alteraciones histopatológicas típicas de la EA, incluyendo deposiciones intracelulares de A $\beta$ , ONF y cuerpos nucleares gránulo-vasculares (Hua et al., 2007).

#### **2.4. El conejo como modelo para la EA**

Un prometedor y poco estudiado modelo es el conejo alimentado con una dieta rica en colesterol. Este conejo desarrolla un número de índices patológicos de la EA (Sparks et al., 1994) que se aceleran cuando unas pequeñas trazas de cobre se adicionan a su agua de beber (Sparks, 2004). Deposiciones de tau, así como de A $\beta$ , se han visto en el 1% de los cerebros de estos conejos ya a los 7 meses de edad (Ghribi et al., 2006). La secuencia de aminoácidos de A $\beta$  que forman las placas amiloides son idénticas en conejos, en humanos y en algunos otros mamíferos pero no ocurre así con los roedores (Johnstone et al., 1991). A nivel molecular este modelo tiene al menos una docena de semejanzas a la patología observada en la EA incluyendo altas concentraciones de A $\beta$ , acumulación neuronal de A $\beta$  reactiva, placas de A $\beta$  extracelular, elevado colesterol cerebral, apoE inmunoreactiva, brechas en las barreras sanguíneas del cerebro, microgliosis y pérdida neuronal (Sparks et al., 1994; 2000; Sparks, 1996; 2004). La utilización del conejo como modelo, en general, ha mostrado su validez para estudios desde niveles moleculares hasta cognitivos y ha sido de utilidad como test preclínico de eficacia de drogas para la EA (Woodruff-Pak et al., 2007).

#### **2.5. Modelos caninos**

El modelo canino ha sido considerado como un modelo apropiado para el estudio de enfermedades neurodegenerativas y de envejecimiento cerebral (Speakman et al., 2003;

Speakman, 2005; Sutter et al., 2007; Pugliese et al., 2009) y ha sido utilizado frecuentemente para el desarrollo preclínico de una gran variedad de drogas (ver refs. Hu et al., 2008; Cuyckens et al., 2008). Específicamente como modelo de la EA ha sido empleado para probar estrategias de tratamientos que van desde agonistas colinérgicos a cofactores enzimáticos mitocondriales (Araujo et al., 2005; Siwak et al., 2000; 2005; Landsberg, 2005; Milgram et al., 2002; Head, 2007). El interés en este modelo ha estado basado principalmente en el hecho de que el perro puede desarrollar naturalmente una disfunción cognitiva relativa a la edad que reproduce varios aspectos de la EA (Cummings et al., 1996a,b; Head et al., 2002; Head, 2007; Siwak-Tapp et al., 2008; Opii et al., 2008).

Los daños cognitivos mostrados en el perro se han correlacionado con extensos depósitos de A $\beta$  en el córtex cerebral (Cummings et al., 1996a; Head et al., 1998; 2000). Algunos estudios histológicos en este modelo han mostrado que las áreas más afectadas son en el córtex prefrontal, incluyendo el giro proreus y el hipocampo (Yoshino et al., 1996; Hou et al., 1997; Head et al., 2000). Por otra parte, en este modelo también se ha mostrado que se puede producir la hiperfosforilación de tau. Sin embargo, las placas seniles y los ONF no han sido consistentemente demostrados (Wisniewski et al 1996; Wegiel et al., 1998; Papaioannou et al 2001; Pugliese et al., 2006).

Algunos autores han sugerido que este puede ser un modelo seguro para estudiar algunos puntos moleculares relacionados con la formación de A $\beta$ , debido a que la APP y parte de la maquinaria enzimática para su procesamiento presentan una gran homología con la presente en humanos (Johnstone et al., 1991). Este modelo ha sido utilizado además en ensayos inmunoterapéuticos contra A $\beta$  fibrilar y en investigaciones donde se combinan los antioxidantes con el enriquecimiento conductual (incluyendo componentes sociales, físicos y cognitivos) (Head et al., 2006; Head , 2007).

## **2.6. Modelos primates**

Debido a la gran similitud genética entre los primates y los humanos se ha pensado que podrían ser el modelo más apropiado para estudiar los cambios neuropatológicos que se producen en la EA pero estos modelos han sido poco utilizados. En cualquier caso tienen la ventaja de que son modelos naturales y la gran desventaja de su larga vida en comparación con ratas y ratones. En la literatura encontramos varios trabajos donde han utilizado los primates como modelos para el estudio de la EA (Gearing et al.,1995; Podura et al., 1994; Lemere et al., 2004; Fainman et al., 2007). Tanto las placas seniles



como los ONF han sido observados en diferentes especies de avanzada edad, chimpancés, orangutanes y macacos (Selkoe et al., 1987; Cork et al., 1990; Gearing et al., 1995). En orangutanes de 46 años se han descrito amiloide vascular y la formación de placas (Selkoe et al., 1987) y en un chimpancé de 56 años se ha encontrado amiloide vascular (Gearing et al., 1995). Cambios similares se han observado en los monos ardilla (Walker et al., 1987; 1990) y en los macacos (Podura et al., 1994).

## **2.7. Modelos de ratones transgénicos**

Los ratones están entre los animales más utilizados como modelos de experimentación en los estudios científicos. En los últimos años se ha ido variando la selección de ratones de laboratorio, hasta el punto que se ha incrementado el uso de las modalidades transgénicas en un gran número de campos de investigación. Los ratones transgénicos son ratones a los que se ha modificado su genoma para conseguir una determinada característica de la que carecen los ratones “normales” (a los que no se ha modificado su información genética). Entre las características más pretendidas por los investigadores está la eliminación de un gen. Un ratón que carece de un gen determinado en todas sus células, y por tanto de la proteína codificada por ese gen, es lo que se llama un ratón “*knock out*” para ese gen. Los animales transgénicos también se pueden crear por la introducción de uno o varios genes y es lo que se conoce como “*knock in*”.

### **2.7.1. Transgénicos con mutación APP, PS-1 y/o PS-2**

Copias minigénicas de *APP* y *PSI-2* humanas, implicados en la EA familiar han sido utilizados para crear modelos de EA con ratones transgénicos (Duff et al., 1996). Los modelos transgénicos con mutación en *APP* generan la deposición del péptido A $\beta$ , similar pero no idéntica al de la placa senil humana. Es común en estos modelos la observación de angiopatía amiloide. Además del depósito del péptido A $\beta$ , se observan distrofia del axón y alteración de las dendritas. Estos modelos han sido utilizados muy frecuentemente para comprender la acción de las placas seniles en la enfermedad (Park et al., 2006), para estudiar la acción de la microglía en la eliminación de las placas A $\beta$  (Simard et al., 2006), para estudiar las interacciones proteicas como la de A $\beta$  con la enzima A $\beta$  Alcohol deshidrogenasa (ABAD) (Yao et al., 2007). Los modelos transgénicos doble mutante *APP+PSI*, muestran un desarrollo progresivo y rápido de placas compactas a los 3 meses de edad y alcanzan la meseta a los 12 meses (Holcomb et al., 1998).

Los ratones transgénicos de *APP* han suscitado interrogantes en relación al mecanismo de pérdida neuronal, la acumulación de A $\beta$  en el cuerpo neuronal, inflamación, gliosis y alteraciones dendríticas. Se han utilizado para determinar la implicación del estrés oxidativo en la EA (Schuessel et al., 2005; Esposito et al., 2006). Aunque generalmente en los modelos transgénicos es difícil trazar conexión entre síntomas, lesiones e incremento en oligómeros A $\beta$  (Duyckaerts et al., 2007). Solo se encuentran ONF en líneas de ratones que sobre-expresan tau mutada. Asimismo, se han testado un gran número de moduladores A $\beta$  o tau (Hutton et al., 2001; Duyckaerts et al., 2007).

### 2.7.2. Transgénicos con tauopatías

Las tauopatías son un grupo de enfermedades degenerativas caracterizadas histopatológicamente por la presencia de inclusiones filamentosas en neuronas (patología neurofibrilar) y ocasionalmente en la glía, compuestas por formas hiperfosforiladas de la proteína tau, ONF. Este grupo de desórdenes se incluye la EA donde podemos encontrar los ONF. El descubrimiento de la mutación del gen tau en la demencia frontotemporal con parkinsonismo unido al cromosoma 17 facilitó el desarrollo de las tauopatías en ratones transgénicos (Götz et al., 2001; Higuchi et al., 2002; Lewis et al., 2000).

Ha habido un significativo progreso en el desarrollo de modelos de este grupo de enfermedades. En particular los ratones que expresan tau con la mutación P301L han demostrado que es posible generar modelos animales robustos para patologías neurofibrilares (Terwel et al., 2005). Estos ratones deberían permitir la formación de neurofilamentos para ser estudiados “*in vivo*” junto con la neurodegeneración asociada. Sin embargo, estos modelos transgénicos solo representan una primera generación de ratones que recapitulan las tauopatías humanas. Se espera que futuros modelos expresen múltiples isoformas mutantes de tau. Un modelo inducible permitiría estudios acerca de la reversibilidad de los ONF, así como si los mismos impactan sobre el progreso neurodegenerativo. Modelos en los que la mutación de tau humana es introducida en el gen tau murino permiten el estudio de la patología tau sin sobre-expresar transgenes o promotores heterólogos (ver refs. Götz et al., 2007).

### 2.7.3. Modelo de 5 mutaciones

Para realizar este modelo, Oakley et al., se basaron en 5 mutaciones que se producen en *APP* y las presenilinas (*PS-1* y *PS-2*) para aumentar la producción de A $\beta$ -42. Este

modelo es conocido como 5xFAD, que representan las 5 mutaciones que se producen en la EA familiar (FAD del inglés familiar Alzheimer's disease). En este modelo hay una rápida producción de A $\beta$ -42 que lleva a la formación de las placas seniles similares a las encontradas en los pacientes con la EA (Oakley et al., 2006). Los depósitos de A $\beta$  comienzan a los 2 meses de edad y llegan a ser una gran cantidad, especialmente en el súbiculo y en las capas corticales profundas. La A $\beta$ -42 intraneuronal se acumula desde 1.5 meses de edad, antes de la formación de la placa, y aparecen en el soma neuronal y las dendritas.

En este modelo se produce la disfunción sináptica con el avance de la edad, observándose una marcada disminución de la sinaptofisina, syntaxina y la PSD95 y la pérdida de neuronas corticales piramidales (Oakley et al., 2006). Además, también ha sido observada la pérdida de memoria (Oakley et al., 2006; Ohno et al., 2007). Por otra parte se ha publicado que pueden presentar afectaciones conductuales y deficiencias motoras (Jawhar et al., 2010).

Este puede ser un modelo útil para estudiar los procesos relacionados con la formación de la placa senil, la pérdida sináptica y el declive cognitivo. Tiene la ventaja de que se produce una gran cantidad de depósitos de A $\beta$  en un corto período de tiempo, lo cual agiliza el tiempo dedicado a las investigaciones relacionadas con esta molécula. No obstante, en este modelo no se producen los ONF característicos de la EA en humanos.

#### **2.7.4. Modelo triple-transgénico**

En el año 2003 se describe el primer modelo triple-transgénico en el que se desarrollan tanto placas como ONF en regiones cerebrales apropiadas. Para la creación de este modelo en lugar de cruzar tres líneas independientes se introdujeron directamente dos transgenes adicionales (*APP* y *TAU*) dentro de la línea germinal de un ratón genéticamente modificado (*PS-1*) (Figura 6).

Este ratón expresa depósitos extracelulares A $\beta$  previos a la formación de ONF, coherente con la “hipótesis de la cascada amiloide”. Presenta pérdida progresiva de la plasticidad sináptica, incluyendo LTP, que comienza antes del depósito extracelular de A $\beta$  y de la aparición de los ONF, asociándose a inmuno-reactividad por A $\beta$ , lo cual sugiere que la disfunción sináptica es un defecto proximal en la patobiología de la EA (Oddo et al., 2003a,b). Por tanto, se considera que este tipo particular de ratón transgénico es útil para estudiar el impacto de A $\beta$  y tau sobre la plasticidad sináptica. Por otra parte, este modelo presenta déficits conductuales y cognitivos que se

incrementan con el avance de la edad, de forma similar a lo que ocurre en humanos con la EA (Giménez-Llort et al., 2007).

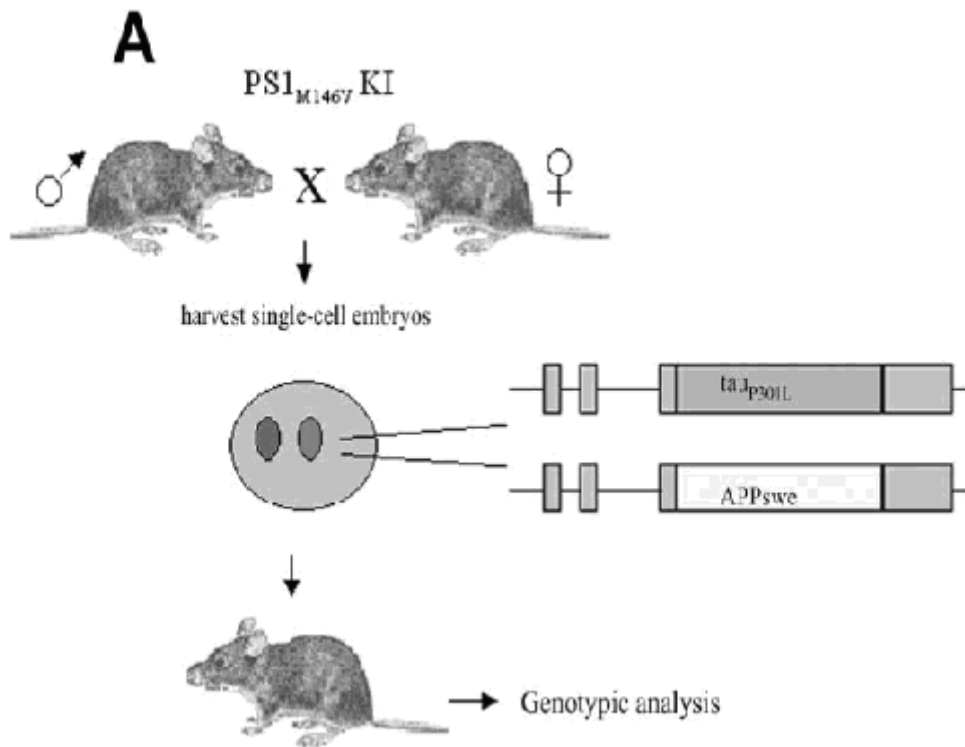


Figura 6. Creación del modelo tripletransgénico utilizado en nuestro trabajo (Oddo et al., 2003a).

Desde la creación de este ratón triple-transgénico se han realizado una variedad de trabajos investigativos con este modelo para la mejor comprensión de la EA. En el 2004 se ve que la acumulación de A $\beta$  dispara la actividad de corte de la caspasa sobre tau y que es un evento temprano, que ocurre antes de la hiperfosforilación (Rissman et al., 2004) y que la salida de tau patológica es mediado por el protosoma y dependiente del estado de fosforilación (Oddo et al., 2004). En el 2005 se realiza un estudio que demuestra que la administración crónica de nicotina exagera la taupatía en este modelo (Oddo et al., 2005), se estudia la actividad del calcio en la EA (Smith et al., 2005a), la relación de A $\beta$ , tau y la disfunción sináptica (LaFerla and Oddo, 2005), la relación de A $\beta$  y el déficit cognitivo (Billings et al., 2005), se realizan estudios de activación glial (Janelins et al., 2005), se publica un experimento en el que inyectan el tercer ventrículo con un anticuerpo anti-A $\beta$ , con lo que demuestran que la inmunoterapia A $\beta$  intraventricular disminuye la presencia A $\beta$  en hipocampo y retarda la disfunción cognitiva (Billings et al., 2005).

En este sentido, los autores proponen que la presencia intraneuronal de A $\beta$  puede ser considerada un marcador biológico potencial de inicio de EA, ya que la acumulación intraneuronal A $\beta$  es un evento temprano y sintomático (Billings et al., 2005). En un artículo publicado en 2006 estudian la eficacia terapéutica de AF267B, agonista muscarínico M1, demostrando un franco mejoramiento cognitivo, lo que se corrobora al administrar el antagonista M1 dicitlomina, que exacerba las patologías A $\beta$  y tau (Caccamo et al., 2006).

En otras líneas de investigación se enfatiza la reproducción de las enfermedades neurodegenerativas, tipo EA, mediante el uso de vías bioquímicas en ratones triple-transgénicos (Kitazawa et al., 2005). Algunos autores, por su parte, se valen de ratones triple-transgénicos incluso para estudiar el componente inflamatorio en áreas específicas del SNC, a los efectos de determinar si existen diferencias interregionales y, por consiguiente, marcadores inflamatorios de EA (Janelins et al., 2005). En un trabajo publicado en el 2005 se utilizan cultivos primarios de neuronas de estos ratones 3xTgAD para estudiar la liberación de calcio inducido por la cafeína (Smith et al. 2005b).

En el otro extremo del espectro, existen autores que exclusivamente focalizan los efectos del ambiente sobre el desarrollo de EA, disminución de las deficiencias cognitivas relacionadas a la edad mediante la administración de dietas hipocalóricas y ayuno intermitente (Kumar et al., 2007), atenuación de la patología A $\beta$  y la taupatía mediante el manejo de los ácidos docosahexaenoico y docosapentaenoico dietarios (Green et al., 2007), decremento de patologías A $\beta$ -56 y tau con mejoramiento de la declinación comportamental a través del aprendizaje (Billings et al., 2007).

En conclusión, los modelos murinos triple-transgénicos para el estudio de EA han resultado ser útiles para estudiar el desarrollo de la enfermedad y su recuperación histológica y cognitiva, tanto en sus aspectos neurobioquímicos, neuropatológicos, neurofarmacológicos y ambientales. Los estudios realizados con este modelo superan en proporción los realizados con otros tipos de modelos. De cualquier forma siempre existirá controversia acerca de hasta que punto los modelos animales son representativos de la patología en el humano.

Hemos mencionado una variedad de modelos animales que han sido utilizados para el estudio de la EA y que se han creado empleando diferentes especies de animales. En este trabajo utilizamos el modelo 3xTg-AD (Oddo et al., 2003a), que se ha expuesto a diferentes terapias de EF en diferentes etapas de la vida del animal y hemos combinado

esta terapia con melatonina, considerada un potente antioxidante. Y es que en términos de la traducción de la investigación experimental al tratamiento, que en el caso de este trabajo implica el EF en los pacientes de la EA, es crítico evaluar la intervención del EF en puntos de tiempo que se dirijan no sólo al comienzo de la disminución cognitiva, sino también a la prevención de la misma. Con este trabajo proyectamos realizar una contribución en este punto, que creemos fundamental.

## **OBJETIVOS**

---

---

### **1. Objetivo General:**

Determinar el valor preventivo y/o terapéutico del ejercicio físico voluntario en la enfermedad de Alzheimer, mediante su aplicación en el modelo de ratón tripletransgénico 3xTg-AD.

### **2. Objetivos Específicos:**

- 1- Caracterizar las afectaciones conductuales y cognitivas que se producen en el ratón 3xTg-AD desde etapas tempranas del desarrollo del animal y con el avance de la enfermedad.
- 2- Determinar el efecto del ejercicio físico sobre las afectaciones conductuales y cognitivas que se producen en el ratón 3xTg-AD desde etapas tempranas del desarrollo del animal y con el avance de la enfermedad.
- 3- Determinar el estado de estrés oxidativo cerebral del ratón 3xTg-AD y el efecto del ejercicio físico voluntario sobre éste.
- 4- Determinar el valor terapéutico de la melatonina así como su combinación con el ejercicio físico en etapas avanzadas de la enfermedad en el ratón macho 3xTg-AD.
- 5- Determinar variaciones de proteínas neuronales relacionadas con los mecanismos cognitivos en la enfermedad de Alzheimer y con el ejercicio físico en el ratón 3xTg-AD.
- 6- Determinar el efecto del ejercicio físico sobre las afectaciones conductuales y cognitivas que se producen por el déficit de las hormonas femeninas en el ratón hembra 3xTg-AD.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

---

## **1. ANIMALES**

Se utilizaron ratones machos y hembras 3xTg-AD, homocigóticos, que albergan los transgenes *PS1/M146V*, *APP<sup>Swe</sup>* y *tauP301L*, creados por ingeniería genética en la Universidad de California en Irvine, y no transgénicos (NTg) con el mismo fondo genético híbrido *129/C57BL6* (Oddo et al., 2003a). Estos animales procedían de la colonia establecida en la Unidad de Psicología Médica de la Universidad Autónoma de Barcelona (Giménez-Llort et al., 2007). Los animales se estabularon en jaulas convencionales (Macrolon, 35 x 35 x 25 cm), en la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Psicología de la Universidad de Barcelona (UB), en grupos de 3 a 5, del mismo sexo y genotipo, en condiciones de temperatura y humedad estándar, con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (comenzado a las 8:00 de la mañana) y con libre acceso a agua y comida. Los genotipos fueron confirmados con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante análisis de DNA extraído de biopsias de la cola. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA, UB).

## **2. GENOTIPAGE POR PCR**

La confirmación del genotipo de los ratones 3xTg-AD y NTg se realizó utilizando un kit comercial (REDxtract-N-Amp Tissue PCR Kit, SIGMA). Para ello, cuando los animales cumplieron entre 10-15 días, se les realizó una biopsia de la cola (0.5-1 mm aproximadamente), limpiando cuidadosamente con alcohol, trabajando con material estéril y colocando el tejido de cada animal en un eppendorf estéril en hielo. El tejido se guardó a -20 °C hasta su utilización para extraer el DNA, que se utilizó para realizar la PCR.

Reactivos que vienen con el kit:

- Solución de extracción.
- Solución de preparación del tejido.
- Solución de Neutralización.
- Mezcla de reacción PCR (buffer, sales, dNTPs, Taq polimerasa, colorante rojo).

Reactivos que no vienen con el kit:

- Agua Milli-Q estéril.
- Tampón TBE 0.5x estéril (0.045 M Tris-borato, 0.001 M EDTA en agua Milli-Q).
- Oligos:

Para *PSI*: 5'-cacacgcaactctgacatgcacaggc-3'

5'-aggcaggaagatcacgtgttcaagtac-3'

Para *APP*: 5'-gaggtattcagtcattgtct-3'

5'-gcttgcaccagttctggatgg-3'

Debido a que *APP* y *tau* están integrados en el mismo locus genético si el ratón es positivo para *APP* también lo será para *tau* y es por este motivo que en la PCR solo utilizamos los oligos de *PSI* y *APP*.

## **2.1. Extracción de DNA**

Se añaden a cada biopsia 75 µL de solución de extracción y 25 µL de la solución de preparación del tejido. Se agita mediante vórtex, vigilando que el tejido quede sumergido dentro de la solución. Se incuba 10 min a temperatura ambiente (TA) y seguidamente 3 min a 95 °C. Se añaden 100 µL de solución de neutralización y se agita mediante vórtex. Se centrifuga hasta alcanzar 13000 rpm a 4 °C y se toma el sobrenadante. El tejido que queda podrá ser utilizado para realizar otras extracciones por lo que se guarda a -20 °C. Todo el proceso de extracción se realiza con material estéril.

## **2.2. Técnica de PCR**

En un tubo de PCR estéril se añaden:

- 2.8 µL de agua Milli-Q estéril.
- 4 µL de muestra (DNA extraído).
- 0.8 µL de cada oligo 10 µM (0.4 µM de cada uno en la reacción).
- 10 µL de la mezcla de reacción.

Los tubos de PCR se colocan en el termociclador con el siguiente programa:

- a) Temperatura 95 °C 5 min (desnaturalización inicial).
- b) Temperatura 94 °C 30 seg (desnaturalización).

- c) Temperatura 53 °C 30 seg (hibridación).
- d) Temperatura 72 °C 60 seg (extensión).
- e) 30 ciclos de b) a c).
- f) Temperatura 72 °C 3 min (extensión final).
- g) Temperatura 4 °C hasta sacar los tubos.

### **2.3. Electroforesis y revelado**

Mientras se realiza el programa se prepara un gel de agarosa para biología molecular al 1 % en TBE 0.5x y con bromuro de etidio 0.5 mg/mL. Una vez terminada la PCR se cargan las muestras en el gel, se corren a 100 V aproximadamente una hora y se visualizan las bandas mediante luz ultravioleta. Se consideró un genotipo tripletransgénico cuando se visualizaron 2 bandas (550 y 300 pares de bases) y un no-transgénico cuando solo se obtuvo una banda (550 pares de bases, debido a la *PSI* endógena). Se tomaron fotos de todas las PCR realizadas.

## **3. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES**

### **3.1. Experimento 1**

Ratones machos y hembras de 4 meses de edad, NTg y 3xTg-AD, que se expusieron a 1 mes de EF voluntario desde los 3 meses de edad con sus controles sedentarios (NTg EXE, Tg EXE, NTg SED y Tg SED).

### **3.2. Experimento 2**

Ratones machos y hembras de 7 meses de edad, NTg y 3xTg-AD, que se expusieron a 1 mes de EF voluntario desde los 6 meses de edad (NTg EXE-1M y Tg EXE-1M), con sus controles sedentarios (NTg SED y Tg SED).

### **3.3. Experimento 3**

Ratones machos y hembras de 7 meses de edad, NTg y 3xTg-AD, que se expusieron a 6 meses de EF voluntario desde 1 mes de edad (NTg EXE-6M y Tg EXE-6M), con sus controles sedentarios (NTg SED y Tg SED)

### 3.4. Experimento 4

Ratones machos Tg de 12 meses de edad que se sometieron a 6 meses de ejercicio voluntario (Tg EXE), o a un tratamiento con melatonina (Tg Mel), o a la combinación de los dos tratamientos (Tg EXE-Mel) desde los 6 meses de edad con los controles sin tratamiento (NTg y Tg).

### 3.5. Experimento 5

Ratones hembras, NTg y 3xTg-AD, de 15 meses de edad que se expusieron a 3 meses de ejercicio voluntario con sus controles sedentarios desde los 12 meses de edad (NTg EXE, Tg EXE, NTg SED y Tg SED).

### 3.6. Experimento 6

A los 4 meses de edad un grupo de hembras NTg y 3xTg-AD fueron ovariectomizadas y otro grupo se expuso a la operación simulada. A los 6 meses de edad, por un período de 3 meses, la mitad de cada grupo se expusieron a ejercicio voluntario (NTg S+EXE, NTg Ov+EXE, Tg S+EXE, Tg Ov+EXE) y la otra mitad se utilizó como control sin ejercicio (NTg S+SED, NTg Ov+SED, Tg S+SED, Tg Ov+SED).

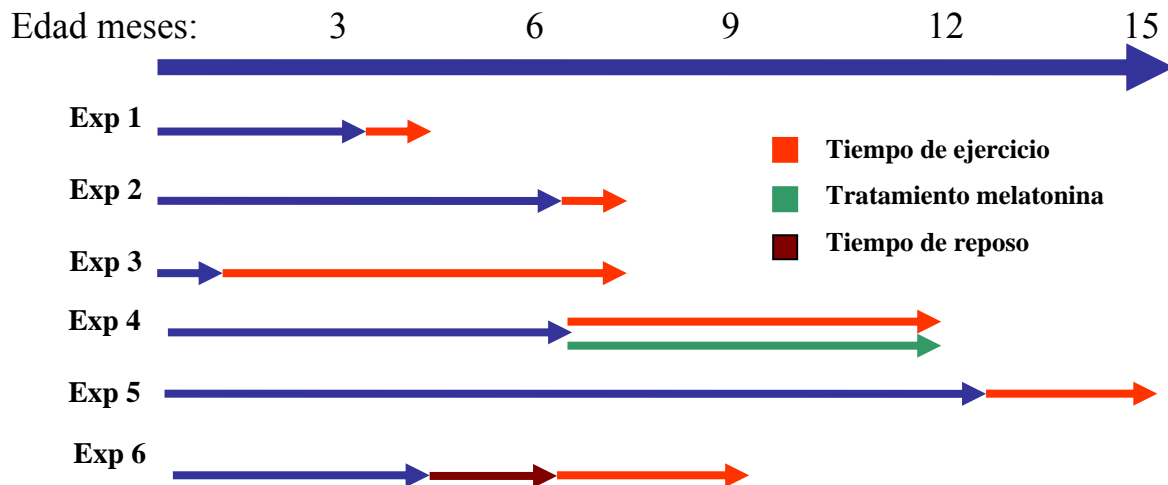


Figura 7. Esquema representativo de los protocolos experimentales con los tratamientos aplicados.

## **4. TRATAMIENTOS**

### **4.1. Ejercicio físico voluntario en rueda de actividad**

Se evaluó el efecto del EF voluntario en etapas tempranas y en etapas más avanzadas de la EA en ratones 3xTgAD. El ejercicio voluntario consistió en colocar los animales, de forma permanente, en una jaula con libre acceso a una rueda de actividad. Los animales que no recibieron ejercicio se estabularon en iguales condiciones pero sin la rueda.

### **4.2. Melatonina**

El tratamiento con melatonina consistió en administrarles el medicamento en el agua de bebida a razón de 10 mg/kg/día. Para la combinación del tratamiento de ejercicio y melatonina lo que se hizo fue colocar los animales en la jaula con libre acceso a la rueda y suministrarles la melatonina en el agua de beber.

### **4.3. Ovariectomía**

#### **4.3.1. Anestesia**

El procedimiento de extirpación ovárica suele durar unos 30 min y para lograr una adecuada sedación nos fue suficiente con aplicar la combinación Ketamina/Xilacina 50-150/5-10 en dosis mg/Kg. Se aplicó por vía intraperitoneal, estando el ratón en posición decúbito con la cabeza ligeramente hacia abajo.

#### **4.3.2. Cirugía**

Cuando el animal comenzó a estar sedado se procedió a cortar el pelo de toda la zona sacro-lumbar. Una vez estuvo completamente anestesiado se limpió la zona pelada con etanol al 70 % y luego con Betadine (povidona iodada). Se realizaron dos pequeñas incisiones paralelas a la columna vertebral, al terminar la zona de las costillas, para buscar los ovarios de cada lado. Una vez localizados los ovarios se procedió a ligar los oviductos y los vasos sanguíneos junto a los ovarios. Seguidamente los ovarios fueron extirpados y se suturó cada incisión con un punto interior y otro exterior (Sutura PGA reabsorción 40 días, Suturas Aragón S.A.).

El procedimiento se realizó con material quirúrgico estéril. En el post-operatorio los ratones fueron colocados sobre una manta térmica hasta su recuperación. Los ratones hembras que se utilizaron como control de la ovariectomía se expusieron a todo el

procedimiento, sus ovarios fueron expuestos al medio y luego reintroducidos cuidadosamente de que no fueran lastimados. Todos los animales quedaron en reposo hasta dos meses después del proceso quirúrgico donde comenzaron el tratamiento de EF voluntario (ver paso 4.1).

## **5. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO**

Los ensayos de comportamiento se realizaron en el laboratorio animal de la Facultad de Psicología de la Universidad de Barcelona (campus Mundet, UB).

En cada una de la pruebas realizadas, siempre que el procedimiento lo permitió, entre cada sujeto evaluado se limpiaron cuidadosamente las señales olfatorias de territorialidad (orina y defecación) con agua jabonosa, seguido de alcohol al 0.05 %, con la intención de no interferir en el comportamiento de los animales.

### **5.1. Reflejos visuales**

Los reflejos visuales y la extensión de las patas posteriores de los animales se midieron 3 veces para cada uno. Para ello los ratones se tomaron por la cola, se elevaron hasta una altura aproximada de 30 cm y se bajaron lentamente sobre una superficie de color negro. Se miró que el animal estirara sus patas traseras y sus patas delanteras, al acercarse a la plataforma, de manera que no se golpeará la nariz con la superficie (Giménez-Llort et al., 2010).

### **5.2. Coordinación motora y equilibrio**

Consistió en colocar el animal 2 veces consecutivas, durante 20 seg cada una, en el centro de una varilla de madera de 1.3 cm<sup>2</sup> y de un metro de longitud. Seguidamente y con el objetivo de incrementar la dificultad se realizó el mismo tipo de ensayo con una varilla de metal de 1 cm de diámetro. En ambos ensayos se tuvieron en cuenta la distancia caminada y el tiempo de permanencia sobre la varilla.

Finalmente se realizó una tercera prueba donde el ratón se colocó en el centro de una cuerda de metal de 2 mm de diámetro y una longitud de 40 cm. Este ensayo se realizó 2 veces seguidas con un tiempo máximo de 5 seg cada vez, y una tercera con un tiempo de 60 seg. En este ensayo además de medir la distancia caminada y el tiempo de permanencia en la cuerda, se tuvieron en cuenta también los recursos empleados en el ejercicio (patas delanteras o traseras y la cola).

Todos los aparatos fueron suspendidos a una altura de 80 cm sobre una mesa completamente acolchada (Giménez-Llort et al., 2010).

### **5.3. Neofobia**

La neofobia a una nueva jaula fue medida introduciendo el ratón, durante 30 seg, en una jaula convencional, limpia (Macrolon, 35 x 35 x 25) con aserrín. En esta prueba el ratón se colocó en el centro de la jaula y se contaron las veces que visitó las esquinas, la latencia de la primera incorporación vertical y el número de incorporaciones (Giménez-Llort et al., 2010).

### **5.4. Campo abierto**

Prueba diseñada y estandarizada para evaluar emocionalidad y deambulación en roedores (Essman, 1967; Sherif and Orelan, 1995). Cada animal se colocó en el punto central del campo abierto (diseñado de madera, blanco, con superficies antireflejantes, 55 x 55 x 25 cm), dividido en cuadrantes de 5 x 5 cm (Giménez-Llort et al., 2010). Se midieron las latencias de movimiento, de deambulación, de incorporación, de llegada a la periferia y del proceso de higiene del animal. También se midió la deambulación total, la cantidad incorporaciones, el tiempo y número de higienes y la emotividad, basada en las defecaciones y la orina. El ensayo se realizó durante 300 seg y quedó guardado a través de un sistema de filmación digitalizado.

### **5.5. Caja oscura/iluminada**

Es un modelo murino utilizado con frecuencia para medir la ansiedad y está basado en la aversión innata de los roedores a las áreas intensamente iluminadas, así como en el comportamiento exploratorio espontáneo en respuesta a factores estresantes de grado leve (Crawley, 1981). En este ensayo el ratón puede explorar dos compartimentos que presentan diferentes características de tamaño (2/1) y de color, uno negro (27 x 18 x 27 cm) y otro blanco (27 x 27 x 27 cm) iluminado con una bombilla de luz blanca de 20 W y que están interconectados por una apertura de 7 x 7 cm (Panlab, S.L., Barcelona, España). Los animales se colocaron en el área en penumbra y fueron grabados durante 300 seg. Se midió la latencia de entrada a la zona iluminada, así como el número de entradas y el tiempo de permanencia en esta zona. Además contamos la cantidad de defecaciones y orina en cada zona (Giménez-Llort et al., 2010).



### **5.6. Tabla de agujeros**

Este ensayo se utilizó para estudiar el comportamiento exploratorio de los animales frente a un ambiente novedoso en un tiempo total de 300 segundos. El aparato consiste en una caja de madera, blanca (40 x 40 x 30 cm), cuya base tiene 4 agujeros equidistantes de 2 cm de diámetro. El ratón se colocó en el centro de la superficie y medimos la latencia de movimiento y de exploración del primero y de los cuatro agujeros. Se consideró una exploración cada ocasión que el ratón introdujo la cabeza en un agujero, pasando de la zona de los ojos. Se tuvo en cuenta además, por cada minuto, el número de veces que el animal exploró y el tiempo que demoró en la exploración. Se contaron las defecaciones y la orina (Giménez-Llort et al., 2010).

### **5.7. Aprendizaje espacial en laberinto acuático de Morris (MWM)**

El MWM (de Morris Water Maze) es una de las pruebas más ampliamente utilizada para medir aprendizaje y memoria dependientes de hipocampo en roedores. Para esta prueba se utilizó una piscina de 100 cm de diámetro, de color blanco y a la que se le añadió pintura blanca no tóxica para que el agua quedara completamente opaca. La temperatura del agua se mantuvo controlada y estable a  $26 \pm 1$  °C. Se introdujo una plataforma blanca de 10 cm de diámetro a 0.5 cm por debajo del nivel del agua y a 20 cm de la pared. En cada uno de los cuatro puntos cardinales de la piscina se colocó un objeto diferente, los que el ratón debió utilizar para recordar la posición de la plataforma en el agua. Los objetos estaban dispuestos en ángulo de 90° entre ellos y junto a la plataforma se rotaron en las posiciones 90°, 180°, 270° y 360° (Figura 8), en cada ensayo, para asegurarnos de que el animal los utiliza para guiarse hacia la plataforma. Cada día se tuvo en cuenta que el animal no comenzara con la plataforma en el mismo sitio donde había terminado el día anterior para no influir positivamente en el resultado del ensayo.

#### **5.7.1. Fase de aprendizaje de guía**

Esta fase se realizó solo el primer día y constó de 5 ensayos de escape. En ellos se dejó nadar libremente el animal hasta localizar la plataforma (señalizada con una banderola). El tiempo máximo de nado fue de 60 seg. Cuando el animal encontró la plataforma antes de los 60 seg se le dejó permanecer en ella un tiempo de 10 seg para que pudiera orientarse. Si el ratón no se mantuvo en la plataforma durante este tiempo no se consideró como acertado el ensayo y se le dejó nadar hasta completar los 60 seg.

Cuando el animal completó su tiempo máximo de nado y no encontró la plataforma fue cuidadosamente colocado encima de la misma dejándolo 10 seg para su orientación. La finalidad de esta fase fue conseguir la habituación de los animales a la piscina y a la presencia de la plataforma y de los objetos de orientación.

### **5.7.2. Fase de adquisición o aprendizaje espacial**

Esta fase tuvo una duración 6 días, con 5 ensayos cada día. Se realizó con las mismas condiciones que en la fase de aprendizaje de guía, pero sin la banderola que indicaba la presencia de la plataforma. Para encontrar la plataforma el animal solo debió orientarse por los objetos colocados en los puntos cardinales.

### **5.7.3. Prueba de retención del aprendizaje**

El 7<sup>mo</sup> día se realizó un primer ensayo de recordatorio igual a los de la fase de aprendizaje. Seguidamente se realizó el ensayo de prueba de 60 seg de duración. Este ensayo se realizó extrayendo la plataforma de la piscina, se hizo nadar el animal y se midió el tiempo que empleó en buscar la plataforma en el cuadrante donde debería hallarse esta. También se midió el tiempo que nadó en cada uno de los demás cuadrantes.

## **6. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE ESTRÉS OXIDATIVO CEREBRAL**

Una vez terminado el análisis conductual se dejaron reposar los animales durante 48 h y procedimos a sacrificarlos mediante decapitación. Los cerebros se extrajeron separando los dos hemisferios y diseccionando corteza e hipocampo. Cada una de las muestras se pesó rápidamente, se mantuvieron en nieve carbónica durante la manipulación y fueron guardadas a -80 °C. Se utilizó un hipocampo para la determinación de la expresión de proteínas mediante western blot y una corteza para realizar las siguientes determinaciones:

- Glutación peroxidasa (GPx).
- Glutación reductasa (GR).
- Superóxido dismutasa -CuZn y -Mn (SOD-CuZn y SOD-Mn).
- Lípidos oxidados (LPO).
- Glutación reducido, oxidado y su relación (GSH, GSSG y GSH/GSSG)

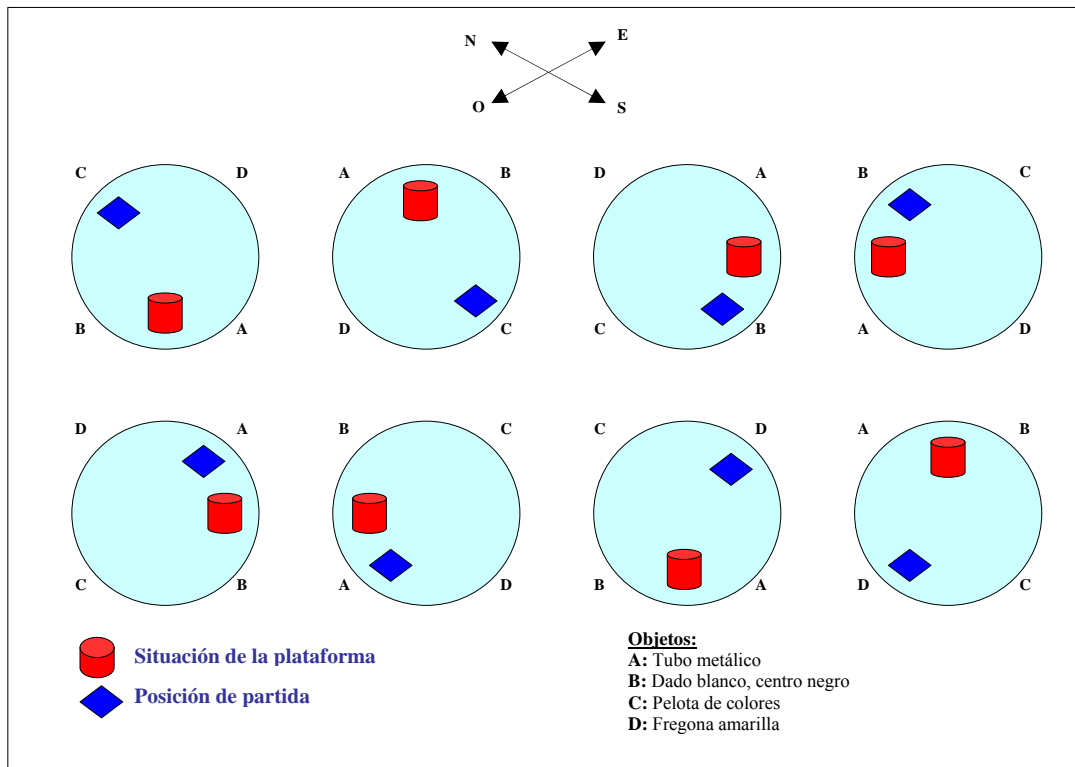


Figura 8. Diseño de los ensayos. La plataforma puede ser situada en 4 puntos diferentes y a cada localización de la misma le pueden corresponder dos posiciones de partidas diferentes del ratón en la piscina.

### 6.1. Homogenización

Para la determinación de la actividad de las enzimas y de los niveles de LPO se tomó la mitad de una corteza y se procedió a homogenizar en tampón fosfato potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM + EDTA 1 mM pH 7.4) a razón de 100 mg/mL. De este homogenado se tomaron 100  $\mu\text{L}$  para determinar LPO y 10  $\mu\text{L}$  para determinar la concentración de proteínas totales. El resto se centrifugó a 12 000 rpm, durante 30 min a 4 °C. Se tomó este sobrenadante para la determinación de la actividad de la GPx, GRd y las SOD (Giménez-Llort et al., 2010).

La otra parte de esta corteza se homogenizó en tampón SSA al 3.3 % (50 mL de ácido 5-sulfosalicílico al 10 % + 100 mL de HCl 10 mM) a razón de 200 mg/mL. Se realizó una centrifugación a 12 000 rpm, durante 30 min a 4 °C y se tomó el sobrenadante para la determinación del GSH y GSSG (Giménez-Llort et al., 2010).

### **6.2. Determinación de la concentración de proteínas**

Se realizó siguiendo el método de Bradford descrito en 1976. Este método se basa en el cambio del máximo de absorción (desde 465 nm a 595 nm) del reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250), cuando interacciona con los enlaces peptídicos.

Para realizar la determinación se realiza una curva patrón con diferentes concentraciones de una solución de BSA (Albúmina de suero bovino), desde 1 hasta 20 µg/mL, en agua Milli-Q. Las muestras se preparan añadiendo 5 µL del extracto proteico a 795 µL de agua Milli-Q. Se añaden 200 µL del reactivo de Bradford (Biorad Protein Assay, Biorad), se agita mediante vórtex y se incuba 15 min a TA. Seguidamente se transfieren 200 µL de cada una de las concentraciones de la curva patrón y de las muestras a una placa de 96 pozos para medir la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se calcula interpolando el valor de la absorbancia de cada muestra en la recta que se obtiene de la curva patrón preparada con diferentes concentraciones de BSA.

### **6.3. Determinación de la actividad de la GPx**

Esta determinación enzimática se basa en la oxidación del glutatión por parte de la GPx en presencia del peróxido de hidrógeno. Se adiciona GR y NADPH para facilitar la formación del GSH y que no se inhiba la reacción por exceso de GSSG.

Soluciones que se utilizaron en esta técnica:

- Tampón A: 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0 en agua Milli-Q.
- Tampón B: 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1 mM EDTA + 2 mM  $\text{NaN}_3$ , pH 7.0 en agua Milli-Q.
- 0.1 %  $\text{NaHCO}_3$  en agua Milli-Q.
- 1.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua Milli-Q.
- 2.4 U/mL de GR en tampón A.
- 10 mM GSH en agua Milli-Q.
- 1.5 mM NADPH en  $\text{NaHCO}_3$  0.1 %.

Se procede a realizar una curva patrón a partir de una solución de GPx con concentración conocida desde 0.1 hasta 3 U/mL en tampón A. En cada pozo de una placa de 96 se adicionan 100 µL de tampón B. Luego, por duplicado, se colocan 20 µL

de cada muestra a analizar o de las diferentes concentraciones de la curva patrón o del tampón A, para utilizarlo como control. Se adicionan además 20  $\mu\text{L}$  de la solución de GR a 2.4 U/mL y 20  $\mu\text{L}$  de GSH. Se agita con pipeta multicanal y se incuba la placa a 37 °C 5 min en el espectrofotómetro. Al mismo tiempo se calienta el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 37 °C. Luego de la incubación se adicionan 20  $\mu\text{L}$  del peróxido y 20  $\mu\text{L}$  del NADPH por pozo. Rápidamente se lee la cinética del NADPH +  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 340 nm cada 15 seg durante 3 min. La concentración de la GPx se calcula interpolando el valor de la absorbancia de cada muestra en la recta que se obtiene de la curva patrón preparada con diferentes concentraciones de GPx.

#### **6.4. Determinación de la actividad de la GR**

Esta determinación se basa en el cambio de coloración que se produce por la reducción del GSSG por parte de la GR en presencia del NADPH a 340 nm.

Soluciones que se utilizaron en esta técnica:

- Tampón fosfato potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  150 mM + EDTA 2 mM pH 7.5) en agua Milli-Q (TFP).
- 0.1 %  $\text{NaHCO}_3$  en agua Milli-Q.
- 10 mM GSSG en agua Milli-Q.
- 2 mM NADPH en  $\text{NaHCO}_3$  0.1 %.

Se prepara una curva patrón a partir de una solución de GR con concentración conocida desde 5 hasta 100 mU/mL en TFP. En una placa de 96 pozos se añaden 140  $\mu\text{L}$  del TFP por pozo, 20  $\mu\text{L}$  de muestra o de la curva patrón, por duplicado, y 20  $\mu\text{L}$  de NADPH. Se incuba la placa a 37 °C durante 5 min en el espectrofotómetro y al mismo tiempo se calienta el GSSG también a 37 °C. Luego de la incubación se adicionan 20  $\mu\text{L}$  del GSSG por pozo y se lee la cinética de formación del GSH a 340 nm cada 15 seg durante 3 min. La concentración de la GR se calcula interpolando el valor de la absorbancia de cada muestra en la recta que se obtiene de la curva patrón.

#### **6.5. Determinación de la actividad de las SOD**

Para la determinación de la actividad de las SOD se utilizó el kit Ransod (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK) basado en el sistema Xantina/Xantina oxidasa. Este kit fue adaptado para su lectura en placas. Primeramente se procedió a determinar la SOD-

total y luego la actividad de la SOD-Mn, por inhibición de la actividad de la SOD-CuZn mediante la adición de KCN 500  $\mu$ M. Por último, mediante la diferencia de la actividad de la SOD-total y de la SOD-Mn se obtuvo la actividad de la SOD-CuZn.

### **6.5.1. Determinación de la actividad de la SOD-total**

Reactivos que vienen con el kit:

- Sustrato mixto (Xantina 0.05 mmol/L + I.N.T. 0.025 mmol/L).
- Tampón (Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico (CAPS) 40 mmol/L, pH 10.2 + EDTA 0.94 mmol/L).
- Xantina Oxidasa (XO) (80 U/L).
- Patrón (según valor específico por cada lote).

Se prepara la curva patrón desde 5 hasta 0.2 U/mL. Se toma una placa de 96 pozos y se colocan 7  $\mu$ L, por duplicado, de las diferentes concentraciones del patrón o de las muestras o del blanco (solución tampón). Se adicionan 238  $\mu$ L del sustrato mixto. Se incuban la placa y la XO a 37°C en agitación (600 rpm) y una vez atemperadas se añaden 35  $\mu$ L por pozo de la XO. A los 30 seg se realiza una primera lectura a 505 nm y una segunda a los 3 min, con igual longitud de onda. Seguidamente calculamos el incremento de la absorbancia por min para cada muestra (incluidos patrón y blanco). Luego se determina el % de inhibición y se representa en una recta el de cada patrón frente al  $\log_{10}$  de la concentración del patrón en U/mL. La concentración de la SOD-total de cada muestra se calcula interpolando el valor del % de inhibición de cada una en la recta que se obtiene de la curva patrón.

### **6.5.2. Determinación de la actividad de la SOD-Mn**

Se realiza el mismo procedimiento que para la determinación de la SOD-total pero en el paso previo a añadir la XO se añaden, solo a cada pozo de las muestras, 10  $\mu$ L de KCN 500  $\mu$ M para inhibir la SOD-CuZn. Los cálculos se realizan de la misma manera que para la SOD-total.

### **6.6. Determinación de los niveles de lípidos oxidados**

La oxidación lipídica fue medida utilizando el kit de determinación de LPO de Calbiochem (EMD Biosciences Inc., Darmstadt, Germany). Este kit se basa en que los hidroperóxidos son altamente inestables y reaccionan rápidamente con iones ferrosos

para producir iones férricos. La formación de estos iones se detecta a 500 nm, por un cambio de coloración, utilizando iones tiocianatos como cromógenos.

Reactivos que vienen con el kit:

- Extracto R (sólido cristalino).
- Cromógeno FTS1 (4.5 mM sulfato ferroso en 0.2 M HCL) y FTS2 (3 % tiocianato de amonio en metanol).
- Patrón (50  $\mu$ M 13-HpODE en etanol).

Reactivos que no vienen con el kit:

- Metanol puro y desoxigenado (30 min mediante burbujeo con nitrógeno).
- Cloroformo desoxigenado (30 min mediante burbujeo con nitrógeno).
- Agua grado Milli-Q.

#### **6.6.1. Extracción de los LPO de la muestra**

Se prepara una solución saturada de extracto R en metanol (100 mg en 15 mL aproximadamente) y se agita mediante vórtex durante 2 min. Esta solución se deberá utilizar durante las próximas dos horas de preparada. Los 100  $\mu$ L de muestra obtenidos de la homogenización de la corteza (explicado en el paso 6.1) se diluyen 1:3 en agua Milli-Q. A este homogenado se le añade un volumen equivalente del extracto R. Se agita mediante vórtex y se añade 1 mL de cloroformo desoxigenado. Se vuelve a agitar y se centrifuga a 1500 x g 5 min a 0 °C. Se toma la capa inferior, donde se encuentran los LPO en el cloroformo desoxigenado.

#### **6.6.2. Medición de los LPO**

Se mezclan 2 volúmenes de cloroformo desoxigenado con uno de metanol desoxigenado. Se prepara la curva patrón desde 0.5 a 5 nmol diluida en la mezcla 2:1 de cloroformo-metanol. Se añaden, por duplicado, 950  $\mu$ L de cada una de las concentraciones de la curva patrón y 350  $\mu$ L de las muestras en eppendorf de 2 mL o en tubos de cristal bien limpios y secos que se puedan cerrar herméticamente. Seguidamente se adicionan 600  $\mu$ L de la mezcla 2:1 cloroformo-metanol a cada tubo de las muestras. Se prepara el cromógeno mezclando volúmenes iguales de FTS1 y FTS2, se agita bien y se adicionan 50  $\mu$ L a cada uno de los tubos de la curva patrón y de las muestras. Se agita mediante vórtex y se incuba a TA durante 5 min. Medimos la

absorbancia de cada tubo en cubeta de cuarzo o de cristal a 500 nm. Se utiliza la mezcla 2:1 de cloroformo-metanol como blanco del ensayo.

### **6.6.3. Cálculos de los resultados**

Se calculan los promedios de las absorbancias y se sustrae el blanco, de todos los patrones y de las muestras. Se traza la recta con las absorbancias corregidas de la curva patrón y se hallan los *nmol* de cada una de las muestras, interpolando los valores de sus absorbancias corregidas con el blanco. Finalmente se calcula la concentración de LPO considerando que:

$$\text{Concentración de LPO } (\mu\text{M}) = (\text{nmol} / \text{VE}) \times (1 \text{ mL} / \text{VS})$$

donde,

VE: Volumen del extracto utilizado para el ensayo

VS: Volumen de la muestra que se utilizó para realizar la extracción

### **6.7. Determinación del Glutati6n total**

Este método se basa en que el GSH es oxidado mediante el ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DNTB) con la formación estequiométrica del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). El rango de formación de este compuesto es proporcional al GSH total (la suma de GSH + GSSG) ya que el GSSG presente en la muestra es reducido por la adición de GR y NADPH.

Soluciones que se utilizan en esta técnica:

- Tamp6n fosfato s6dico (TFS) (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 1mM EDTA, pH 7.5 en agua Milli-Q).
- NADPH 1mM (en TFS).
- DNTB 1mM (en TFS).
- 6cido sulfosalic6lico (SSA) 3.3% (en HCl 10 mM).
- Trietanolamina (TEA) 50 % en agua Milli-Q.
- GSH 0.6 mM (en SSA 3.3 %).
- 20 U de GR.



Se prepara una curva patrón con GSH desde 5 hasta 100  $\mu\text{M}$  en SSA 3.3 %. Se separan 100  $\mu\text{L}$  de cada concentración de la curva y de SSA 3.3 % para utilizarlo como blanco. Del homogenado de las muestras (ver paso 6.1) tomamos 20  $\mu\text{L}$  y hacemos una dilución 1:5 en SSA 3.3 %. Se adicionan 9  $\mu\text{L}$  de TEA a cada tubo del patrón y de las muestras para neutralizar. Seguidamente medimos pH que debe estar entre 6-7 para que las muestras y el patrón estén óptimos. Se prepara una mezcla con 2.8 mL de DNTB, 3.75 mL de NADPH, 5.844 mL de tampón fosfato sódico y 20 U de GR. En una placa de 96 pozos se añaden, por duplicado, 50  $\mu\text{L}$  de los patrones, del blanco o de las muestras. Se incuba la placa en el espectrofotómetro a 30 °C y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla, lo más rápido posible. Leemos la cinética de formación del TNB a 405 nm cada 15 seg durante 5 min, en agitación a 600 rpm. Los *nmol* totales de GSH en 50  $\mu\text{L}$  se calculan interpolando el valor de la absorbancia de cada muestra en la recta que se obtiene de la curva patrón preparada con diferentes concentraciones de GSH.

#### **6.8. Determinación del GSSG**

Esta determinación se basa en la misma reacción que para determinar el GSH total pero en este caso el GSH que hay en la muestra se neutraliza haciéndolo reaccionar con 2-vinilpiridina (VP). Se emplean las mismas soluciones que para la determinación de GSH total pero utilizamos GSSG 0.6 mM (en SSA 3.3 %) para preparar la curva patrón. Una vez que tenemos separados 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones de la curva patrón, del blanco y de las muestras, añadimos 2  $\mu\text{L}$  de VP a cada tubo, agitamos mediante vórtex y dejamos reposar 3 min. Se neutraliza con 9  $\mu\text{L}$  de TEA y medimos pH que, para que la muestra esté en condiciones óptimas, debe estar entre 6-7. Se colocan 50  $\mu\text{L}$ , por duplicado, de cada patrón, blanco o de las muestras en una placa de 96 pozos. Se incuba a 30 °C en el espectrofotómetro y se mide la cinética de formación del TNB a 405 nm cada 15 seg durante 5 min, en agitación a 600 rpm. Los cálculos se realizan igual que para el GSH total.

#### **6.9. Determinación del GSH**

Para la determinación del GSH se procedió a restar 2 veces el valor de GSSG del GSH total, debido a que en la determinación del GSH total por cada molécula de GSSG se produjeron 2 de GSH. Se determinó también la razón del GSH y el GSSG como índice del estado del estrés oxidativo cerebral.

## **7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT**

Con el western blot, en primer lugar, las proteínas son separadas por su peso molecular, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren del gel a una membrana que puede ser de celulosa o de PVDF (de Polyvinylidene fluoride), mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular. Seguidamente las membranas son incubadas con anticuerpos específicos para las proteínas que se quieren detectar (anticuerpo primario). Luego las membranas son lavadas para eliminar el exceso de anticuerpo primario e incubadas con un anticuerpo específico al anticuerpo primario (anticuerpo secundario). Este anticuerpo secundario lleva unido una enzima peroxidasa que se revela mediante una reacción de quimioluminiscencia. La intensidad de la señal de cada reacción se cuantifica por densitometría.

### **7.1. Extracción de proteínas totales**

Los hipocampos fueron sonicados (3 veces por 5 seg en frío) en tampón RIPA (de ristocin-induced platelet agglutination buffer) a razón de 10 mg/ 150  $\mu$ L. El tampón RIPA se preparó con 0.1 % de duodecil sulfato sódico (SDS), 0.5 % de deoxicolato sódico, 1 % de Igepal AC-630 disuelto en 10 mM de PBS y se le añadió el cóctel de inhibidores de proteasas (Complete; Boehringer Mannheim) y el inhibidor de fosfatasa ortovanadato de sodio (NaVa) a 1 mM.

Una vez realizada la sonicación se realizó una centrifugación a 12 500 g durante 20 min a 4 °C y se tomó el sobrenadante. Con una pequeña alícuota se realizó la determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford, ya explicado, y el resto se utilizó para la determinación de la expresión de proteínas específicas por el método de western blot.

### **7.2. Western blot**

Soluciones que se utilizaron en esta técnica:

- Solución 1: 0.75 M Tris-base, pH 8.8 con HCl, 0.2 % SDS.
- Solución 2: Acrilamida 30 % /Bis solución, 37, 5:1 (BioRad).
- Solución 3: 0.25 Tris base, ajustar a pH 6.8, 0.2 % SDS en agua Milli-Q.
- Persulfato amónico 13 % (PSA).
- TEMED: TEMED (Sigma).

- Tampón de electroforesis: 25 mM Tris-base, 192 mM glicina en agua destilada, 0.1 % SDS.
- Tampón de transferencia: 25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 20 % v/v metanol en agua destilada.
- Tampón de carga: 0.5 M NaPi (pH 7) = 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 % glicerol, 4 % SDS, 10 % DTT (2,4-ditiotrietol), 0.05 % de azul de bromofenol en agua destilada.
- Tampón T-TBS: 0.02 M Tris HCl, ajustar a pH 7.5, 0.150 M NaCl, 0.05 % Tween 20 en agua destilada.

### **7.2.1. Preparación de las muestras**

Una vez conocida la concentración de proteínas de las muestras se calcula el volumen necesario para cargar 30 µg de proteínas. Se igualan los volúmenes de todas las muestras a la de mayor cantidad, adicionando agua Milli-Q. Añadimos tampón de carga y se hierven las muestras en un termobloc a 100 °C durante 5 min.

### **7.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Para estos experimentos se utilizó el sistema de mini-geles Mini-Protean 3 de BioRad. Los cristales, previamente desengrasados con etanol al 70 %, se montan en su soporte. Se prepara la solución del gel de acrilamida en función de la concentración deseada. Los reactivos necesarios para el gel de separación de poliacrilamida (para 2 geles) así como su proporción se muestran en la tabla 6.

Justo después de añadir el TEMED y el PSA la mezcla se introduce entre los dos vidrios, dejando 1.5-2 cm libres en la parte superior. Se deja polimerizar durante unos 20 minutos. Añadimos una capa de agua Milli-Q para que la parte superior del gel quede recta. Una vez el gel polimeriza esta capa de agua se retira y se seca cuidadosamente con papel de filtro. Se añade el gel separador (stacking) y rápidamente se colocan los peines que formarán los pocillos.

Una vez que el gel ha polimerizado se coloca en la cubeta de electroforesis que se llena del tampón de electroforesis. Seguidamente las muestras se cargan en el gel utilizando una jeringa Hamilton. En cada gel se carga un pocillo con el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, BioRad) que nos puede servir para orientarnos con la posición de las muestras.

### 7.2.3. Transferencia

Cuando termina la electroforesis se transfieren las proteínas del gel hacia una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore), cortada previamente a la medida del gel. Primeramente humedecemos la membrana con metanol durante 60 seg para activarla y luego se equilibra dejándola 60 seg más en tampón de transferencia. Se procede a preparar un “sandwich” con los soportes de transferencia, poniendo desde afuera hacia adentro las esponjas, luego el papel Whatman y en el centro la membrana directamente en contacto con el gel. Esto se introduce en una cubeta con tampón de transferencia y un contenedor con hielo. La transferencia se hace en frío, durante 90 min a 100 vatios, generalmente. El tiempo o los vatios varían según se deseen detectar proteínas de mayor o menor peso molecular (Tabla 7).

Tabla 6. Reactivos necesarios para el gel de separación de poliacrilamida así como su proporción (entre paréntesis la cantidad para 2 geles).

	6%	8%	10%	12%	15%	stacking
<b>Solución 1</b>	<b>4ml (6)</b>	<b>4ml (6)</b>	<b>4ml (6)</b>	4ml (6)	<b>4ml (6)</b>	-
<b>Solución 2</b> <b>(acrilamida 30%)</b>	<b>1'6ml</b> (2'4ml)	<b>2'16ml</b> (3'24ml)	<b>2'68ml</b> (4'02ml)	<b>3'2ml</b> (4'8 ml)	<b>4ml</b> (6 ml)	<b>0'225ml</b> (0'45 ml)
<b>Solución 3</b>	-	-	-	-	-	<b>0'975 ml</b> (1'95 ml)
<b>Agua Milli-Q</b>	<b>2'4 ml</b> (3'6ml)	<b>1'84 ml</b> (2'76ml)	<b>1'32 ml</b> (1'98ml)	<b>0'8ml</b> (1'2ml)	-	<b>0'775 ml</b> (1'55)
<b>TEMED</b>	<b>10ul (20)</b>	<b>10ul (20)</b>	<b>10ul (20)</b>	<b>10ul (20)</b>	<b>10ul (20)</b>	<b>5ul (10)</b>
<b>PSA</b>	<b>40ul (60)</b>	<b>40ul (60)</b>	<b>40ul (60)</b>	<b>40ul (60)</b>	<b>40ul (60)</b>	<b>20ul (40)</b>
<b>Volumen Total</b>	<b>8ml (12)</b>	<b>8ml (12)</b>	<b>8ml (12)</b>	<b>8ml (12)</b>	<b>8ml (12)</b>	<b>2ml (4)</b>

### 7.2.4. Detección Inmunológica

Activamos la membrana transferida con metanol durante 1 min y lavamos con T-TBS 2 x 10 min. Para bloquear las uniones inespecíficas incubamos durante 1 h a TA con solución de bloqueo (15 mL de T-TBS con 0.75 g de leche en polvo). Después se lava la membrana 2 x 10 min con T-TBS para eliminar restos de leche.

Se prepara la solución de incubación del anticuerpo primario al 1% de leche (0.04 g de leche en polvo en 4 mL de T-TBS) y se añade el anticuerpo primario dependiendo de la dilución a utilizar. Se incuba en agitación, a 4 °C, durante toda la noche. Al día siguiente se lava con T-TBS para eliminar el exceso de anticuerpo, 3 x10 min. A continuación se prepara la solución de incubación del anticuerpo secundario de igual

manera que para el primario y se incubaba durante 1 h a TA. Se lava con T-TBS para eliminar el exceso de anticuerpo, 3 x 10 min.

### 7.2.5. Detección y densitometría

La membrana se incubaba durante 1 min con solución de revelado y se toman algunas fotos de la reacción quimioluminescente en el Versadoc mediante el software Quantity One (BioRad) que también se emplea para la densitometría. Los valores de densidad de cada banda de la proteína en estudio se guardan en un fichero y luego se realiza el cociente entre el valor densitométrico que nos dio la banda correspondiente a esta proteína y el de la proteína control de carga como la  $\beta$ -tubulina o la GAPDH.

Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de western blot. Condiciones de la electroforesis y de la transferencia para 30  $\mu$ g de proteínas.

Anticuerpo primario	Dilución de trabajo	% del gel y transferencia	Casa comercial
Mouse monoclonal P-CREB	1:800	Gel 8 %. 1 h de transf a 100 V	Cell Signalling
Rabbit polyclonal GDNF	1:1000	Gel 12 %. 1 h de transf a 100 V	Santa Cruz
Mouse monoclonal GAPDH	1:3000	Gel 8, 10, 12, 15 %. 1 h de transf a 100 V	Stressgen
Rabbit polyclonal NMDA-R2B	1:500	Gel 8 %. 1:30 h de transf a 100 V	Millipore
Rabbit polyclonal P-Sinapsina	1:1000	Gel 10 %. 1h de transf a 100 V	Cell Signalling
Rabbit polyclonal Sinaptofisina	1:5000	Gel 10 %. 1h de transf a 100 V	Dako
Mouse monoclonal $\beta$ -tubulina	1:50000	Gel 8, 10, 12, 15 %. 1h de tranf a 100 V	SIGMA

Tabla 8. Anticuerpos secundarios utilizados en los experimentos de western blot

Anticuerpo secundario	Dilución de trabajo	Casa comercial
Anti- Mouse Ig peroxidase linked antibody	1:2000	Sigma Chemical
Anti- rabbit Ig peroxidase linked antibody	1:2000	Sigma Chemical

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se procesaron mediante el programa GraphPad Prism 4 y se analizaron estadísticamente por procedimientos de ANOVA seguido de una prueba de Newman-Keuls o de un Bonferroni posttests. Cuando no encontramos diferencias estadísticas debido a la dispersión de los resultados, a pesar de la consistencia de las medias, se realizó una comparación mediante el Student's test.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

---

## **CAPÍTULO 1. VALOR PREVENTIVO Y TERAPÉUTICO DEL EJERCICIO FÍSICO VOLUNTARIO EN ETAPAS TEMPRANA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN EL RATÓN 3xTg-AD**

### **1. RESULTADOS**

En este experimento utilizamos ratones machos y hembras, NTg y 3xTg-AD, que a los 3 ó 6 meses de edad se expusieron a 1 mes de EF voluntario. Además, se utilizaron ratones que con 1 mes de edad se expusieron a 6 meses de EF. Estos grupos fueron analizados contra sus respectivos controles sedentarios en cuanto sus patrones sensoriales, motores, conductuales y cognitivos. Se determinó el estado de estrés oxidativo cerebral, utilizando una muestra de corteza, y una muestra de hipocampo para determinar la variación de la expresión proteica relacionada con la función cognitiva y con el EF.

#### **1.1. Distancia recorrida en la rueda de actividad**

La distancia promedio total recorrida por cada ratón, durante el tiempo de exposición a la rueda de actividad, se estimó según el número de los ratones en cada caja y los recuentos totales de cada rueda (Figura 9). Los grupos de ratones 3xTg-AD de ambos sexos y edades, con una exposición a la rueda de 1 mes, mostraron un mayor nivel de actividad que sus controles NTg. Se produjo un efecto del genotipo y sexo (ANOVA, genotipo  $F_{(3,72)}=26.69$ ,  $P<0.0001$ ; sexo  $F_{(1,72)}=101.5$ ,  $P<0.0001$ ). Sin embargo, se alcanzó igual distancia para cada sexo y genotipo en ambas edades (4 meses y 7 meses) con el tratamiento de 1 mes de EF (Figura 9 A). Cuando el tratamiento fue de 6 meses de duración no se apreciaron diferencias entre los dos genotipos pero sí entre los sexos (ANOVA, sexo  $F_{(1,34)}=222.8$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 9 B).

#### **1.2. Función sensorial-motora**

Los ratones 3xTg-AD a estas edades no presentaron afectaciones sensoriales y mostraron buena coordinación y equilibrio. En ambos genotipos y sexos el EF mejoró la función motora (Tablas 9A, 9B, 9C, 9D).



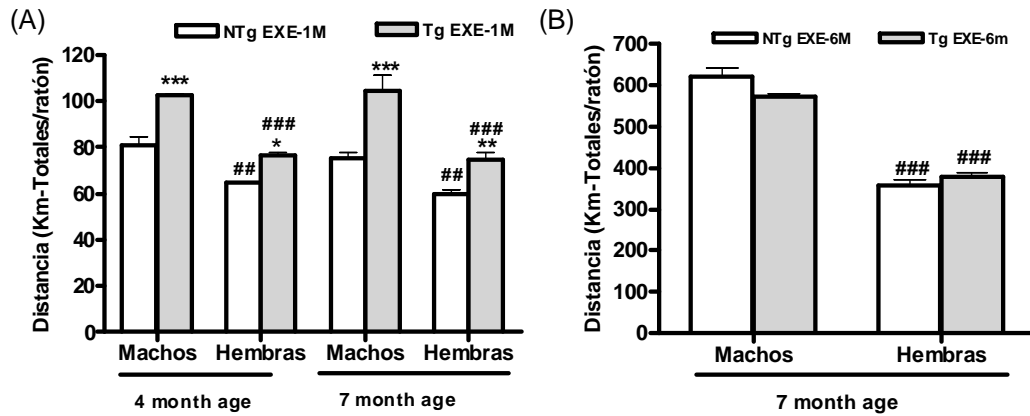


Figura 9. Distancia en la rueda de actividad. (A) Se aprecia un efecto del genotipo y del sexo a los 4 y 7 meses de edad con un mes de EF. (B) Después de 6 meses de EF solo se apreció un efecto del sexo. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: Two-way ANOVA Bonferroni posttests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparando NTg EXE-1M al Tg EXE-1M de su edad y sexo; ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , comparado los sexos de un mismo genotipo y edad.

Tabla 9A. El EF produjo efectos beneficiosos sobre la función motora en machos NTg y 3xTg-AD de 4 meses de edad.

	M NTg SED (n=10)	M NTg EXE (n=10)	M Tg SED (n=10)	M Tg EXE (n=10)
<b>Función sensorial y motora</b>				
<i>Prueba de reflejos</i>				
Incidencia de ambos reflejos	10/10	9/10	10/10	10/10
<i>Varilla de madera</i>				
Equilibrio (permanencia, s)	17.8 $\pm$ 0.1	18.7 $\pm$ 0.6	19.2 $\pm$ 0.4*	20.0 $\pm$ 0.0***
Coordinación (distancia, cm)	0.3 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.2***	0.6 $\pm$ 0.1	5.4 $\pm$ 0.1***, ###
<i>Varilla de metal</i>				
Equilibrio (permanencia, s)	3.2 $\pm$ 0.3	8.4 $\pm$ 1.8	7.0 $\pm$ 1.8	14.8 $\pm$ 3.0***, #
Coordinación (distancia, cm)	0 $\pm$ 0	0.8 $\pm$ 0.0***	0.1 $\pm$ 0.0***	1.6 $\pm$ 0.0***, ###
<i>Cuerda de metal (2 ensayos 5s)</i>				
Fuerza (latencia de caída, s)	3.6 $\pm$ 0.0	3.9 $\pm$ 0.1*	4.4 $\pm$ 0.1***	4.5 $\pm$ 0.0***
Coordinación (distancia, cm)	0.5 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0**	1.5 $\pm$ 0.2***	0.8 $\pm$ 0.1*, ###
Elementos de soporte (n)	1.5 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.0	2.1 $\pm$ 0.0***	2.1 $\pm$ 0.1***
<i>Cuerda de metal (1 ensayo 60s)</i>				
Fuerza (latencia de caída, s)	21.0 $\pm$ 7.2	15.8 $\pm$ 5.8	50.3 $\pm$ 6.7*	48.3 $\pm$ 6.1**
Coordinación (distancia, cm)	1.8 $\pm$ 0.8	1.2 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.6	3.6 $\pm$ 0.8
Elementos de soporte (n)	2.0 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.3

Nota: Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparados al NTg SED; ### $p < 0.001$  Tg EXE comparado al Tg SED.

Tabla 9B. Efecto beneficioso del EF sobre la función motora de ratones hembras NTg y 3xTg-AD de 4 meses de edad.

	F NTg (n=10)	F NTg EXE (n=10)	F Tg SED (n=10)	F Tg EXE (n=10)
<b>Función sensorial y motora</b>				
<i>Prueba de reflejos</i>				
Incidencia de ambos reflejos	9/10	10/10	9/10	10/10
<i>Varilla de madera</i>				
Equilibrio (permanencia, s)	17.6± 0.2	18.9± 0.5*	19.1± 0.4*	20.0± 0.0***
Coordinación (distancia, cm)	0.2± 0.0	1.6± 0.1***	1.7± 0.1***	6.5± 0.0***,###
<i>Varilla de metal</i>				
Equilibrio (permanencia, s)	4.5± 1.1	8.3± 1.1	12.8± 2.2*	17.9± 3.2***
Coordinación (distancia, cm)	0± 0	0± 0	0.6± 0.0***	1.5± 0.2***,###
<i>Cuerda de metal (2 ensayos 5s)</i>				
Fuerza (latencia de caída, s)	3.5± 0.2	3.0± 0.2	4.6± 0.0***	4.6± 0.1***
Coordinación (distancia, cm)	0.5± 0.1	0.5± 0.2	1.2± 0.1***	0.6± 0.1###
Elementos de soporte (n)	1.2± 0.1	0.8± 0.1*	2.0± 0.0***	2.2± 0.1***
<i>Cuerda de metal (1 ensayo 60s)</i>				
Fuerza (latencia de caída, s)	17.4± 6.0	19.2± 8.9	48.2± 6.1*	48.4± 7.7*
Coordinación (distancia, cm)	1.3± 0.5	0.9± 0.5	2.0± 0.5	1.9± 0.5
Elementos de soporte (n)	1.6± 0.4	0.9± 0.5	2.8± 0.3*	2.6± 0.2*

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg SED; ### p<0.001 Tg EXE comparado al TgSED.

Tabla 9C. El EF produjo efectos beneficiosos sobre la función motora en machos NTg y 3xTg-AD de 7 meses de edad.

	M NTg SED (n=21)	M NTg EXE-1M (n=10)	M NTg EXE-6M (n=9)	M Tg SED (n=14)	M Tg EXE-1M (n=10)	M Tg EXE-6M (n=8)
<b>Función sensorial y motora</b>						
<i>Prueba de reflejos</i>						
Incidencia de ambos reflejos	21/21	10/10	9/9	14/14	10/10	8/8
<i>Varilla de madera</i>						
Equilibrio (permanencia, s)	10.0± 1.3	12.7± 1.6	11.8± 1.9	18.3± 0.1***	18.6± 1.4***	20.0± 0.0***
Coordinación (distancia, cm)	0.2± 0.1	0.6± 0.3	0.3± 0.2	1.5± 0.7	4.5± 1.1***, ##, %	6.8± 1.5***, ###
<i>Varilla de metal</i>						
Equilibrio (permanencia, s)	0.8± 0.1	1.5± 0.5	1.4± 0.5	1.7± 0.4	6.3± 2.3**, ##	4.6± 2.0
Coordinación (distancia, cm)	0± 0	0± 0	0± 0	0.03± 0.03	1.0± 0.7*, ##	0.3± 0.2
<i>Cuerda de metal (2 ensayos 5s)</i>						
Fuerza (latencia de caída, s)	1.0± 0.3	1.8± 0.6	1.3± 0.5	2.6± 0.5	1.9± 0.4	2.5± 0.7
Coordinación (distancia, cm)	0± 0	0.1± 0.1	0± 0	0.8± 0.2**	0.3± 0.1 <sup>#</sup>	0.2± 0.1 <sup>#</sup>
Elementos de soporte (n)	1.1± 0.0	1.1± 0.1	1.1± 0.1	1.7± 0.2**	1.5± 0.2	1.6± 0.2
<i>Cuerda de metal (1 ensayo 60s)</i>						
Fuerza (latencia de caída, s)	1.9± 0.7	0.7± 0.2	4.5± 2.7	17.1± 6.6	21.8± 8.1	22.0± 9.4
Coordinación (distancia, cm)	0.1± 0.1	0± 0	0.6± 0.5	3.2± 1.2	2.8± 1.0	2.8± 1.4
Elementos de soporte (n)	1.3± 0.2	1.0± 0.0	1.4± 0.3	2.1± 0.2*	2.5± 0.3**	2.3± 0.3*

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg SED; <sup>#</sup>p<0.05, <sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.01 Tg EXE comparado al Tg SED. <sup>%</sup>p<0.05 comparados los EXE-1M a los EXE-6M en cada genotipo.

Tabla 9D. Efecto beneficioso del EF sobre la función motora de ratones hembras NTg y 3xTg-AD de 7 meses de edad.

	F NTg SED (n=14)	F NTg EXE-1M (n=10)	F NTg EXE-6M (n=13)	F Tg SED (n=14)	F Tg EXE-1M (n=10)	F Tg EXE-6M (n=8)
<b>Función sensorial y motora</b>						
<i>Prueba de reflejos</i>						
Incidencia de ambos reflejos	13/14	10/10	12/13	13/14	9/10	8/8
<i>Varilla de madera</i>						
Equilibrio (permanencia, s)	14.8± 1.8	12.5± 2.4	16.6± 1.7	19.4± 0.6	20.0± 0.0	18.8± 1.3
Coordinación (distancia, cm)	0.1± 0.0	0.6± 0.4	1.7± 0.3	1.1± 0.6	3.1± 0.6***, #	3.4± 0.9***, ##
<i>Varilla de metal</i>						
Equilibrio (permanencia, s)	1.6± 0.4	4.3± 1.9	3.5± 0.6	5.9± 1.4	8.5± 1.0**	9.8± 2.3**
Coordinación (distancia, cm)	0.03± 0.03	0.1± 0.1	0± 0	0± 0	0.5± 0.4	0.1± 0.1
<i>Cuerda de metal (2 ensayos 5s)</i>						
Fuerza (latencia de caída, s)	3.4± 1.0	1.2± 0.4	3.9± 2.1	4.0± 0.3	4.3± 0.5	3.0± 0.6
Coordinación (distancia, cm)	0± 0	0.2± 0.2	0.03± 0.0	0.5± 0.2	1.0± 0.2***	0.5± 0.3
Elementos de soporte (n)	1.5± 0.2	1.2± 0.2	1.5± 0.2	1.9± 0.1	2.1± 0.2	1.9± 0.1
<i>Cuerda de metal (1 ensayo 60s)</i>						
Fuerza (latencia de caída, s)	4.0± 1.6	6.8± 5.9	5.5± 2.9	31.5± 6.4**	29.9± 8.7*	33.9± 10.0*
Coordinación (distancia, cm)	0.1± 0.0	0.4± 0.4	0.4± 0.2	2.9± 0.7**	2.7± 0.8*	3.9± 1.5**
Elementos de soporte (n)	1.5± 0.2	1.4± 0.3	1.8± 0.2	2.6± 0.2***	2.5± 0.2**	2.6± 0.3**

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg SED; #p<0.05, ##p<0.01 Tg EXE comparado al TgSED.

### 1.3. Función inmuno-endocrina

Los machos 3xTg-AD de 4 meses presentaron el peso corporal más elevado que los NTg (ANOVA, inicio experimento  $F_{(3,36)}=8.878$   $P=0.0175$ ; final experimento  $F_{(3,36)}=6.331$ ,  $P<0.001$ ). Este mismo patrón también lo observamos en los de 7 meses de edad (ANOVA, semana 1,  $F_{(5,66)}=6.126$ ,  $P=0.0001$ ; semana 20,  $F_{(5,66)}=9.930$ ,  $P<0.0001$ ; semana 25,  $F_{(5,66)}=11.97$ ,  $P<0.0001$ ). En los machos de 7 meses de edad se observó un efecto general del ejercicio (ANOVA,  $F_{(2,66)}=5.410$ ,  $P=0.0067$ ) pero de forma más marcada en los grupos NTg. En las hembras no se observaron diferencias significativas entre los grupos sedentarios. No obstante en las hembras de 7 meses, al igual que en los machos, se observó que el EF había contribuido a disminuir el peso corporal (ANOVA, semana 20,  $F_{(5,63)}=11.49$ ,  $P<0.0001$ ; semana 25,  $F_{(5,63)}=7.191$ ,  $P<0.0001$ ). En ellas también el efecto del EF fue independiente del genotipo (ANOVA,  $F_{(2,63)}=15.30$ ,  $P<0.0001$ ), aunque el mayor efecto se produjo después de 6 meses de tratamiento. Por otra parte, en los ratones 3xTg-AD de ambos sexos se encontró aumentado el porcentaje de aportación del bazo al peso corporal (ANOVA, machos 4 meses:  $F_{(3,36)}=19.47$ ,  $P<0.0001$ ; hembras 4 meses:  $F_{(3,36)}=11.71$ ,  $P<0.0001$ ; machos 7 meses:  $F_{(5,66)}=5.355$ ,  $P=0.0003$ ), aunque en las hembras de 7 meses no fue significativo (Tablas 10A, 10B, 10C, 10D).

Tabla 10A. Función inmuno-endocrina en machos NTg y 3xTg-AD de 4 meses de edad.

	M NTg SED (n=10)	M NTg EXE (n=10)	M Tg SED (n=10)	M Tg EXE (n=10)
<b>Peso Corporal</b>				
Inicio semana 1 (g)	21.1± 0.3	21.1± 0.5	24.6± 0.8*	24.3± 0.8*
Final semana 5 (g)	23.6± 0.3	21.2± 2.3	27.5± 0.5**	27.5± 0.6**
WAT (% respecto peso corporal)	1.0± 0.1	0.8± 0.1	1.2± 0.1	1.1± 0.1
Adrenales (% respecto peso corporal)	0.04± 0.00	0.03± 0.00	0.04± 0.0	0.04± 0.00
Bazo (% respecto peso corporal)	0.26± 0.01	0.26± 0.01	0.32± 0.01***	0.34± 0.01***
Timo (% respecto peso corporal)	0.15± 0.01	0.15± 0.01	0.14± 0.01	0.14± 0.01
BAT (% respecto peso corporal)	0.46± 0.03	0.41± 0.04	0.39± 0.02	0.44± 0.04

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  comparados al NTg SED.

Tabla 10B. Función inmuno-endocrina en hembras NTg y 3xTg-AD de 4 meses de edad.

	F NTg (n=10)	F NTg EXE (n=10)	F Tg SED (n=10)	F Tg EXE (n=10)
<b>Peso Corporal</b>				
Inicio semana 1 (g)	18.0± 0.3	17.7± 0.5	19.4± 0.9	19.2± 0.4
Final semana 5 (g)	20.0± 0.3	20.4± 0.5	21.5± 0.8	21.3± 0.6
WAT (% respecto peso corporal)	0.7± 0.1	0.9± 0.3	1.1± 0.2	0.8± 0.1
Adrenales (% respecto peso corporal)	0.05± 0.00	0.04± 0.00	0.05± 0.00	0.05± 0.00
Bazo (% respecto peso corporal)	0.34± 0.01	0.31± 0.01	0.46± 0.04***	0.46± 0.02**
Timo (% respecto peso corporal)	0.25± 0.01	0.22± 0.02	0.19± 0.01	0.21± 0.00
BAT (% respecto peso corporal)	0.52± 0.05	0.38± 0.04	0.41± 0.03	0.42± 0.04

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg SED; #### p<0.001 Tg EXE comparado al TgSED.

#### 1.4. Patrones conductuales

Al evaluar los patrones conductuales encontramos que el EF produjo diferentes respuestas en los ratones NTg sanos y en los 3xTg-AD. El EF contribuyó beneficiosamente a la recuperación de los patrones conductuales afectados, aunque a los 4 meses de edad se encontraron pocas afectaciones. En los ratones 3xTg-AD de ambos sexos se observaron más afectaciones conductuales a los 7 meses de edad. La exposición de estos ratones al tratamiento de EF produjo un mejor resultado cuando se comenzó con un mes de edad por un período de 6 meses. Debido a la dispersión de los resultados no encontramos diferencias estadísticas en algunas de las evaluaciones conductuales realizadas (ver Tablas 11A, 11B, 11C y 11D).



Tabla 10C. Efecto del EF sobre la función inmuno-endocrina de ratones machos NTg y 3xTg-AD de 7 meses de edad.

	M NTg SED (n=21)	M NTg EXE-1M (n=10)	M NTg EXE-6M (n=9)	M Tg SED (n=14)	M Tg EXE-1M (n=10)	M Tg EXE-6M (n=8)
<b>Peso Corporal</b>						
Inicio semana 1 (g)	20.9± 0.2	20.9± 0.2	21.0± 0.4	22.8± 0.5**	22.3± 0.3	22.0± 0.4
Inicio semana 20 (g)	30.1± 0.4	29.2± 0.7	29.7± 0.5	31.8± 0.4**	33.4± 0.5**	29.1± 0.6 <sup>##</sup> , %%%
Final semana 25 (g)	32.4± 0.6	28.0± 0.7***	31.0± 0.3 <sup>%%%</sup>	33.0± 0.5	33.9± 0.4	31.5± 0.3 <sup>%%</sup>
WAT (% respecto peso corporal)	1.5± 0.2	1.2± 0.1	1.1± 0.1	1.4± 0.2	1.2± 0.1*	1.3± 0.1
Adrenales (% respecto peso corporal)	0.05± 0.01	0.04± 0.00	0.05± 0.01	0.04± 0.00	0.03± 0.00	0.04± 0.00
Bazo (% respecto peso corporal)	0.29± 0.01	0.27± 0.01	0.35± 0.02*, %	0.33± 0.01*	0.37± 0.01**	0.37± 0.02*
Timo (% respecto peso corporal)	0.11± 0.00	0.10± 0.01	0.10± 0.01	0.09± 0.01	0.10± 0.01	0.10± 0.01
BAT (% respecto peso corporal)	0.45± 0.04	0.41± 0.03	0.51± 0.04	0.38± 0.04	0.40± 0.04	0.47± 0.05

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg SED; <sup>##</sup>p<0.01 Tg EXE comparado al Tg SED. <sup>%</sup>p<0.05, <sup>%%</sup>p<0.01, <sup>%%%</sup>p<0.001 comparados los EXE-1M a los EXE-6M en cada genotipo.

Tabla 10D. Efecto del EF sobre la función inmuno-endocrina de ratones hembras NTg y 3xTg-AD de 7 meses de edad.

	F NTg SED (n=14)	F NTg EXE-1M (n=10)	F NTg EXE-6M (n=13)	F Tg SED (n=14)	F Tg EXE-1M (n=10)	F Tg EXE-6M (n=8)
<b>Peso Corporal</b>						
Inicio semana 1 (g)	17.0± 0.6	17.1± 0.1	17.1± 0.3	17.8± 0.5	17.7± 0.2	17.6± 0.3
Inicio semana 20 (g)	26.1± 1.1	27.3± 0.9	21.6± 0.4***, %%%	25.0± 0.4	25.1± 0.7	20.5± 0.3***, ###, %%%
Final semana 25 (g)	26.7± 1.0	24.1± 0.5**	23.5± 0.3***	26.1± 0.3	23.1± 0.5***, ##	23.0± 0.3***, ##
WAT (% respecto peso corporal)	1.7± 0.5	0.9± 0.1	0.9± 0.1	1.8± 0.0	1.6± 0.2	0.9± 0.1
Adrenales (% respecto peso corporal)	0.07± 0.01	0.06± 0.00	0.07± 0.01	0.05± 0.01	0.05± 0.02	0.05± 0.01
Bazo (% respecto peso corporal)	0.34± 0.03	0.36± 0.01	0.35± 0.03	0.41± 0.04	0.43± 0.01	0.36± 0.03
Timo (% respecto peso corporal)	0.17± 0.00	0.16± 0.01	0.15± 0.01	0.14± 0.02	0.15± 0.01	0.13± 0.01
BAT (% respecto peso corporal)	0.50± 0.06	0.44± 0.03	0.50± 0.02	0.46± 0.07	0.40± 0.05	0.56± 0.1

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg SED; <sup>#</sup>p<0.05, <sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.001 Tg EXE comparado al Tg SED. <sup>%</sup>p<0.05, <sup>%%</sup>p<0.01, <sup>%%%</sup>p<0.001 comparados los EXE-1M a los EXE-6M en cada genotipo.



Tabla 11A. Afectaciones conductuales de los machos 3xTg-AD a los 4 meses de edad y su respuesta frente al tratamiento de EF voluntario

	M NTg (n=10)	M NTg EXE (n=10)	M Tg SED (n=10)	M Tg EXE (n=10)
<b>Neofobia</b>				
Actividad vertical (latencia, s)	13.0± 2.4	20.0± 2.9	21.8± 3.5	22.0± 2.5
Números de corner (n)	5.9± 0.6	4.5± 1.1	3.0± 0.6*	2.4± 0.6*
Actividad vertical (n)	3.5± 0.8	1.1± 0.5*	1.4± 0.7*	1.0± 0.3*
<b>Campo abierto</b>				
Latencia de movimiento (s)	<i>ver Figura 10 A</i>			
Actividad horizontal (latencia, s)	12.4± 6.4	6.2± 0.7	18.7± 5.9	19.7± 4.7
Entrada a periferia (latencia, s)	30.4± 11.6	15.7± 4.0	50.5± 28.4	59.4± 21.3
Actividad vertical (latencia, s)	22.3± 3.7	60.7± 23.5	50.6± 14.4	56.4± 21.3
Higiene (latencia, s)	149.1± 20.1	156.8± 21.4	192.0± 25.4	56.4± 20.4**,###
Actividad horizontal (n)	<i>ver Figura 10 C</i>			
Actividad vertical (n)	<i>ver Figura 10 E</i>			
Duración de la higiene (s)	5.6± 1.1	8.0± 2.5	6.8± 1.1	6.8± 1.5
Defecación (n)	2.6± 0.3	2.5± 0.5	3.2± 0.5	3.0± 0.4
<b>Caja oscura/iluminada</b>				
Salida al área blanca (latencia, s)	<i>ver Figura 11 A</i>			
Tiempo en área blanca (s)	105.6± 23.1	132.7± 22.5	146.0± 22.1	83.2± 16.7
Entradas al área blanca (n)	5.9± 0.9	4.6± 0.7	4.1± 0.6	4.6± 0.8
Defecación (n)	1.3± 0.4	1.6± 0.6	3.1± 0.5	1.5± 0.6
<b>Caja de 4 agujeros</b>				
Latencia de movimiento (s)	1.2± 0.5	2.2± 0.9	13.1± 6.2	10.1± 2.3
Primer agujero (latencia, s)	15.9± 3.2	52.6± 28.5	91.3± 36.8	45.0± 19.2
Cuatro agujeros (latencia, s)	211± 30.4	182.8± 30.8	237.2± 26.7	235.8± 29.2
Tiempo de exploración (s)	<i>ver Figura 12 A</i>			
Número de exploraciones (n)	14.9± 4.3	16.4± 3.1	11.0± 2.4	18.4± 2.7
Defecación (n)	2.8± 0.7	2.7± 0.5	3.5± 0.5	3.1± 0.5

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg SED; #p<0.05, ###p<0.001 Tg EXE comparado al Tg SED.

Tabla 11B. Afectaciones conductuales de las hembras 3xTg-AD a los 4 meses de edad y su respuesta frente al tratamiento de EF voluntario

	F NTg (n=10)	F NTg EXE (n=10)	F Tg SED (n=10)	F Tg EXE (n=10)
<b>Neofobia</b>				
Actividad vertical (latencia, s)	13.6± 2.2	14.4± 3.0	21.0± 2.0	16.6± 2.3
Números de corner (n)	6.7± 1.0	5.2± 0.9	4.7± 0.7	4.4± 0.7
Actividad vertical (n)	3.6± 0.9	1.5± 0.3*	1.3± 0.3*	2.0± 0.6
<b>Campo abierto</b>				
Latencia de movimiento (s)	<i>ver Figura 10 B</i>			
Actividad horizontal (latencia, s)	9.7± 1.6	26.2± 15.2	19.0± 4.5	14.0± 3.8
Entrada a periferia (latencia, s)	17.7± 4.4	30.5± 15.4	30.6± 6.4	21.6± 6.2
Actividad vertical (latencia, s)	47.8± 15.2	72.7± 25.9	42.4± 12.4	64.6± 25.4
Higiene (latencia, s)	143.2± 15.2	142.2± 24.5	166.4± 26.1	209.1± 21.1
Actividad horizontal (n)	<i>ver Figura 10 D</i>			
Actividad vertical (n)	<i>ver Figura 10 F</i>			
Duración de la higiene (s)	5.2± 1.5	7.5± 1.8	6.2± 1.7	5.3± 1.2
Defecación (n)	2.1± 0.4	2.4± 0.3	3.2± 0.7	2.3± 0.3
<b>Caja oscura/iluminada</b>				
Salida al área blanca (latencia, s)	<i>ver Figura 11 B</i>			
Tiempo en área blanca (s)	109.1± 12.6	89.2± 12.5	121.7± 26.7	91.2± 16.8
Entradas al área blanca (n)	6.8± 0.7	4.9± 0.6	5.7± 0.5	6.7± 0.8
Defecación (n)	1.0± 0.4	1.3± 0.4	1.0± 0.3	1.2± 0.4
<b>Caja de 4 agujeros</b>				
Latencia de movimiento (s)	1.4± 0.7	1.3± 0.5	9.5± 5.6	24.7± 7.11**,#
Primera agujero (latencia, s)	20.6± 3.9	11.2± 2.6	63.5± 22.6	80.8± 26.3
Cuatro agujeros (latencia, s)	175.7± 27.2	216.7± 30.6	249.0± 25.3	237.0± 27.1
Tiempo de exploración (s)	<i>ver Figura 12 B</i>			
Número de exploraciones (n)	15.9± 3.3	22.0± 2.3	9.9± 2.1	12.8± 2.4
Defecación (n)	3.3± 0.7	2.3± 0.5	2.8± 0.6	1.8± 0.5

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg SED; #p<0.05, ###p<0.001 Tg EXE comparado al Tg SED.

Tabla 11C. Afectaciones conductuales de los machos 3xTg-AD a los 7 meses de edad y su respuesta frente al tratamiento de EF voluntario

	M NTg SED (n=21)	M NTg EXE-1M (n=10)	M NTg EXE-6M (n=9)	M Tg SED (n=14)	M Tg EXE-1M (n=10)	M Tg EXE-6M (n=8)
<b>Neofobia</b>						
Actividad vertical (latencia, s)	15.8± 2.1	13.4± 4.2	21.9± 3.6	23.3± 2.4	26.2± 8.3	28.3± 1.8
Números de corner (n)	4.9± 0.6	2.6± 0.7	4.2± 0.8	2.4± 0.7	1.1± 0.4**	2.2± 0.5
Actividad vertical (n)	1.9± 0.3	2.0± 0.5	0.9± 0.4	0.9± 0.3	0.3± 0.2*	0.4± 0.4
<b>Campo abierto</b>						
Latencia de movimiento (s)	<i>ver Figura 10 A</i>					
Actividad horizontal (latencia, s)	4.4± 1.1	5.4± 1.5	22.8± 17.1	15.9± 5.5	32.4± 18.6	50.9± 32.5
Entrada a periferia (latencia, s)	31.7± 16.0	10.2± 3.6	70.8± 39.8	23.2± 5.8	44.5± 14.1	75.1± 38.6
Actividad vertical (latencia, s)	40.5± 13.8	87.0± 33.0	97.8± 41.2	36.6± 10.7	84.4± 32.7	91.1± 38.1
Higiene (latencia, s)	164.2± 13.0	137.6± 20.3	146.2± 16.1	225.0± 14.5	190.0± 15.6	214.3± 27.6
Actividad horizontal (n)	<i>ver Figura 10 C</i>					
Actividad vertical (n)	<i>ver Figura 10 E</i>					
Duración de la higiene (s)	8.1± 1.0	14.6± 3.1	12.2± 4.2	4.6± 0.7	9.7± 2.8	7.0± 1.4
Defecación (n)	1.9± 0.4	2.7± 0.3	1.7± 0.5	2.3± 0.6	3.0± 0.4	3.1± 0.5
<b>Caja oscura/iluminada</b>						
Salida al área blanca (latencia, s)	<i>ver Figura 11 A</i>					
Tiempo en área blanca (s)	133.9± 10.9	97.6± 32.4	139.3± 19.3	76.0± 18.6	84.2± 31.0	83.5± 23.1
Entradas al área blanca (n)	7.09± 0.6	2.9± 0.5**	7.4± 1.4	4.1± 0.8**	2.8± 0.5**	4.4± 0.9
Defecación (n)	0.6± 0.2	0.8± 0.5	0.8± 0.4	1.0± 0.4	0.7± 0.4	2.4± 0.5*
<b>Caja de 4 agujeros</b>						
Latencia de movimiento (s)	0.2± 0.2	0.0± 0.0	0.0± 0.0	0.8± 0.6	3.3± 2.3	0.1± 0.1
Primera agujero (latencia, s)	1.5± 3.5	5.4± 1.2	5.1± 1.7	30.0± 9.1*	13.5± 3.9 <sup>#</sup>	4.12± 1.4 <sup>#</sup>
Cuatro agujeros (latencia, s)	109.5± 20.5	140.4± 24.4	65.7± 8.7	171.7± 26.0	136.1± 31.5	129.1± 50.2
Tiempo de exploración (s)	<i>ver Figura 12 A</i>					
Número de exploraciones (n)	33.8± 3.3	30.0± 5.2	51.7± 3.1**, %%	20.7± 2.6	22.3± 3.9	28.3± 5.5
Defecación (n)	0.65± 0.2	2.7± 0.6**	0.7± 0.4 <sup>%</sup>	2.4± 0.6**	2.8± 0.4**	1.0± 0.3

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*p<0.01 comparados al NTg SED; <sup>#</sup>p<0.05 Tg EXE comparado al Tg SED. %p<0.05, %%%p<0.01 comparados los EXE-1M a los EXE-6M en cada genotipo.

Tabla 11D. Afectaciones conductuales de las hembras 3xTg-AD a los 7 meses de edad y su respuesta frente al tratamiento de EF voluntario.

	F NTg SED (n=21)	F NTg EXE-1M (n=10)	F NTg EXE-6M (n=9)	F Tg SED (n=14)	F Tg EXE-1M (n=10)	F Tg EXE-6M (n=8)
<b>Neofobia</b>						
Actividad vertical (latencia, s)	16.1± 2.3	12.6± 2.5	19.8± 2.8	12.4± 2.3	22.0± 3.1	21.6± 3.3
Números de corner (n)	5.1± 0.8	4.4± 0.9	4.9± 0.9	5.0± 0.8	2.6± 0.4	5.7± 1.0
Actividad vertical (n)	2.7± 0.6	4.4± 0.6*	1.3± 0.4 <sup>%%%</sup>	2.2± 0.3	1.2± 0.4	0.8± 0.3
<b>Campo abierto</b>						
Latencia de movimiento (s)	<i>ver Figura 10 B</i>					
Actividad horizontal (latencia, s)	3.9± 1.0	7.5± 1.4	7.8± 1.7	12.9± 3.6	15.1± 3.0*	9.8± 3.4
Entrada a periferia (latencia, s)	8.9± 1.7	13.8± 2.8	13.9± 2.6	32.7± 8.0	73.1± 32.9**,#	16.5± 3.0 <sup>o</sup>
Actividad vertical (latencia, s)	32.6± 9.9	24.3± 8.5	60.3± 23.2	36.8± 12.9	50.2± 28.7	49.0± 29.2
Higiene (latencia, s)	124.2± 10.7	136.6± 19.7	125.2± 10.8	200.6± 19.9*	219.7± 20.4***	228.0± 13.7***
Actividad horizontal (n)	<i>ver Figura 10 D</i>					
Actividad vertical (n)	<i>ver Figura 10 F</i>					
Duración de la higiene (s)	7.8± 1.5	10.6± 1.8	8.2± 1.2	5.6± 1.4	4.7± 1.6	4.5± 0.8
Defecación (n)	2.1± 0.3	2.8± 0.5	1.5± 0.2	2.1± 0.4	1.9± 0.4	2.1± 0.6
<b>Caja oscura/iluminada</b>						
Salida al área blanca (latencia, s)	<i>ver Figura 11 B</i>					
Tiempo en área blanca (s)	91.9± 16.4	95.9± 21.0	144.5± 22.2	63.0± 14.5	83.7± 29.8	136.2± 25.0
Entradas al área blanca (n)	5.4± 0.7	5.1± 0.7	5.5± 0.7	3.9± 0.7	3.6± 0.9	6.5± 0.8
Defecación (n)	1.1± 0.3	1.2± 0.4	1.6± 0.4	2.6± 0.5	2.4± 0.7	1.1± 0.4
<b>Caja de 4 agujeros</b>						
Latencia de movimiento (s)	0± 0	0± 0	0.2± 0.2	0.5± 0.3	0.5± 0.4	0± 0
Primera agujero (latencia, s)	7.9± 1.7	3.5± 1.3	13.9± 4.2	10.6± 2.0	7.8± 3.2	7.6± 1.9
Cuatro agujeros (latencia, s)	117.1± 27.7	120.2± 26.1	65.7± 26.2	182.4± 31.1	148.3± 37.7	149.5± 38.0
Tiempo de exploración (s)	<i>ver Figura 12 B</i>					
Número de exploraciones (n)	31.5± 4.7	32.0± 4.6	50.4± 2.4*, <sup>o</sup>	28.1± 4.1	34.5± 6.9	29.5± 4.9
Defecación (n)	1.1± 0.4	2.3± 0.5	1.5± 0.4	2.1± 0.5	3.1± 0.5	2.1± 0.6

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg SED; #p<0.05 Tg EXE comparado al Tg SED. <sup>o</sup>p<0.05, <sup>%%%</sup>p<0.001 comparados los EXE-1M a los EXE-6M en cada genotipo.

### 1.4.1. Neofobia

Se observó una conducta neofóbica en los ratones 3xTg-AD, con excepción de las hembras de 7 meses de edad. Este dato está basado en el aumento de la latencia de exploración vertical, la disminución del número de exploraciones de las esquinas y de la actividad vertical, cuando el ratón se expuso a la nueva jaula de vida (Student's test,  $P < 0.05$ : NTg SED vs Tg SED para los 3 grupos afectados, en los tres criterios medidos) (ver Tablas 11A, 11B, 11C y 11D). El EF indujo recuperación en las hembras de 4 meses de edad.

### 1.4.2. Campo abierto

La latencia de inicio de la deambulación se encontró aumentada en los 3xTg-AD machos de 7 meses de edad (Student's test,  $P < 0.01$ : NTg SED vs Tg SED) y en las hembras de 4 meses (ANOVA,  $F_{(3,36)} = 4.056$ ,  $P = 0.0139$ ) (Figura 10 A, B). A los 4 meses de edad el EF produjo una clara mejora, pero en los de 7 meses solo se produjo con 6 meses de EF.

La actividad horizontal de los ratones 3xTg-AD se vio disminuida en ambos sexos y edades (ANOVA, machos 4 meses:  $F_{(3,36)} = 4.652$ ,  $P = 0.0076$ ; hembras 4 meses:  $F_{(3,36)} = 5.477$ ,  $P = 0.0033$ ; machos 7 meses:  $F_{(5,66)} = 4.154$ ,  $P = 0.0024$ ; hembras 7 meses:  $F_{(5,59)} = 5.676$ ,  $P = 0.0002$ ). Debido a los tratamientos, se produjeron mejoras en los machos de 7 meses de edad (Figura 10 C, D). La actividad vertical fue significativamente menor en las hembras 3xTg-AD de 4 meses (ANOVA,  $F_{(3,36)} = 7.862$ ,  $P = 0.0004$ ), aunque se pudo observar una tendencia a que estar disminuida en los machos de ambas edades (Figura 10 E, F).

Los demás datos medidos se pueden observar en las Tablas 11A, 11B, 11C y 11D, donde se aprecia que a los 4 meses de edad no se encontraron afectaciones significativas. Sin embargo, los ratones 3xTg-AD machos de 7 meses presentaron retardadas las latencias de exploración horizontal y la de realización de la higiene (Student's test,  $P < 0.05$ : NTg SED vs Tg SED para ambas). En ellos también se encontró disminuido el tiempo que dedicaron a la higiene (Student's test,  $P < 0.05$ : NTg SED vs Tg SED). Los tratamientos de EF produjeron recuperación de estos patrones afectados (Tablas 11A y 11C).

Por su parte en las hembras 3xTg-AD de 7 meses de edad se observó retardada la latencia de entrada a la periferia del campo abierto (Student's test, Tg SED  $P < 0.05$ ),

donde solo el tratamiento de 6 meses de EF produjo recuperación. También en ellas se encontró disminuida la latencia de higiene, sin que los tratamientos produjeran recuperación (ANOVA,  $F_{(5,59)}=9.463$ ,  $P<0.0001$ ) (Tablas 11B y 11D).

### 1.4.3. Caja oscura/iluminada

En los machos de 4 y 7 meses observamos aumentada la latencia de entrada al área blanca (Figura 11 A, B) (Student's test,  $P<0.05$ : NTg SED vs Tg SED para ambos). Se produjo una disminución más clara de esta latencia con la terapia de 6 meses de EF. Además, en esta prueba observamos afectada la emotividad de los ratones 3xTg-AD machos de 4 meses de edad, dado por el aumento del número de defecaciones, que recuperó los valores esperados con el tratamiento de un mes de EF (Student's test,  $P<0.05$ : NTg SED vs Tg SED) (ver Tabla 11A).

En los machos 3xTg-AD de 7 meses de edad se encontró disminuido el tiempo de permanencia en el área blanca (Student's test,  $P<0.01$ : NTg SED vs Tg SED), que aumentó con ambas terapias de EF. Además, en ellos se observó disminuida el número de entradas al área en cuestión (ver Tabla 11C) (ANOVA,  $F_{(5,66)}=6.699$ ,  $P<0.0001$ ).

En ambos sexos y edades evaluadas observamos perfiles ansiosos en los ratones 3xTg-AD (Figura 11 y Tablas 11A, 11B, 11C y 11D), aunque este patrón no se manifestó en las hembras de 4 meses de edad. En las 3xTg-AD de 7 meses se observó retardada la latencia de salida al área blanca, que se recuperó claramente con un tratamiento de 6 meses de EF (Figura 11 B) (ANOVA,  $F_{(5,59)}=4.351$ ,  $P=0.0018$ ). Este tratamiento también produjo un aumento del tiempo de permanencia en esta área en los ratones hembras 3xTg-AD (ver Tabla 11D) (Student's test,  $P<0.05$ : Tg SED vs Tg EXE-6M).

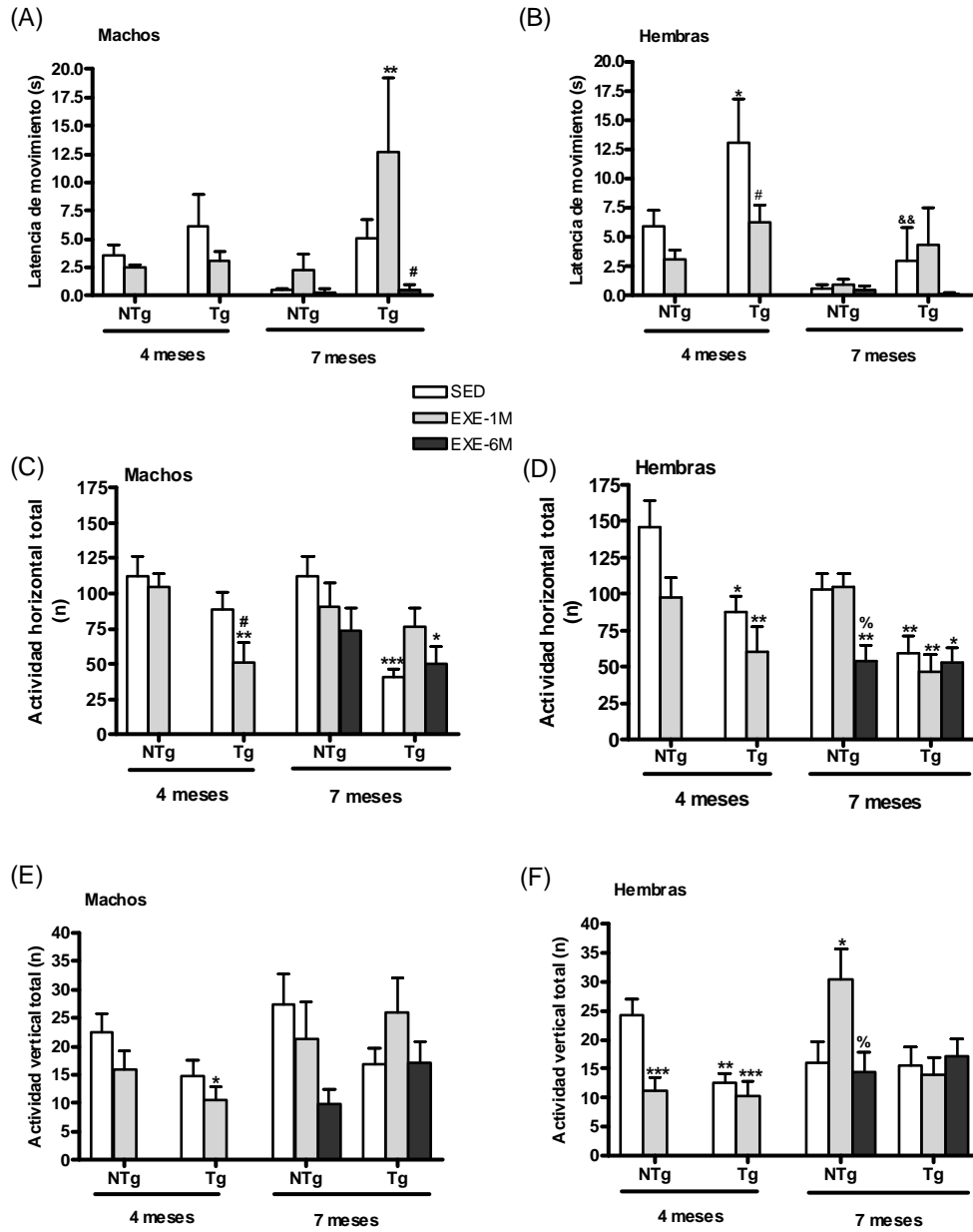


Figura 10. Campo abierto. Afectaciones conductuales del 3xTg-AD a los 4 y 7 meses de edad. El EF voluntario produjo un aumento de la motivación por la deambulaci3n en ambos sexos y edades. Tambi3n se observan mejoras en la actividad exploratoria de los machos de 7 meses de edad. (A) y (B) Latencia de movimiento, (C) y (D) Actividad horizontal, (E) y (F) Actividad vertical. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparados al NTg SED de su edad; # $p < 0.05$ , Tg EXE comparado al Tg SED de su edad; && $p < 0.01$ , comparando SED de 7 meses al SED de 4 meses de cada genotipo y % $p < 0.05$ , comparando EXE-1M al EXE-6M de cada genotipo.

#### 1.4.4. Caja de 4 agujeros

Cuando expusimos los animales ante un ambiente novedoso, como es la caja de 4 agujeros, observamos que los ratones 3xTg-AD machos tenían disminuida la curiosidad por lo desconocido, con una latencia de inicio de exploración de los agujeros aumentada (Student's test,  $P < 0.01$ : NTg SED vs Tg SED a los 4 meses de edad; ANOVA,  $F_{(5,66)} = 3.512$ ,  $P = 0.0071$  a los de 7 meses de edad). Esta latencia disminuyó con los tratamientos (ver Tablas 11A y 11C). Además, en los ratones machos 3xTg-AD de 7 meses de edad también se encontró disminuido el número de exploraciones (Student's test,  $P < 0.01$ : NTg SED vs Tg SED) (ver Tablas 11A y 11C) y el tiempo de exploración (ANOVA,  $F_{(5,66)} = 8.014$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figura 12 A). Ambos patrones aumentaron con el tratamiento de 6 meses de EF. En los ratones de 4 meses, el EF también aumentó el número de exploraciones (Student's test,  $P < 0.01$ : Tg SED vs Tg EXE). Además, en esta prueba se encontró aumentada el número de defecaciones de los machos 3xTg-AD de 7 meses de edad (ANOVA,  $F_{(5,66)} = 5.817$ ,  $P < 0.0002$ ) (ver Tablas 11A y 11C).

Las hembras 3xTg-AD de estas edades no presentaron marcadas afectaciones en los patrones de exploración respecto a las NTg SED (ver Tablas 11B y 11D y Figura 12 B). No obstante, a los 7 meses de edad se observó disminuido el tiempo de exploración (ANOVA,  $F_{(5,59)} = 4.542$ ,  $P = 0.0013$ ). Este valor aumentó con ambos tratamientos (Figura 12 B).

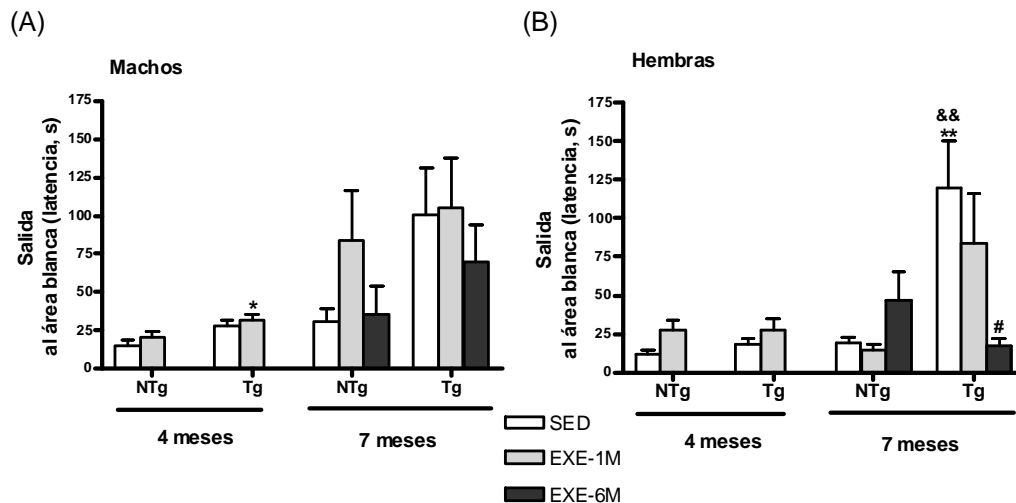


Figura 11. Caja oscura/iluminada. Efecto del EF sobre la ansiedad del ratón 3xTg-AD. (A) y (B) Latencia de salida al área iluminada. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  comparados al NTg SED de su edad; # $p < 0.05$ , Tg EXE comparado al Tg SED de su edad; && $p < 0.01$ , comparando SED de 7 meses al SED de 4 meses de cada genotipo.



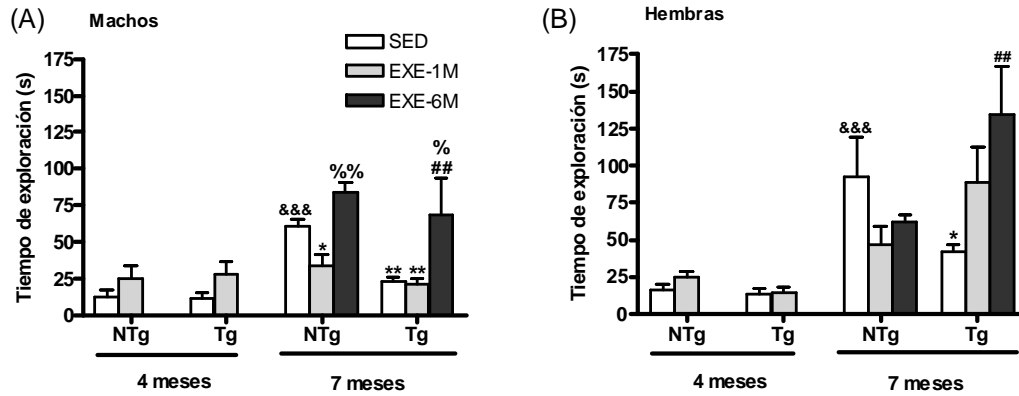


Figura 12. Caja de 4 agujeros. El tratamiento de 6 meses de EF produjo un aumento en la conducta exploratoria del 3xTg-AD. (A) y (B) Tiempo total de exploración de los agujeros. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  comparados al NTg SED de su edad; ## $p < 0.01$ , Tg EXE comparado al Tg SED de su edad; &&& $p < 0.001$ , comparando SED de 7 meses al SED de 4 meses y % $p < 0.05$ , %% $p < 0.01$  comparando EXE-1M a EXE-6M de cada genotipo.

### 1.5. Adquisición y retención del aprendizaje en el MWM

En los ratones 3xTg-AD de ambos sexos encontramos problemas cognitivos respecto del control NTg desde los 4 meses de edad. Aunque a esta edad no se encontraron diferencias destacables en el aprendizaje (Figura 13), sí se observaron en la retención, que mejoró significativamente con el tratamiento de EF en las hembras (Figura 14). A los 7 meses de edad los machos NTg SED y Tg EXE-6M bajaron sus latencias más de 15 segundos de media con respecto al primer día; sin embargo los Tg SED y los Tg EXE-1M lo hicieron solo 7 segundos (Figura 13). En el aprendizaje, solo se observó un efecto entre los grupos en las hembras (Anova, 4 meses:  $F_{(3,216)}=3.146$ ,  $P=0.0260$ ; 7 meses:  $F_{(5,348)}=5.101$ ,  $P=0.0002$ ). El efecto de los días se observó en todos los grupos (ANOVA, machos 4 meses:  $F_{(5,216)}=10.00$ ,  $P < 0.0001$ ; hembras 4 meses:  $F_{(5,216)}=6.266$ ,  $P < 0.0001$ ; machos 7 meses:  $F_{(5,396)}=20.40$ ,  $P < 0.0001$ ; hembras 7 meses:  $F_{(5,348)}=19.90$ ,  $P < 0.0001$ ). En las hembras de 7 meses de edad se observaron las menores latencias en los Tg EXE-1M, que al quinto día fue significativamente menor que la de los Tg SED (Figura 13). En la prueba de retención se confirmó que los machos que recibieron un tratamiento de 6 meses de EF presentaron mejoras cognitivas, indicada por la mayor permanencia en el cuadrante donde debía estar la plataforma que en el opuesto (Figura 14). En las hembras de 7 meses de edad se obtuvo un buen resultado con ambos tratamientos (Figura 14).

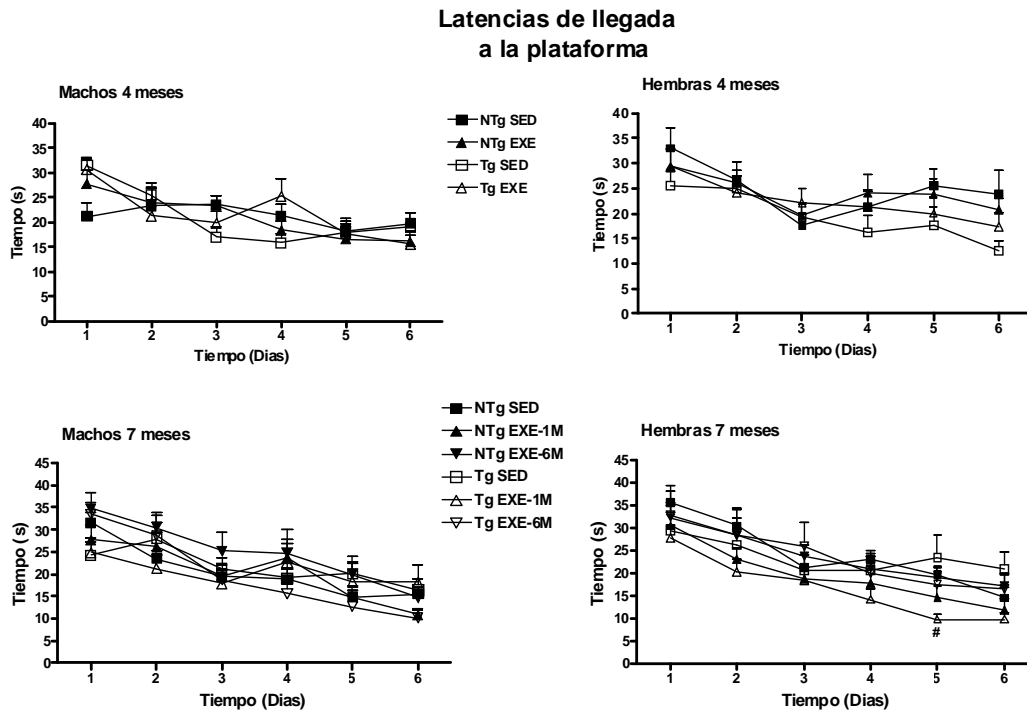


Figura 13. Laberinto acuático de Morris. Latencias de llegada a la plataforma. No se apreciaron diferencias significativas en el aprendizaje, aunque las mayores latencias de llegadas a la plataforma fueron para los Tg SED comparadas a los NTg SED. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: Two-way ANOVA Bonferroni posttests, # $p < 0.05$ , Tg EXE-1M comparado al Tg SED.

### 1.6. Evaluación del estado del estrés oxidativo cerebral

Para determinar el estado de estrés oxidativo cerebral determinamos los niveles de GSH, GSSG y de LPO. Además realizamos determinaciones de la actividad de las principales enzimas involucradas en estos procesos (GPx, GR, SOD-CuZn y SOD-Mn). Todas estas determinaciones se realizaron con una muestra de corteza cerebral.

#### 1.6.1. Niveles de lípidos oxidados

Al determinar los niveles de LPO encontramos que no habían variaciones significativas a los 4 meses de edad entre los ratones 3xTg-AD y los controles NTg, pero que sí estaban aumentados en ambos sexos a los 7 meses (Figura 15). El EF indujo la disminución de los LPO. Los niveles de los LPO se encontraron más elevados en los machos a los 7 meses de edad que en los de 4, pero no ocurrió así en las hembras, donde los niveles se mantuvieron estables con el avance de la edad.

Prueba de retención

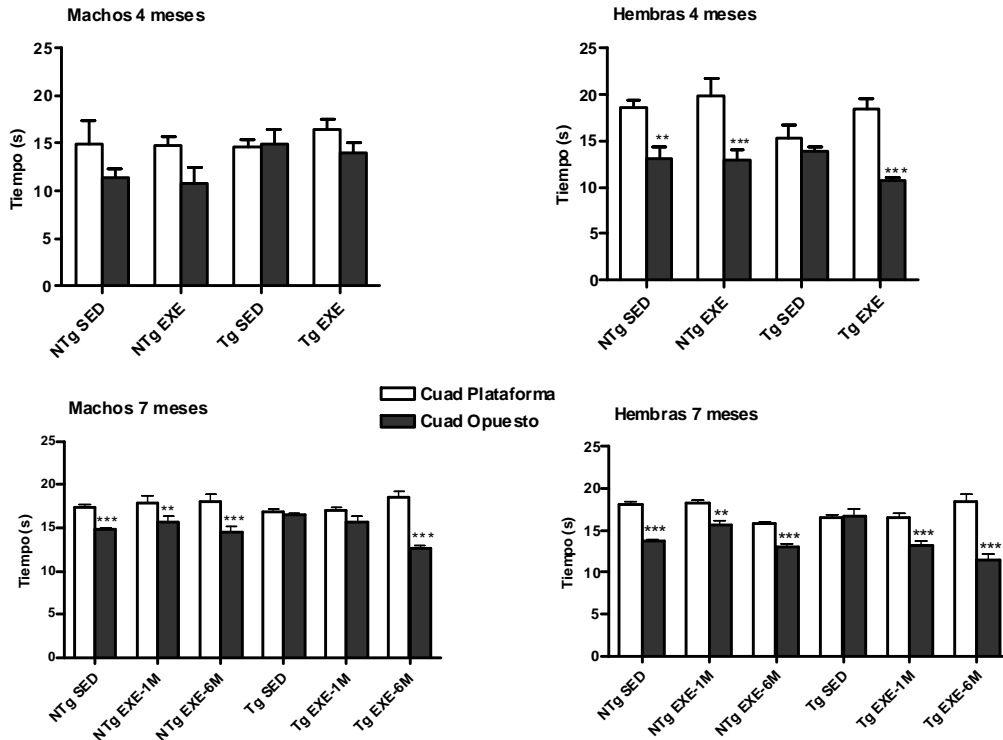


Figura 14. Laberinto acuático de Morris. Se muestra la prueba de retención del aprendizaje con afectaciones cognitivas en el ratón 3xTg-AD desde los 4 meses de edad. El EF siempre produjo mejoras, pero fue el tratamiento preventivo de 6 meses de EF quien dio los mejores resultados. Se muestran las medias  $\pm$  SEM del tiempo de permanencia en el cuadrante de la plataforma y su opuesto. Estadística: Two-way ANOVA Bonferroni posttests, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparando el cuadrante plataforma contra su opuesto en cada grupo.

Hidroperóxidos de lípidos

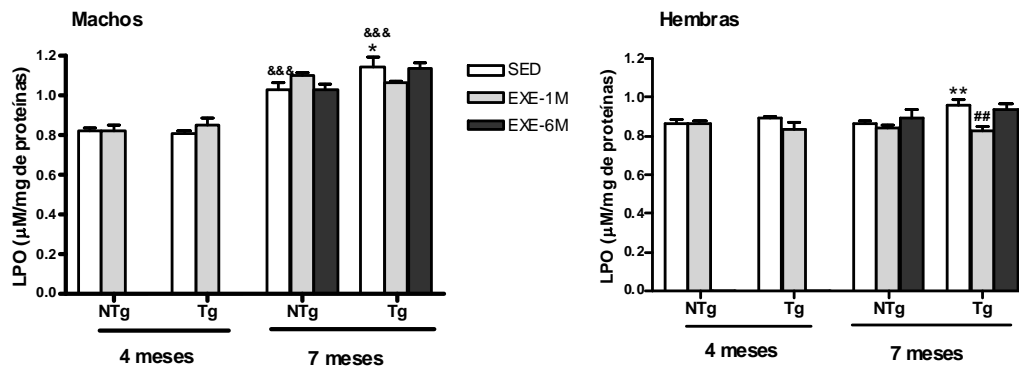


Figura 15. Lípidos oxidados. El aumento de los LPO se hace evidente a los 7 meses de edad. El tratamiento de EF indujo recuperación. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*p<0.01 comparados al NTg SED de su edad; ###p<0.001, Tg EXE comparado al Tg SED de su edad y &&&p<0.001, comparando SED de 7 meses al SED de 4 meses.

### 1.6.2. Niveles de GSH y GSSG

Los niveles de GSH no se encontraron significativamente diferentes a estas edades entre los dos genotipos (Figura 16). El tratamiento de EF produjo una tendencia a aumentarlo en los machos 3xTg-AD de 4 meses de edad. En las hembras se apreció un aumento de estos niveles con el avance de la edad, en ambos genotipos.

El GSSG se encontró aumentado en los machos 3xTg-Ad de 7 meses de edad (Student's test,  $P < 0.01$ : NTg SED vs Tg SED). Ninguno de los dos tratamientos de EF aplicados en estos animales produjo disminución de estos niveles. En machos de ambos genotipos se produjo un aumento de los niveles del GSSG con el avance de la edad. Sin embargo, en las hembras esto solo se produjo en las 3xTg-AD.

### 1.6.3. Actividad enzimática antioxidante

En las figuras 17 y 18 se muestra que los ratones 3xTg-AD de 4 meses de edad no presentan afectaciones en la actividad de las enzimas analizadas. A los 7 meses se observaron afectaciones significativas, pero principalmente en los machos. La actividad de la GPx se encontró disminuida en ambos sexos a esta edad (Figura 17). Los tratamientos de EF aumentaron su actividad. No se apreció que la actividad de la enzima aumentara con la edad en ninguno de los 2 genotipos. La GR se midió en los animales de 7 meses de edad y su actividad solo se encontró disminuida en las hembras Tg SED respecto al control NTg SED. El tratamiento de un mes de EF indujo un aumento significativo de la actividad de esta enzima (Figura 17).

La actividad de la SOD-CuZn se encontró significativamente aumentada en los Tg SED de 7 meses de edad y este resultado también se observó en los que se expusieron a un tratamiento de 6 meses de EF. La actividad de esta enzima, en los animales de esta edad, bajó a niveles similares al control NTg SED con el tratamiento de 1 mes de EF (Figura 18). Tanto en hembras como en machos 3xTg-AD la actividad de la SOD-CuZn aumentó con el avance de la edad, pero en los NTg este aumento solo se produjo en las hembras. La SOD-Mn fue similar en todos los grupos y edades. No obstante, en los 3xTg-AD de 7 meses de edad, se apreció un aumento de su actividad en los grupos Tg SED y Tg EXE-6M (Student's test,  $P < 0.05$ : NTg SED vs Tg SED,  $P < 0.01$ : NTg SED vs Tg EXE-6M).

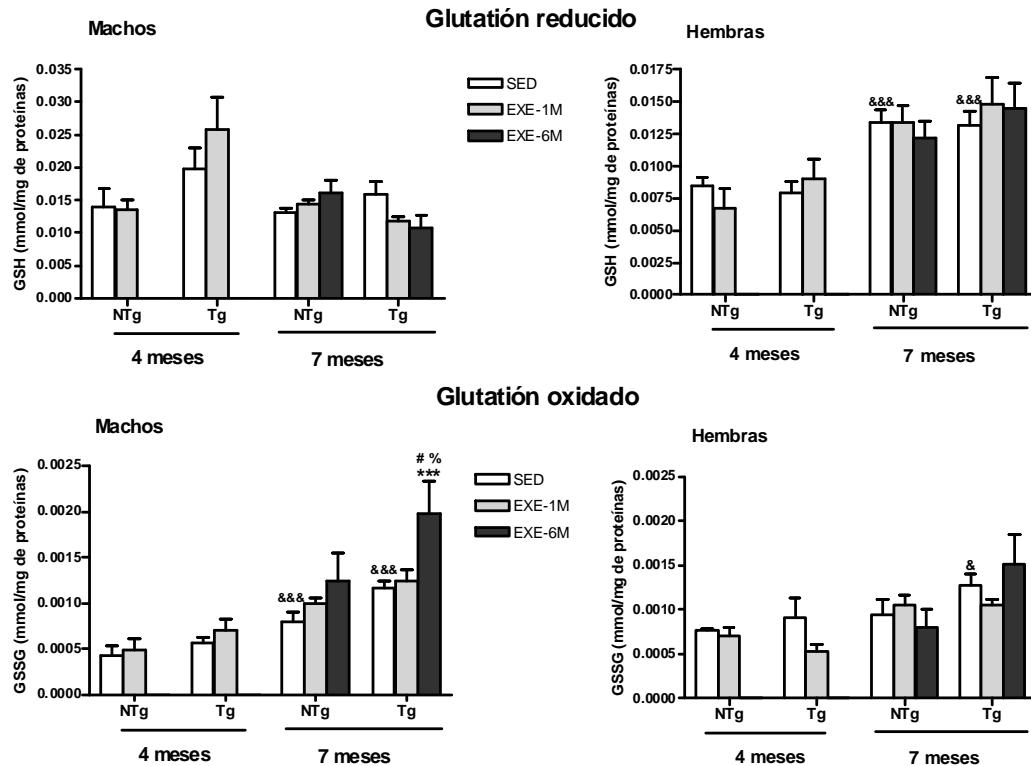


Figura 16. Glutación reducido y oxidado. Se observan afectaciones del ciclo del glutatión en los machos de 7 meses de edad. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*\*\* $p < 0.001$  comparados al NTg SED de su edad; # $p < 0.05$ , Tg EXE comparado al Tg SED de su edad; & $p < 0.05$ , && $p < 0.001$  comparando SED de 7 meses al SED de 4 meses y % $p < 0.05$  comparando EXE-1M a EXE-6M de cada genotipo.

### 1.7. Western blot

La expresión del GDNF, NMDAR2B y de la sinaptofisina, en los animales de 7 meses de edad, se midió en muestras de hipocampo. El GDNF se encontró disminuido en los machos y el EF produjo su recuperación, pero con mayor importancia cuando se aplicó el tratamiento de un largo período de duración (Figura 19 A y C). En las hembras el GDNF no se vio afectado, pero el tratamiento de un mes de EF produjo un aumento de sus valores (Figura 19 B y D).

No se encontraron diferencias significativas entre los ratones 3xTg-AD y el control NTg de ambos sexos, en cuanto a los valores del subtipo R2B del receptor NMDA (Figura 20) y de la sinaptofisina (Figura 21). No obstante, se apreció una tendencia a que el receptor NMDAR2B estuviera disminuido en los machos 3xTg-AD y a que se recuperara con el EF (Figura 20 C). El EF de 6 meses también produjo una tendencia a aumentar la sinaptofisina en los machos de ambos genotipos, pero más claramente en el grupo control (Figura 21 A y C).

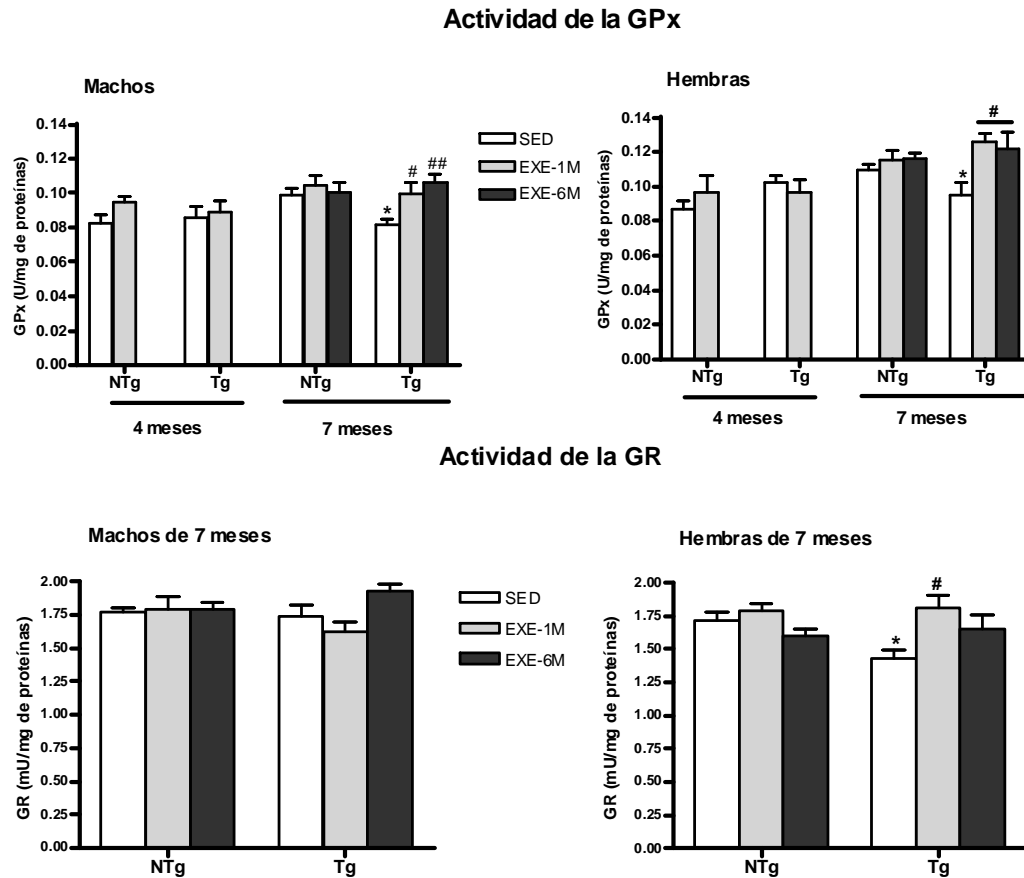


Figura 17. Actividad enzimática cerebral de la GPx y GR. Los tratamientos de EF aplicados, en general, tienden a aumentar la actividad de este complejo enzimático. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$  comparados al NTg SED de su edad; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , Tg EXE comparado al Tg SED de su edad.

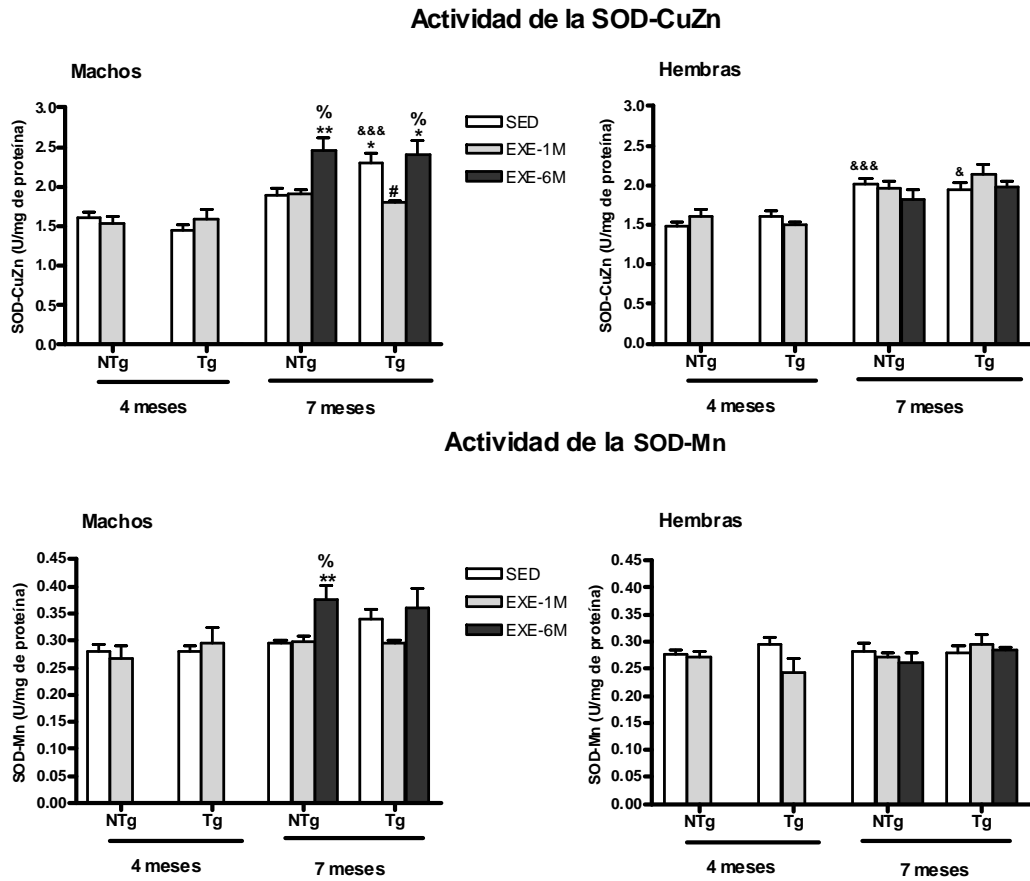


Figura 18. Actividad enzimática cerebral de la SOD-CuZn y SOD-Mn. A los 7 meses de edad se encontró aumentada la actividad de estas enzimas en los ratones machos 3xTg-AD de 7 meses de edad respecto el NTg. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  comparados al NTg SED de su edad; # $p < 0.05$ , Tg EXE comparado al Tg SED de su edad, & $p < 0.05$ , && $p < 0.001$ , comparando SED de 7 meses al SED de 4 meses y % $p < 0.05$  comparando EXE-1M a EXE-6M de cada genotipo.

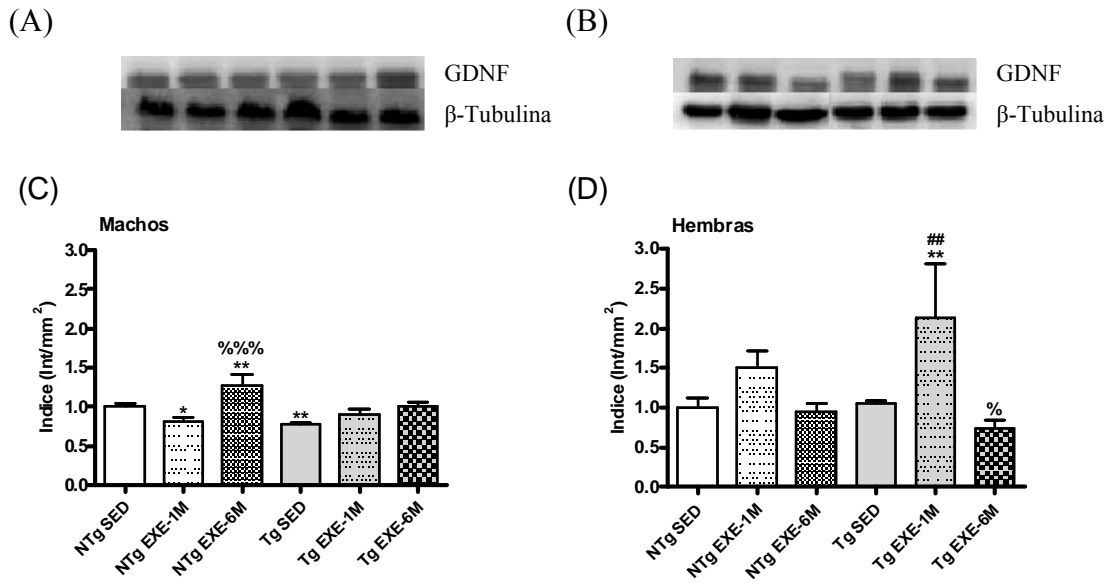


Figura 19. Western Blot. (A) y (B) Expresión proteica del GDNF (anti-GDNF 1:800) detectado por western blot (60  $\mu$ g prot/carril), la  $\beta$ -Tubulina se utilizó como control de carga (1: 50 000); (C) y (D) Cuantificación de los niveles de expresión proteica del GDNF. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 comparados al NTg SED; ## $p$ <0.01, Tg EXE comparado al Tg SED; % $p$ <0.05, %%% $p$ <0.001 comparando a EXE-1M y EXE-6M de cada genotipo.

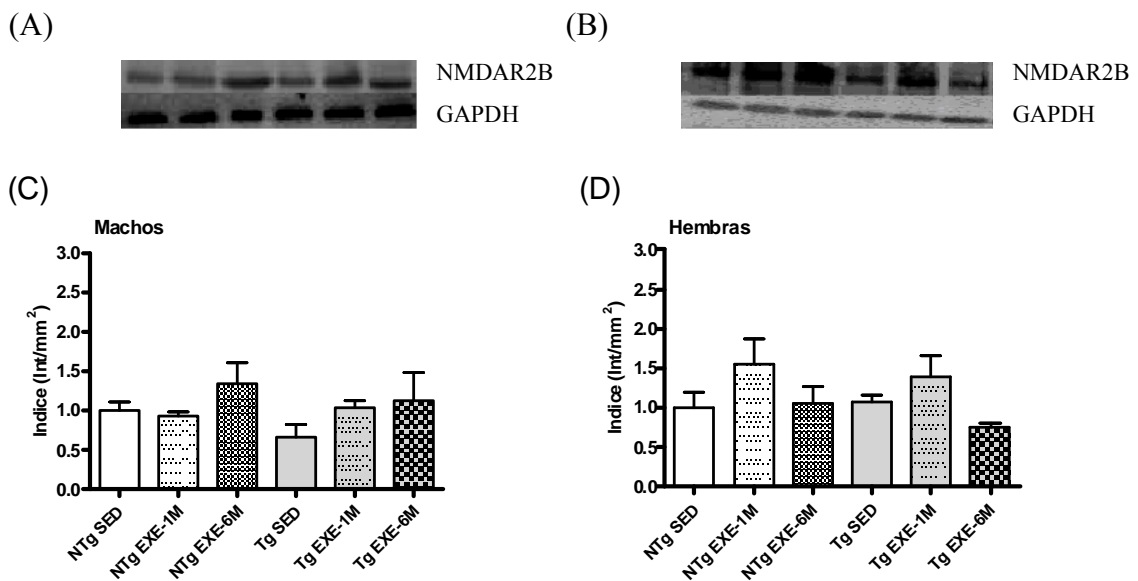


Figura 20. Western Blot. (A) y (B) Expresión proteica del NMDAR2B (anti-NMDAR2B 1: 500) detectado por western blot (60  $\mu$ g prot/carril), el GAPDH se utilizó como control de carga (1: 3000); (C) y (D) Cuantificación de los niveles de expresión proteica del NMDAR2B. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test.



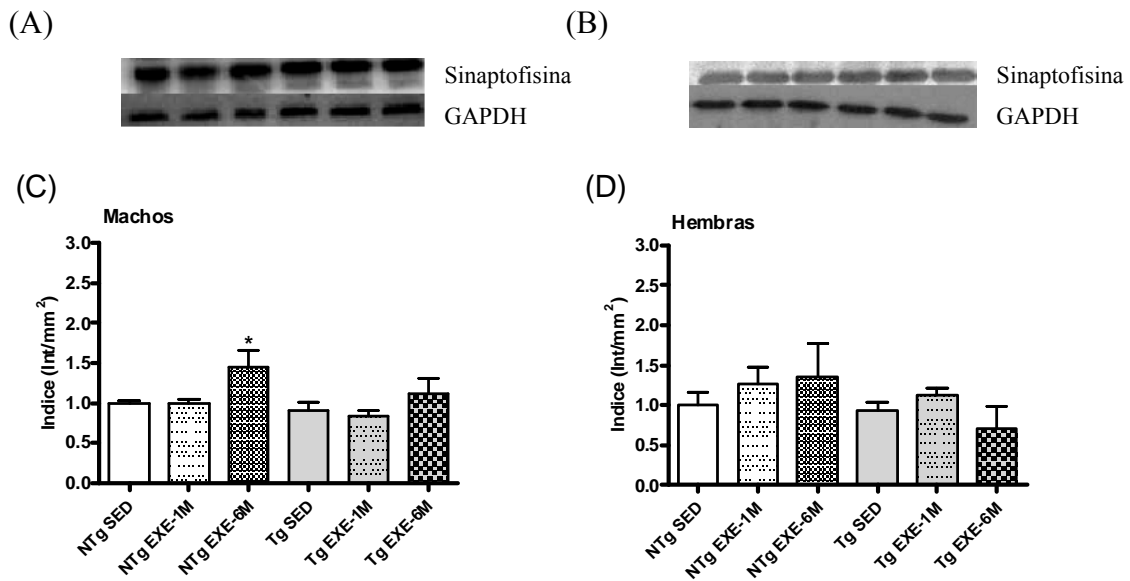


Figura 21. Western Blot. (A) y (B) Expresión proteica de la sinaptofisina (anti-sinaptofisina 1: 8 000) detectada por western blot (60  $\mu$ g prot/carril), el GAPDH se utilizó como control de carga (1: 3000); (C) y (D) Cuantificación de los niveles de expresión proteica de la Sinaptofisina. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

## 2. DISCUSIÓN

Mediante este trabajo hemos querido determinar en que medida un período, corto o largo, de EF voluntario, aplicado en etapas tempranas de la vida de este modelo animal, puede afectar el comienzo y el progreso de la enfermedad. El modelo animal que utilizamos en este trabajo, como se ha comentado antes, es un modelo tripletransgénico que va desarrollando un fenotipo neuropatológico progresivo, relativo a la edad, que incluye los depósitos de A $\beta$  y los ovillos neurofibrilares en correspondencia a lo que ocurre en humanos (Oddo et al., 2003a; Mastrangelo and Bowers, 2008). De acuerdo a lo planteado por estos autores, en nuestro trabajo los resultados muestran, que con el avance de la edad, en el modelo 3xTg-AD se van incrementando las afectaciones conductuales, cognitivas y del estado de estrés oxidativo cerebral.

### 2.1. Ensayo de habilidades sensoriales y motoras

En nuestro trabajo la función sensorial y motora de los 3xTg-AD no se encontró afectada y el EF, en ambos genotipos, hizo que mejoraran el equilibrio, la coordinación motora y la fuerza muscular. Estos resultados concuerdan con lo observado por

Giménez-Llort et al., al aplicar un tratamiento de EF forzado en machos y hembras de este modelo, a los 7 meses de edad (Giménez-Llort et al., 2010). Si bien es cierto que a los 6 meses de edad ha sido descrito que este modelo presenta A $\beta$  intraneuronal inmunoreactiva, déficits sinápticos, disminución de la LTP (Oddo et al., 2003) y deficiencia del aprendizaje y de la memoria (Giménez-Llort et al., 2007; Billings et al., 2005), se ha publicado que solo en las etapas más avanzadas presentan leves deficiencias sensoriales (Giménez-Llort et al., 2007). En otros estudios realizados con transgénicos para la EA también se muestran pocas diferencias motoras en edades tempranas (King et al., 1999; Arendash et al., 2001; King and Arendash, 2002).

## **2.2. Función inmuno-endocrina**

Ya desde los 2.5 meses de edad se han encontrado diferencias significativas entre el peso del ratón 3xTg-AD macho y el control NTg (Giménez-Llort et al., 2007). En correspondencia con este estudio anterior, en nuestro trabajo los machos Tg SED de 4 meses presentaron mayor peso corporal que los controles NTg SED. A los 7 meses de edad se mantuvo este efecto. El tratamiento de 6 meses de EF produjo una disminución significativa del peso corporal con un efecto mayor en las hembras. En un trabajo anterior, donde aplicamos un período corto de EF forzado en el modelo de ratón 3xTg-AD, no encontramos una disminución del peso corporal con el tratamiento ni en machos ni en hembras (Giménez-Llort et al., 2010). No obstante, se ha mostrado cierta capacidad del EF para disminuir el peso corporal, utilizando ratas como modelo animal (Sene-Fiorese et al., 2008; Sakurai et al., 2010).

El bazo de estos animales 3xTg-AD lo encontramos aumentado respecto al control NTg SED, sin que el EF produjera algún efecto claro sobre el peso del mismo. Se ha sugerido que el EF puede producir una disminución de los linfocitos T del bazo, pero que este efecto parece que no es más que una sustancial redistribución de las células T, dentro y fuera de los órganos linfoides, que hace que pueda aumentar la vigilancia y actuación del sistema inmune (Krüger and Moren 2007).

## **2.3. Evaluación conductual**

Los cambios en la actividad horizontal y vertical, con una conducta exploratoria reducida, han sido observados en el 3xTg-AD de 2.5, 6 y 7 meses de edad (Giménez-Llort et al., 2007; 2010). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en el presente estudio, donde los Tg SED comenzaron la deambulación y la exploración tardíamente.

No obstante, hay algunos estudios donde observan hiperactividad en el campo abierto en ratones jóvenes, transgénicos para la EA (King and Arendash, 2002; King et al., 1999). En un trabajo realizado por Pietropaolo et al., (2008b), con el modelo 3xTg-AD y con tratamiento de EF similar, se describe una mejor adaptación al ambiente desconocido, lo cual corroboramos en este trabajo, donde además observamos que se recuperó la motivación por la deambulaci3n.

En el trabajo de caracterizaci3n conductual del modelo 3xTg-AD, realizado por Giménez-Llort et al. (2007) a diferentes edades, se observ3 que las afectaciones conductuales relacionadas con la ansiedad se presentan a los 6 meses de edad. En correspondencia con ese trabajo nuestros resultados muestran una conducta ansiosa a los 7 meses de edad. Esta conducta fue revertida con el tratamiento de 6 meses de EF, en especial en hembras. El efecto ansiol3tico del EF voluntario observado en este trabajo coincide con lo publicado por Pietropaolo et al. (2008b), en un trabajo similar con este modelo animal. No obstante, vale decir que en su tratamiento los animales fueron estabulados individualmente y nosotros lo hicimos en grupos de 5; adem3s para medir la ansiedad emple3 un laberinto en cruz elevado y nosotros utilizamos la caja oscura/iluminada. Estos factores pudieron influir en que vi3ramos el efecto ansiol3tico del EF tanto en hembras como en machos. Ha sido sugerido que la interacci3n entre las actividades cognitivas, sociales y f3sicas puede ser esencial para obtener los beneficios cognitivos/neurol3gicos y que no es suficiente una sola de estas actividades (van Praag et al., 2000; Cracchiolo et al., 2007).

Nuestros resultados muestran una disminuci3n de la curiosidad de los grupos 3xTg-AD y esto ha estado en correspondencia con diferentes estudios con animales transgénicos, donde se ha observado una disminuci3n en los rangos de alternancia espont3nea en el laberinto en forma de “Y” y en el laberinto en “T” (pruebas que se basan en la curiosidad natural de estos animales) (Arendash et al., 2001; Holcomb et al., 1999; King and Arendash, 2002; Lalonde et al., 2003). El tratamiento de EF durante 6 meses hizo que los 3xTg-AD de ambos sexos recuperaran la curiosidad y que aumentaran la exploraci3n. Este resultado puede ser de gran importancia si tenemos en cuenta que la disminuci3n de la curiosidad y el aumento de la apat3a han sido descritas en pacientes con la EA (Daffner et al., 1992) y que es la apat3a el s3ntoma que m3s empeora con la progresi3n de la enfermedad hasta el punto de ser considerado el s3ntoma m3s severo (Spalletta et al., 2004).

#### **2.4. Laberinto acuático de Morris**

En diversos estudios se ha demostrado que la actividad física mejora la función cognitiva durante el envejecimiento (Barnes et al., 2003; Colcombe & Kramer, 2003). Este hecho ha propiciado que se realizaran investigaciones con modelos transgénicos de la EA, a diferentes edades y duración del tratamiento de EF, y en los que se obtuvieron tanto resultados positivos (Adlard et al., 2005; Nichol et al., 2007; 2009; Parachikova et al., 2008) como negativos (Wolf et al., 2006; Richter et al., 2008). Los déficits funcionales en las pruebas de aprendizaje y memoria han sido documentados en los estudios de varias líneas de ratones transgénicos con mutaciones de APP, doble mutantes APP/PS-1 y triple mutantes APP/PS-1/Tau (Hsiao et al., 1996; Gordon et al., 2001; Kotilinek et al., 2002; Giménez-Llort et al., 2007).

La disminución cognitiva de los ratones 3xTg-AD, detectada a través del MWM, se ha observado que comienza sobre los 4 meses de edad, hecho que coincide con el inicio de los depósitos intracelulares de A $\beta$  (Billings et al., 2005; Giménez-Llort et al., 2007) y en nuestro trabajo encontramos esta alteración cognitiva, en correspondencia con los estudios citados.

En las hembras todos los tratamientos produjeron recuperación cognitiva significativa, lo que está de acuerdo con estudios similares donde, a diferentes edades, con períodos cortos o largos de EF en rueda de actividad y mediante diferentes pruebas cognitivas, observaron mejoras en modelos de ratones transgénicos para la EA (Adlard et al., 2005; Nichol et al., 2007; 2009). Sin embargo, los efectos en los machos fueron menos amplios, ya que solo fue significativamente efectivo el tratamiento de 6 meses de EF comenzado en ratones de un mes de edad.

#### **2.5. Estado del estrés oxidativo cerebral**

Los efectos del EF se ha visto que son muy complejos y pueden incluir neurogénesis vía factores neurotróficos, incremento de la capilarización, disminución del daño oxidativo e incremento de la degradación proteolítica por el proteosoma (Szabo et al., 2010; Radak et al., 2008a; Adlard et al., 2005; Adlard & Cotman, 2004; Navarro et al., 2004). Desde la pasada década comenzó a aclararse el efecto beneficioso del EF sobre la función cerebral así como el papel preventivo o terapéutico que este puede jugar en las enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Mattson et al., 2004; Mattson and Magnus, 2006).

La elevación de los LPO hallada por nosotros está de acuerdo con lo reportado por Resende et al. (2008) en este modelo animal, entre los 3 y 5 meses de edad. Además, en diferentes estudios post-mortem sobre la EA en humanos también han encontrado aumentados los LPO (Subbarao et al., 1990; Balazs and Leon 1994; Lovell et al., 1995; Sayre et al., 1997). Con el EF observamos que hubo una mayor recuperación de este valor en las hembras y creemos que probablemente se deba a que en estas se produjo una mayor actividad de la GPx y GR. Una mayor actividad del complejo enzimático GPx/GR resulta en una mejor eficiencia de la desintoxicación del peróxido de hidrógeno (Desagher et al., 1996). Además, se ha publicado que la GPx es una enzima importante para proteger de la peroxidación de los lípidos (Markesbery, 1997; Ursini and Bindoli, 1987).

Por otra parte, el sistema enzimático GPx/GR regula el equilibrio entre el GSH y el GSSG (Maas, 1990). El GSH es considerado uno de los antioxidantes no enzimáticos más relevantes del organismo (Chauhan and Chauhan, 2006). El EF en las hembras produjo una activación de este sistema, lo cual creemos que debió de haber influido en que los niveles de GSH y GSSG se mantuvieran adecuadamente. Sin embargo, en los machos de 7 meses de edad encontramos una alteración de esta relación, que pudo ser debido a que no hubo un equilibrio entre la activación de la GR y de la GPx, por lo que el metabolismo del glutatión pudo quedar desplazado hacia la producción de GSSG. Por otra parte podemos suponer que el mejor funcionamiento del metabolismo del glutatión en hembras se debió también a que, como ha sido mostrado en otros órganos, los estrógenos pueden proteger de la disminución del contenido de GSH (Liu et al., 2004).

En cuanto a los efectos del EF sobre las actividades de las enzimas antioxidantes podemos decir que Somani et al. (1995) observaron que estos son variables y dependientes de las regiones cerebrales. En nuestro trabajo, a los 4 meses de edad los ratones 3xTg-AD no presentaron afectaciones en la actividad de las enzimas analizadas pero sí a los 7 meses. El EF actuó regulando esta actividad. Ha sido sugerido que el EF puede modificar la actividad de la SOD y de la GPx (Devi and Kiran, 2004; Somani and Husain, 1996), aumentando en unas regiones y disminuyendo en otras, o no producir variaciones en la actividad (Aksu et al., 2009; Ozkaya et al., 2002; Somani et al., 1995). Además del sistema GPx/GR, la actividad de la SOD se ha relacionado con la protección del daño oxidativo y las mejoras cognitivas en algún modelo de envejecimiento (Liu et al., 2003). En otro trabajo con un modelo murino de la EA se muestra que al reducir la actividad de la SOD-CuZn hay un incremento de los niveles

de LPO (Schuessel et al., 2005) y en otro modelo de esta enfermedad deficiente de SOD-Mn se asocia con el incremento de los niveles de A $\beta$  y la formación de la placa (Li et al., 2004a). En un trabajo realizado por Navarro et al. (2004), observan que aumenta la actividad de la SOD-CuZn y SOD-Mn en el cerebro de los ratones y relacionan este efecto con el aumento de la actividad antioxidante asociada con el EF.

## 2.6. Western blot

Hemos medido la expresión del GDNF, de la subunidad R2B del NMDA y de la sinaptofisina, en los animales de 7 meses de edad, como posibles proteínas implicadas en las mejoras conductuales y cognitivas encontradas. Se ha dicho que el GDNF juega un papel importante en la supervivencia celular y en la plasticidad de las neuronas, principalmente en el hipocampo (ver ref. Lindvall et al., 1994). Además se ha sugerido que existe una relación entre la expresión del GDNF y los procesos de envejecimiento (Zaman et al., 2003). En nuestro trabajo observamos que el EF produjo un aumento de los niveles del GDNF, lo cual concuerda con dos trabajos publicados en que muestran también un aumento en el contenido de GDNF cuando aplican tratamientos de EF (Kleim et al., 2003; Tajiri et al., 2010).

Por su parte el subtipo R2B, de los receptores NMDA, se ha dicho que juega un papel importante en procesos relacionados con la memoria, como la LTP (Berberich et al., 2005; Fox et al., 2006; Bartlett et al., 2007). Cuando realizamos las determinaciones de esta subunidad observamos que el EF produjo una tendencia a aumentar la cantidad de esta proteína. Dietrich et al. (2005), publicaron que un tratamiento de cuatro semanas de EF voluntario en animales de 2 meses de edad produjo un aumento de la fosforilación del NMDAR2B pero no de los valores totales de esta subunidad. En otro trabajo, donde utilizaron un período de EF de 7 a 10 días en ratones de 3 a 5 semanas de edad, tampoco encontraron aumentados los valores del NR2B el giro dentado (Vasuta et al., 2007). No obstante, otros autores muestran la capacidad del EF voluntario de actuar incrementando los niveles de la subunidad R2B en el giro dentado de ratas machos adultas (Farmer et al., 2004), o aplicado en combinación con una dieta regular o enriquecida con omega-3 (Chytrova et al., 2010). Además, en varios trabajos se ha asociado este aumento con la mejora cognitiva (Tang et al., 1999; Xu et al., 2005; Chytrova et al., 2010).

La sinaptofisina es una proteína que está presente en las vesículas pre-sinápticas y juega un importante papel en la fusión de las vesículas a la membrana presináptica para el desarrollo correcto de las sinapsis (Edelmann et al., 1995; Valtorta et al., 2004). En este

trabajo no encontramos diferencias entre los ratones 3xTg-AD y los controles NTg SED, a los 7 meses de edad. Sin embargo, otros autores han mostrado una disminución significativa de esta proteína en el córtex de este modelo animal a los 7 meses de edad (Hedberg et al., 2010). También, en algunos de los modelos de ratones transgénicos para la EA se ha podido observar una disminución de los niveles de esta proteína (Dumont et al., 2009a). No obstante, nosotros sí hemos observado una clara tendencia a que aumentaran los niveles de la misma con el EF. Resultados que están de acuerdo con lo publicado en algunos trabajos donde se ha visto que el EF aumentó la sinaptofisina en diferentes modelos animales (Vaynman et al., 2006; Hescham et al., 2009; Macías et al., 2009).

## **CAPÍTULO 2. MELATONINA, EJERCICIO FÍSICO VOLUNTARIO O LA COMBINACIÓN DE AMBOS TRATAMIENTO COMO TERAPIA PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

### **1. RESULTADOS**

En este experimento utilizamos ratones machos 3xTg-AD de 12 meses de edad que se sometieron a 6 meses de EF voluntario (Tg EXE), o a un tratamiento con melatonina (Tg Mel), o a la combinación de los dos tratamientos (Tg EXE-Mel) desde los 6 meses de edad. Utilizamos controles NTg y Tg, ambos sin ningún tratamiento pero en las mismas condiciones de estabulación. A los 12 meses de edad todos los animales se evaluaron en cuanto a los patrones sensoriales y motores, conductuales y cognitivos. Luego fueron sacrificados y medimos el estado de estrés oxidativo en corteza cerebral y la variación de la expresión proteica del NMDAR2B y la sinaptofisina mediante Western Blot en un muestras de bulbo olfatorio (BO).

#### **1.1. Distancia recorrida en la rueda de actividad**

La distancia promedio recorrida por cada ratón de cada semana, durante el tiempo de exposición a la rueda de actividad, se estimó según el número de los ratones en cada caja y los recuentos de cada rueda (Figura 22). Solo se apreció diferencia significativa entre los dos grupos expuestos a la rueda de actividad en el valor promedio de la segunda semana. Se produjo una interacción entre las semanas (ANOVA, semanas  $F_{(23,432)}=4.975$   $P<0.0001$ ).

#### **1.2. Función sensorial y motora**

La función sensorial se encontró afectada a esta edad en los ratones Tg (Tabla 12) (ANOVA,  $F_{(4,54)}=4.114$ ,  $P=0.0056$ ), con un efecto beneficioso con cualquiera de los tratamientos aplicados. No obstante, este grupo presentó buena coordinación y equilibrio. Los tratamientos que incluyeron el EF aumentaron este tipo de respuesta.

#### **1.3. Función inmuno-endocrina**

En la Tabla 13 podemos observar que todos los tratamientos aumentaron la supervivencia, que se vio afectada en el grupo Tg. No se encontraron diferencias entre el peso corporal de los ratones del grupo Tg y los NTg. Curiosamente sí apreciamos un



aumento del peso con los tratamientos de melatonina y de EF. Aunque el porcentaje de peso del tejido adiposo blanco (WAT) no fue significativamente mayor en el grupo Tg, los tratamientos indujeron una considerable disminución de su valor, principalmente con el tratamiento de melatonina (ANOVA,  $F_{(4,42)}=5.644$ ,  $P=0.0010$ ) (Figura 23 A). Por su parte el tejido adiposo marrón (BAT) del grupo Tg fue el que menor porcentaje de peso representó y el mayor efecto también se obtuvo cuando los 3xTg-AD se trataron con melatonina (ANOVA,  $F_{(4,42)}=3.354$ ,  $P=0.0180$ ) (Figura 23 B). El timo (ANOVA,  $F_{(4,42)}=4.355$ ,  $P=0.0049$ ) (Figura 23 C) y las glándulas adrenales (ANOVA,  $F_{(4,42)}=8.987$ ,  $P<0.0001$ ) (Tabla 13) presentaron un menor porcentaje del peso total en los Tg. Solo la melatonina fue capaz de hacer recuperar el valor del timo. El EF favoreció la disminución del porcentaje de peso de las glándulas adrenales. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto al porcentaje de peso del bazo de los animales.

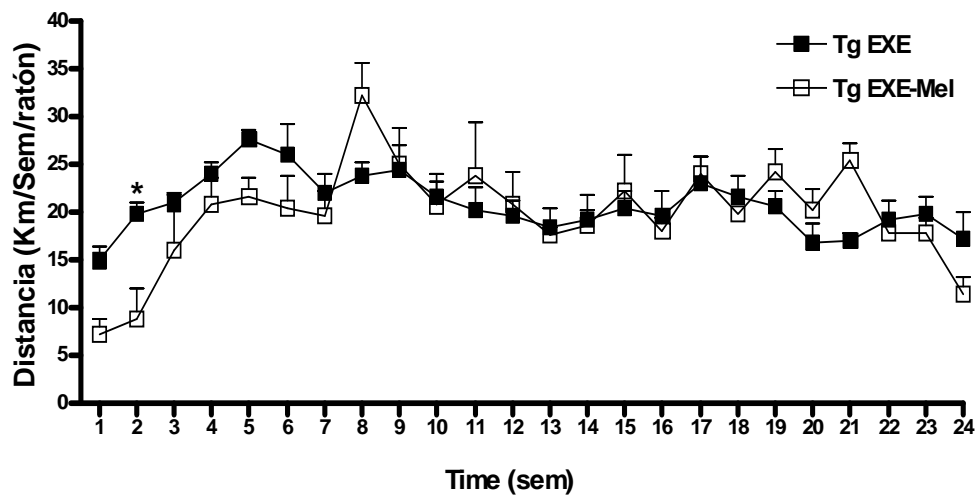


Figura 22. Distancia en la rueda de actividad. Se aprecia un pequeño efecto del tratamiento y de las semanas. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: Two-way ANOVA Bonferroni posttests, \* $p<0.05$  comparando Tg EXE al Tg EXE-Mel.

Tabla 12. Efectos de los tratamientos sobre la función sensorial y motora de los ratones machos 3xTg-AD.

	NTg (n=15)	Tg (n=13)	Tg Mel (n=10)	Tg EXE (n=14)	Tg EXE-Mel (n=7)
<b>Función sensorial y motora</b>					
<i>Prueba de reflejos</i>					
Incidencia de ambos reflejos	15/15	8/13	9/10	14/14	7/7
<i>Varilla de madera</i>					
Equilibrio (permanencia, s)	10.0± 1.4	18.2± 1.2***	18.6± 0.9***	19.9± 0.1***	20.0± 0.0***
Coordinación (distancia, cm)	0.2± 0.1	1.1± 0.1	1.2± 0.5	8.2± 1.3***, &&&	9.9± 1.8***, &&&
<i>Varilla de metal</i>					
Equilibrio (permanencia, s)	2.3± 0.7	2.7± 0.5	4.1± 0.6	6.1± 1.2***, #	5.7± 1.5
Coordinación (distancia, cm)	0± 0	0± 0	0± 0	1.1± 0.5	0.9± 0.5
<i>Cuerda de metal (2 ensayos, 5 s)</i>					
Fuerza (latencia de caída, s)	1.1± 0.3	2.7± 0.4***	3.1± 0.5***	2.7± 0.3***	2.6± 0.4*
Coordinación (distancia, cm)	0.03± 0.03	0.04± 0.04	0.10± 0.07	0.14± 0.11	0.07± 0.07
Elementos de soporte (n)	1.1± 0.04	1.7± 0.14***	1.9± 0.16***	2.1± 0.16***	2.1± 0.13***
<i>Cuerda de metal (1 ensayo, 60 s)</i>					
Fuerza (latencia de caída, s)	1.8± 0.5	11.8± 4.8	9.8± 5.7	3.5± 0.5	8.5± 4.7
Coordinación (distancia, cm)	0± 0	1.1± 0.7	0.7± 0.5	0.2± 0.1	0.9± 0.7
Elementos de soporte (n)	1.0± 0	2.0± 0.2***	1.9± 0.2***	2.4± 0.2***	2.4± 0.3***

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg; #p<0.05 comparando los tratamientos al Tg; &&&p<0.001 comparando Tg Mel a Tg EXE y a Tg EXE-Mel.

Tabla 13. Efecto de los tratamientos sobre la función inmuno-endocrina.

	NTg (n=15)	Tg (n=13)	Tg Mel (n=10)	Tg EXE (n=14)	Tg EXE-Mel (n=7)
<b>Supervivencia</b>	15/15	13/18	10/13	14/15	7/8
<b>Peso Corporal</b>					
Inicio del experimento (g)	30.1± 0.3	32.0± 1.0	31.1± 0.4	31.1± 0.5	30.6± 0.7
Final del experimento (g)	29.7± 0.6	30.7± 1.2	32.6± 0.9*	31.8± 0.7*	31.7± 1.0
WAT (% respecto peso corporal)	<i>Ver Figura 23 (A)</i>				
Adrenales (% respecto peso corporal)	0.07± 0.01	0.05± 0.01*	0.05± 0.01*	0.03± 0.00***, &	0.03± 0.00***
Bazo (% respecto peso corporal)	0.41± 0.04	0.37± 0.01	0.42± 0.07	0.39± 0.02	0.47± 0.06
BAT (% respecto peso corporal)	<i>Ver Figura 23 (B)</i>				
Thymus (% respecto peso corporal)	<i>Ver Figura 23 (C)</i>				

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg; &p<0.05 comparando Tg Mel a Tg EXE y a Tg EXE-Mel.

### 1.4. Patrones conductuales

A pesar de la consistencia de las medias, debido a la dispersión de los resultados no encontramos diferencias estadísticas en algunas de las evaluaciones conductuales realizadas (ver Tabla 14).

#### 1.4.1. Neofobia

El miedo a una nueva jaula de vida se hizo presente en los Tg con un significativo retraso en la exploración vertical de la misma (ANOVA,  $F_{(4,54)}=5.410$ ,  $P=0.0010$ ) (Figura 24 A) y un menor número de exploraciones de las esquinas (ANOVA,  $F_{(4,54)}=4.683$ ,  $P=0.0026$ ) (Figura 24 B). También se encontró afectada la actividad vertical total (ANOVA,  $F_{(4,54)}=2.735$ ,  $P=0.0381$ ; Student's test,  $P<0.05$ : NTg vs Tg) (Tabla 14). Los tres tratamientos influyeron positivamente en la recuperación de los patrones adecuados.

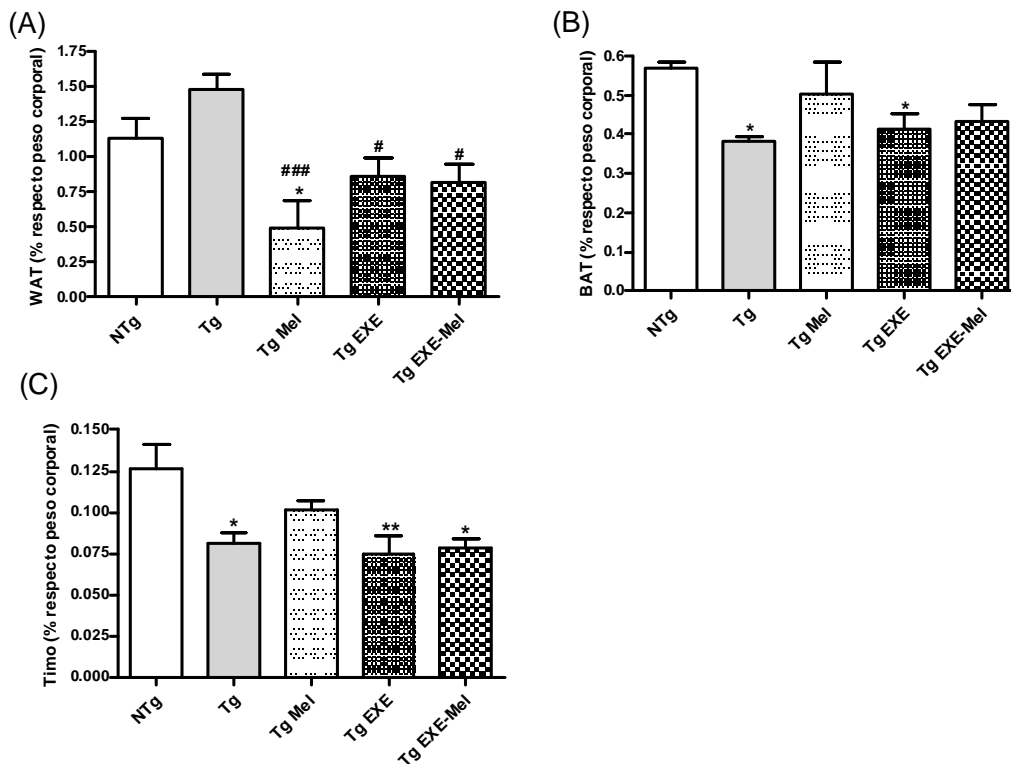


Figura 23. Afectación de la función inmuno-endocrina del ratón 3xTg-AD macho a los 12 meses de edad. Los datos se expresan en porcentaje. (A) Porcentaje respecto al peso corporal total de la WAT, (B) BAT, (C) Timo y (D) Adrenales. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  comparados al NTg; # $p<0.05$ , ### $p<0.001$  comparando los tratamientos al Tg.

Tabla 14. Afectaciones conductuales en los ratones 3xTg-AD macho a los 12 meses de edad y el efecto de los tratamientos.

	NTg (n=15)	Tg (n=13)	Tg Mel (n=10)	Tg EXE (n=14)	Tg EXE-Mel (n=7)
<b>Neofobia</b>					
Actividad vertical (latencia, s)	Ver Figura 24 (A)				
Números de corner (n)	Ver Figura 24 (B)				
Actividad vertical (n)	1.7± 0.5	0.3± 0.1	1.4± 0.4	1.8± 0.4	0.7± 0.4
<b>Campo abierto</b>					
Latencia de movimiento (s)	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Actividad horizontal (latencia, s)	1.7± 0.3	28.1± 23.8	2.5± 0.6	8.4± 3.0	4.4± 0.8
Entrada a periferia (latencia, s)	9.4± 4.7	57.2± 28.8	20.2± 8.7	21.1± 5.4	21.7± 14.1
Actividad vertical (latencia, s)	12.5± 2.5	66.5± 29.8	58.4± 30.0	16.0± 3.6	13.6± 2.4
Higiene (latencia, s)	136.6± 18.9	169.2± 22.5	124.7± 12.9	164.0± 18.3	132.6± 11.0
Actividad horizontal (n)	182.5± 15.2	122.0± 17.7**	85.3± 24.2***	66.2± 13.6***	64.6± 11.7***
Actividad vertical (n)	43.7± 4.0	19.4± 3.6***	19.9± 5.4***	19.2± 2.3***	20.6± 4.0***
Duración de la higiene (s)	5.8± 0.9	14.0± 4.8	7.4± 1.6	9.4± 1.6	11.7± 1.9
Orina (n)	Ver Figura 25 (A)				
Defecación (n)	Ver Figura 25 (B)				
<b>Caja oscura/iluminada</b>					
Salida al área blanca (latencia, s)	21.4± 7.7	43.0± 7.7	60.3± 27.9	27.1± 6.5	11.0± 3.9
Tiempo en área blanca (s)	150.7± 15.8	108.7± 14.6	113.5± 17.9	158.2± 20.4	136.4± 23.0
Entradas al área blanca (n)	7.5± 0.6	6.3± 0.7	5.1± 1.0	3.4± 0.7***, #	4.9± 0.8
Orina (n)	Ver Figura 26 (A)				
Defecación (n)	Ver Figura 26 (B)				
<b>Caja de 4 agujeros</b>					
Latencia de movimiento (s)	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Primera agujero (latencia, s)	5.2± 0.9	32.9± 12.5	30.5± 12.6	9.4± 3.2	5.3± 2.2
Cuatro agujeros (latencia, s)	58.3± 10.3	151.5± 29.7	115.6± 34.5	100.1± 29.1	117.0± 48.2
Tiempo de exploración (s)	25.7± 2.5	16.1± 3.1	32.2± 15.7	26.5± 2.4	27.0± 5.0
Número de exploraciones (n)	Ver Figura 27 (A)				
Orina (n)	Ver Figura 27 (C)				
Defecación (n)	Ver Figura 27 (D)				

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg; #p<0.05, ###p<0.01 comparando los tratamientos al Tg; &p<0.05, &&p<0.01 comparando Tg Mel con Tg EXE y Tg EXE-Mel.

#### 1.4.2. Campo abierto

Observamos evidentes afectaciones conductuales en el grupo Tg (ver Tabla 14) respecto a la motivación por la deambulación en el campo abierto, con una clara tendencia a presentar aumentada las latencias medidas y una disminución significativa de la actividad horizontal (ANOVA,  $F_{(4,54)}=9.154$ ,  $P<0.0001$ ) y vertical (ANOVA,  $F_{(4,54)}=9.168$ ,  $P<0.0001$ ). También se vio afectada significativamente la emotividad, representada por el aumento de las defecaciones (Student's test,  $P<0.05$ : NTg vs Tg, NTg vs Tg Mel) y de la orina (ANOVA,  $F_{(4,54)}=6.456$ ,  $P=0.0003$ ) (Figura 25). En

general, los tratamientos actuaron con una tendencia a mejorar las afectaciones observadas.

### 1.4.3. Caja oscura/iluminada

Los ratones del grupo Tg mostraron afectaciones en cuanto a los patrones relacionados con la ansiedad (ver Tabla 14). Presentaron la latencia de entrada al área blanca aumentada (Student's test,  $P < 0.05$ : NTg vs Tg), con un menor tiempo de permanencia en esta área (Student's test,  $P < 0.05$ : NTg vs Tg). Esta conducta se vio recuperada cuando el tratamiento llevó implícito el EF. En correspondencia con la prueba anterior (Campo abierto) también se encontró una clara afectación de la emotividad (ANOVA, orina:  $F_{(4,54)} = 5.191$ ,  $P = 0.0013$ ) (Figura 26).

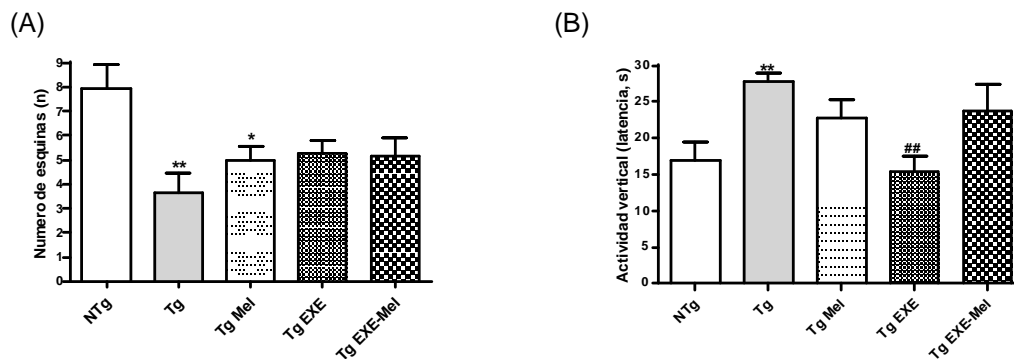


Figura 24. Neofobia. Los ratones 3xTg-AD machos de 12 meses de edad presentaron una conducta inadecuada frente a la nueva jaula de vida. Se observa el efecto beneficioso de los tratamientos. (A) Número de exploraciones de las esquinas, (B) Latencia de exploración vertical. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  comparados al NTg; ## $p < 0.01$  comparando los tratamientos al Tg.

### 1.4.4. Caja de 4 agujeros

La conducta exploratoria del grupo Tg se encontró disminuida, con un aumento de la latencia de inicio de exploración (Student's test,  $P < 0.05$ : NTg vs Tg), de la exploración de los 4 agujeros (Student's test,  $P < 0.01$ : NTg vs Tg), una disminución en el tiempo total de exploración de los agujeros (Student's test,  $P < 0.05$ : NTg vs Tg) y del número de exploraciones totales (ANOVA,  $F_{(4,54)} = 6.211$ ,  $P = 0.0003$ ) (ver Tabla 14 y Figura 27 A y B). Como en las dos pruebas anteriores aquí también se encontró alterada la emotividad (defecaciones: Student's test,  $P < 0.05$ : NTg vs Tg; orina: ANOVA,  $F_{(4,54)} = 3.166$ ,  $P = 0.0207$ ) (Figura 27 C y D). Los tratamientos que actuaron más adecuadamente fueron el EF voluntario y la combinación de este con la melatonina.

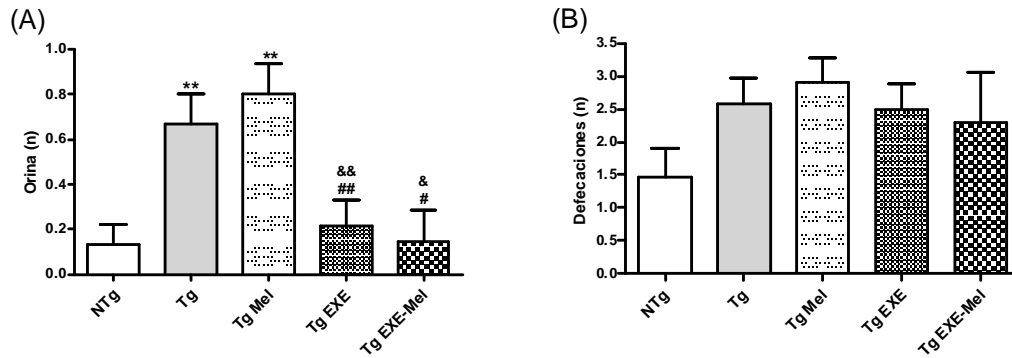


Figura 25. Campo abierto. Afectación de la emotividad de los ratones 3xTg-AD machos. Se observa un efecto beneficioso con los tratamientos que incluyeron EF. (A) Número de orinas, (B) Número de defecaciones. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*\* $p < 0.01$  comparados al NTg; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  comparando los tratamientos al Tg; & $p < 0.05$ , && $p < 0.01$  comparando el tratamiento de Mel contra EXE y EXE-Mel.

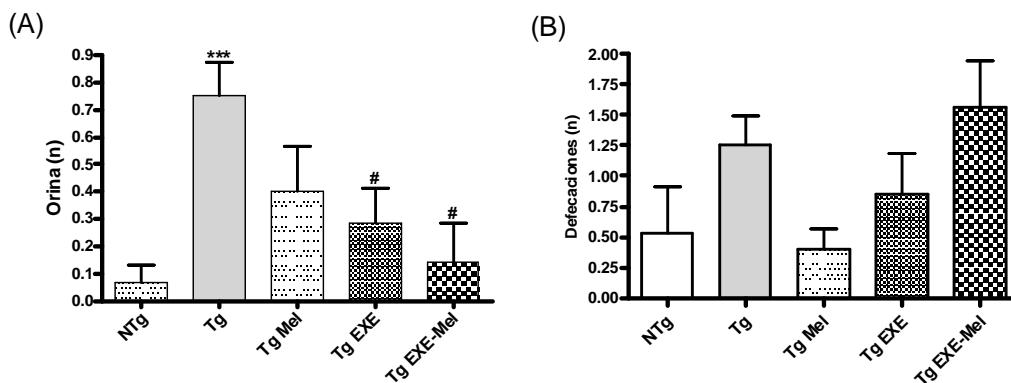


Figura 26. Caja oscura/iluminada. En correspondencia con el campo abierto aquí también se encontró afectada la emotividad de los 3xTg-AD. Efecto beneficioso de los tratamientos. (A) Número de orinas, (B) Número de defecaciones. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*\*\* $p < 0.001$  comparados al NTg; # $p < 0.05$  comparando los tratamientos al Tg.

### 1.5. Adquisición y retención del aprendizaje en el MWM

Al medir las latencias de llegada a la plataforma encontramos afectaciones en el aprendizaje de los 3xTg-AD. Se observó efecto entre los grupos (ANOVA,  $F_{(4,54)}=4.105$ ,  $P=0.0029$ ) y entre los días (ANOVA,  $F_{(4,325)}=31.51$ ,  $P < 0.0001$ ). Estas afectaciones se recuperaron con cualquiera de los tratamientos. Observamos que los ratones 3xTg-AD sin tratamientos presentaron las mayores latencias de llegada a la plataforma, a lo largo del período de aprendizaje, mientras que los demás grupos las bajaron adecuadamente. Los menores tiempos de llegada los encontramos con el grupo Tg EXE-Mel (Figura 28 A).

La afectación en el aprendizaje se tradujo en una mala retención por parte del grupo Tg (Figura 28 B). El grupo Tg Mel fue el que mayor retención mostró, estando significativamente más tiempo en el cuadrante de la plataforma que en el opuesto.

### 1.6. Evaluación del estado del estrés oxidativo cerebral

#### 1.6.1. Niveles de lípidos oxidados

Los niveles de oxidación lipídica se encontraron muy aumentados en el grupo Tg (Figura 29). Todos los tratamientos fueron eficaces en la disminución del exceso de estos niveles.

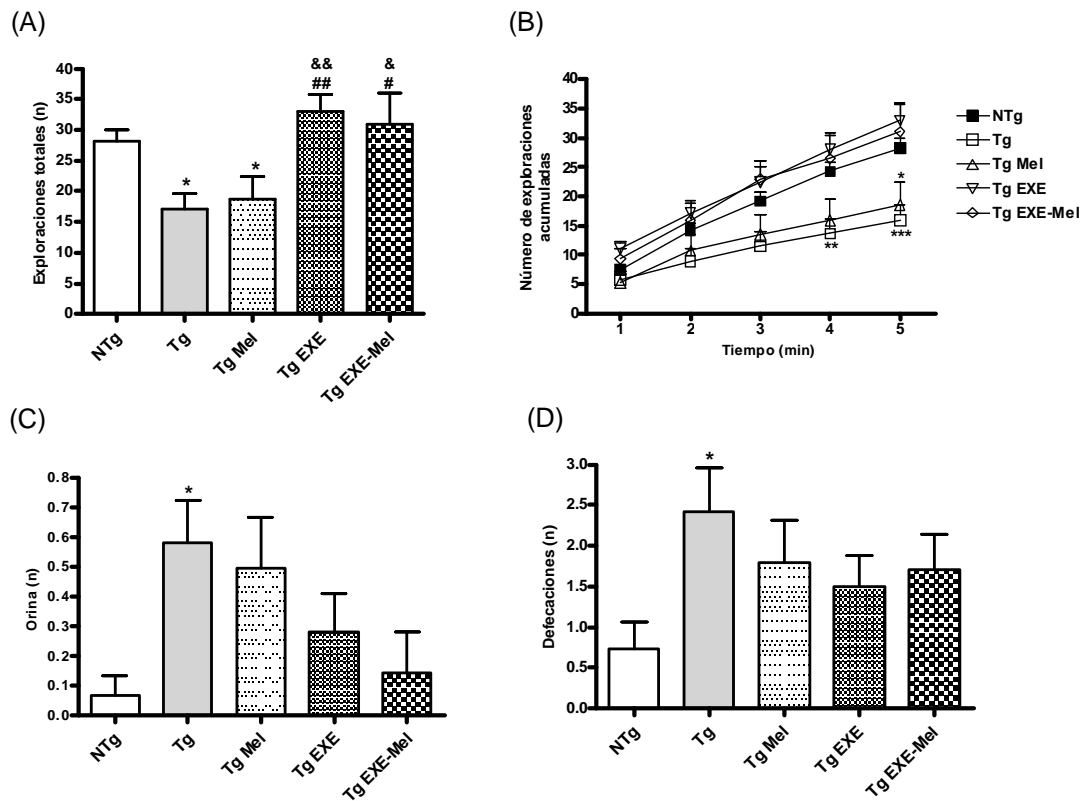


Figura 27. Caja de 4 agujeros. Afectaciones en la conducta exploratoria de los ratones 3xTg-AD machos de 12 meses de edad. Efecto beneficioso de los tratamientos. (A) Número total de exploraciones; (B) Número de exploraciones acumuladas en cada minuto; (C) Número de orinas y (D) Número de defecaciones. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test para A, C y D; Two-way ANOVA Bonferroni posttests para B; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparados al NTg; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  comparando los tratamientos al Tg y & $p < 0.05$ , && $p < 0.01$  comparando Mel contra EXE y EXE-Mel.

### 1.6.2. Niveles de GSH y GSSG

Los niveles de GSH se encontraron disminuidos significativamente en los ratones 3xTg-AD sin tratamiento pero no vimos diferencias respecto al control NTg en cuanto al GSSG (Figura 30 A y B). La relación GSH/GSSG en el grupo Tg se encontró con una clara tendencia a estar disminuida respecto al NTg (Figura 30 C). Los tratamientos aplicados actuaron en el sentido de la recuperación pero fue el tratamiento con melatonina el que produjo los mejores resultados.

### 1.6.3. Actividad enzimática antioxidante

En el grupo Tg los enzimas antioxidantes de la corteza cerebral presentaban disminuida significativamente su actividad (Figura 31 A-D). Todos los tratamientos fueron eficaces para recuperar la actividad enzimática pero la mejor respuesta la encontramos con el tratamiento de melatonina.

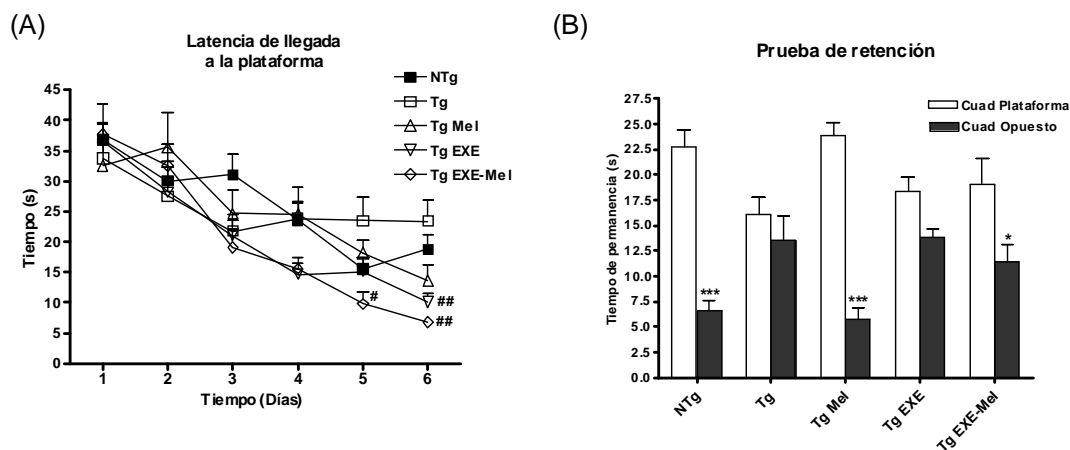


Figura 28. Laberinto acuático de Morris. Afectaciones cognitivas de los ratones 3xTg-AD machos de 12 meses de edad. Se observa el efecto beneficioso de los tratamientos. (A) Latencia de llegada a la plataforma (B) Retención del aprendizaje. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: Two-way ANOVA Bonferroni posttests, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  en la prueba de retención comparando tiempo de permanencia en el cuadrante plataforma contra el cuadrante opuesto; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  en la medición de las latencias de llegada a la plataforma comparando los tratamientos al Tg.

### 1.7. Western Blot

Mediante la técnica de western blot medimos, en el BO, la expresión del NMDAR2B y de la sinaptofisina. El subtipo R2B del receptor NMDA se encontró significativamente disminuido en el grupo Tg. Todos los tratamientos fueron efectivos en el aumento de los niveles del mismo, siendo la melatonina quien mejor actuó en su inducción (Figura 32 A). La sinaptofisina también se encontró significativamente disminuida en los ratones



del grupo Tg (Figura 32 B). La combinación de los dos tratamientos produjo un aumento significativo de esta proteína, respecto al grupo Tg, aunque los tratamientos individuales indujeron recuperación de los niveles de la misma.

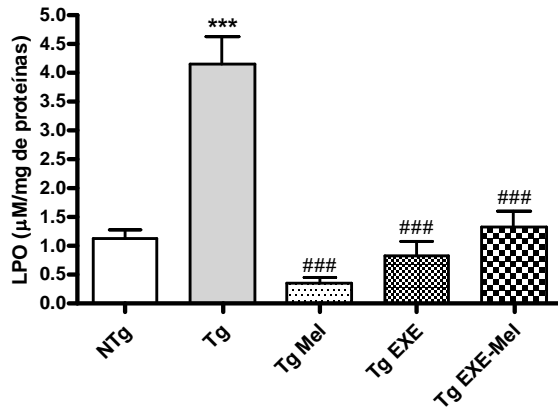


Figura 29. Niveles de lípidos oxidados. Se encontró un claro aumento de los LPO en el grupo Tg. Los tratamientos actuaron en el sentido de bajar el exceso de estos niveles. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*\*\* $p < 0.001$  comparados al NTg y ### $p < 0.001$  comparando los tratamientos al Tg.

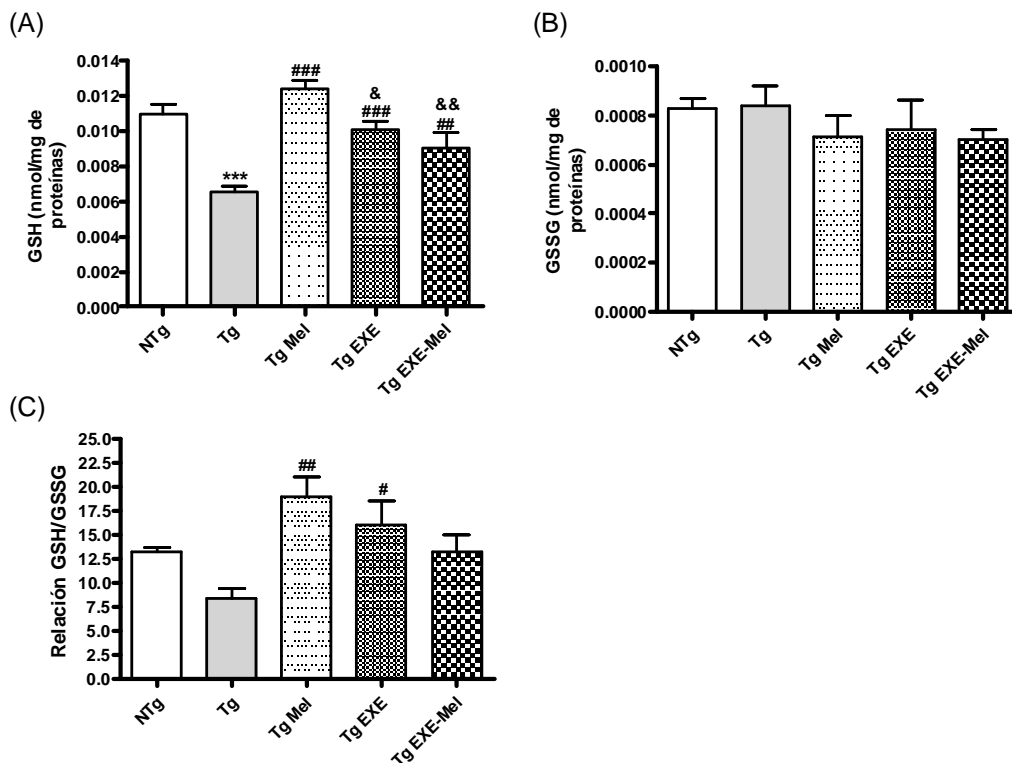


Figura 30. Niveles de glutatión. Los ratones 3xTg-AD presentaron afectaciones en el metabolismo del glutatión. Los tratamientos produjeron un efecto restaurador. (A) Glutatión Reducido, (B) Glutatión Oxidado y (C) Ratio GSH/GSSG. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*\*\* $p < 0.001$  comparados al NTg; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  comparando los tratamientos al Tg y & $p < 0.05$ , && $p < 0.01$  comparando Mel contra EXE y EXE-Mel.

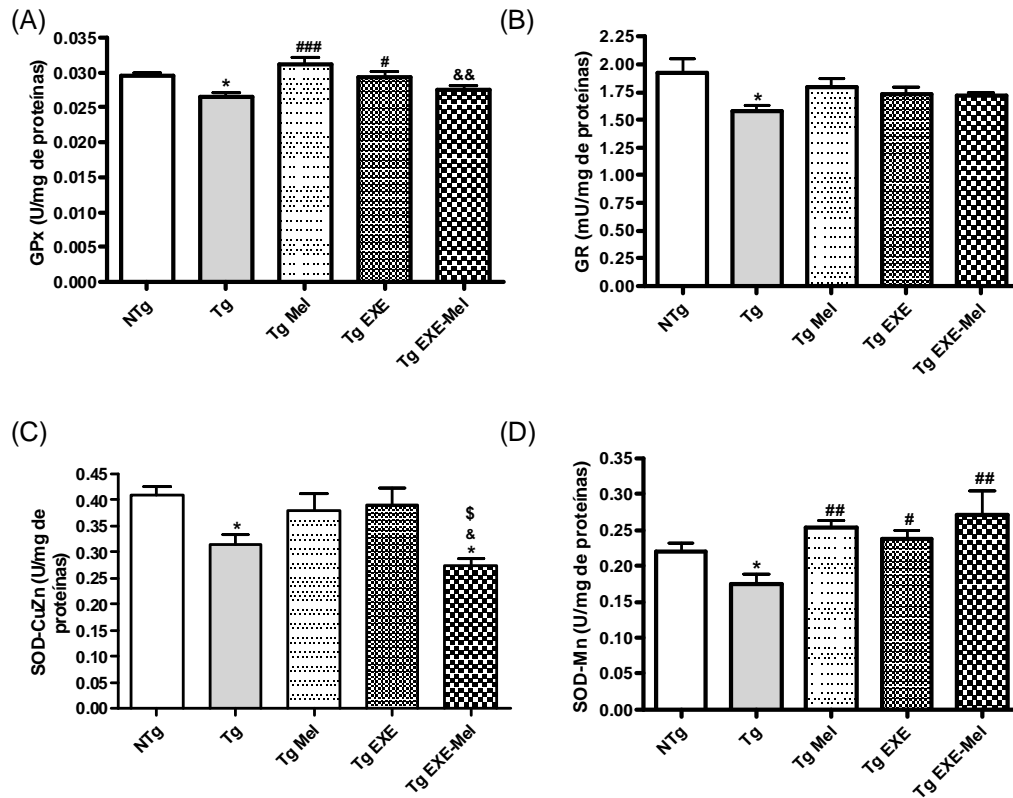


Figura 31. Actividad enzimática. Se muestran las afectaciones de la actividad enzimática de la corteza cerebral de los ratones 3xTg-AD machos a los 12 meses de edad. (A) Glutación Peroxidasa, (B) Glutación Reductasa, (C) Superóxido dismutasa-CuZn y (D) Superóxido dismutasa-Mn. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$  comparados al NTg; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  comparando los tratamientos al Tg; & $p < 0.05$ , && $p < 0.01$  comparando Mel contra EXE y EXE-Mel; \$ $p < 0.05$  comparando EXE contra EXE-Mel.

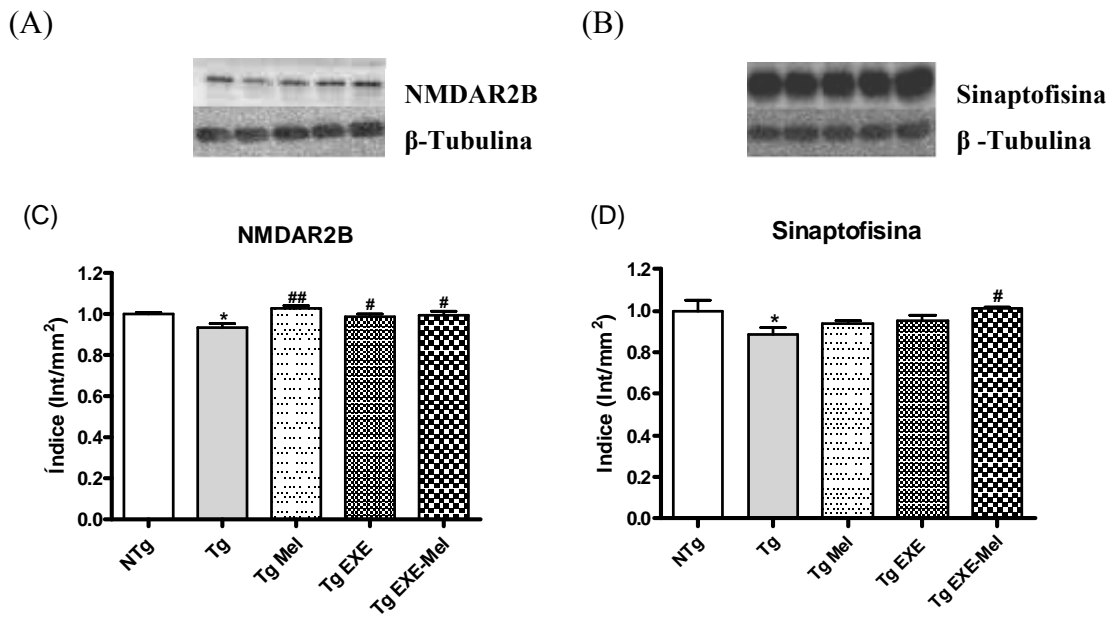


Figura 32. Western Blot. (A) y (B) Expresión proteica del NMDAR2B (anti-NMDAR2B 1: 500) y la Sinaptofisina (anti-sinaptofisina 1: 8 000), respectivamente, detectados por western blot (60  $\mu$ g prot/carril) en una muestra de BO. La  $\beta$ -Tubulina se utilizó como control de carga (1: 50 000). (C) y (D) Cuantificación de los niveles de expresión proteica del NMDAR2B y la Sinaptofisina, respectivamente. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$  comparados al NTg y # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  comparando los tratamientos al Tg.

## 2. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo ha sido determinar el valor terapéutico de un tratamiento de EF voluntario a largo plazo, o de melatonina, o de la combinación de ambos en la progresión de la EA. Para esto aplicamos los tratamientos en ratones machos 3xTg-AD desde los 6 hasta los 12 meses de edad. A los 6 meses de edad se ha visto que en estos animales hay una gran presencia de A $\beta$  intraneuronal y que comienzan a aparecer depósitos extracelulares de A $\beta$  en la corteza frontal (Oddo et al., 2003a; Giménez-Llort et al., 2010). En un trabajo anterior con animales de 7 meses de edad, observamos abundante A $\beta$  intraneuronal y tau hiperfosforilada en las neuronas del hipocampo y de la amígdala (Giménez-Llort et al., 2010). A la edad en que terminamos los tratamientos aplicados en el presente trabajo, se ha publicado que aparecen los ONF en la región CA1 (Oddo et al., 2003a). Por tanto ha sido buena la estrategia de aplicar los tratamientos entre estas edades, para valorar sus efectos sobre la progresión de la enfermedad en este modelo animal.

### **2.1. Ensayo de habilidades sensoriales y motoras**

En el trabajo de caracterización conductual de este modelo animal se muestra que la función sensorial y motora no se encuentra afectada en machos de 2.5 y 6 meses de edad; sin embargo, sí encuentran ciertas afectaciones en hembras de 12 meses (Giménez-Llort et al., 2007). En correspondencia con estos resultados, en el presente estudio observamos afectada la función sensorial en los ratones machos 3xTg-AD de 12 meses de edad.

Por otra parte, nuestros tratamientos aumentaron la coordinación y el equilibrio, en correspondencia con un trabajo que se ha publicado recientemente donde, al tratar con melatonina ratas envejecidas, encuentran una mejora de la coordinación motora en la prueba de rota-rod (Esteban et al., 2010). En otro trabajo, con un modelo de ratón carente del receptor MT1, observaron afectaciones sensoriales, vinculando la presencia de melatonina a las cualidades sensoriales adecuadas (Weil et al., 2006). En cuanto al efecto del EF podemos decir que en un trabajo anterior con este modelo animal, observamos mejoras de la coordinación y el equilibrio con un tratamiento de EF forzado (Giménez-Llort et al., 2010). Estas mejoras también las observamos en ratones más jóvenes en este mismo trabajo (Capítulo 1).

### **2.2. Función inmuno-endocrina**

Aunque en otros trabajos se ha visto una diferencia de peso entre los dos genotipos desde edades temprana (Giménez-Llort et al., 2007; 2010), nosotros no encontramos diferencias significativas entre el peso de los grupos a los 12 meses de edad. Sin embargo, el tejido adiposo blanco (WAT) del grupo Tg presentó el mayor porcentaje respecto al peso corporal. Cualquiera de los tratamientos disminuyó este porcentaje, hecho que concuerda con lo encontrado en los diferentes trabajos donde emplean el EF (Giménez-Llort et al., 2010; Sene-Fiorese et al., 2010). En el trabajo realizado por Sakurai y colaboradores en ratas, publicado en el 2010, encuentran que el EF suprime la habilidad de las células de la fracción vascular-estromal (SVF del inglés stromal-vascular fraction) de diferenciarse en adipocitos (Sakurai et al., 2010). Por su parte Bartness y colaboradores en una revisión que publican en el 2002 sugieren que la melatonina puede actuar, indirectamente, regulando la grasa corporal (incluidas WAT y BAT), a través del sistema nervioso simpático (Bartness et al., 2002). Aunque este tejido ha sido considerado la mayor reserva de energía para los mamíferos (Bjorntorp,

1991), el exceso de tejido adiposo es considerado un factor de riesgo mayor para muchas enfermedades, tales como la diabetes tipo 2, afectaciones cardiovasculares, hipertensión, isquemia, artritis y varios tipos de cáncer (ver ref. Bray and Bellanger, 2006). Es por esto que consideramos de gran importancia que los tratamientos aplicados actuaran disminuyendo la WAT.

Por su parte el tejido adiposo marrón (BAT) se ha relacionado con la eficiencia energética del organismo (ver ref. Cannon and Nedergaard, 2004) y con el mantenimiento de la temperatura corporal (Himms-Hagen, 1985). Además, se ha sugerido su implicación en la disminución de la obesidad (Tan et al., 2010; Seale, 2010). En nuestro trabajo el menor porcentaje del peso de BAT correspondió al grupo Tg, que además presentó la mayor aportación de WAT. En ambos casos el tratamiento con melatonina hizo que estos valores se recuperaran respecto al control NTg. En otros trabajos también se ha visto que el BAT es aumentado por la melatonina y que además puede aumentar la capacidad metabólica de los adipocitos marrones en los mamíferos (Tan et al., 2010). En cuanto a la capacidad del EF de actuar sobre el BAT, podemos decir que en un trabajo realizado con ratas jóvenes se muestra la superioridad del EF intermitente al continuo para aumentar la BAT y disminuir la WAT, aunque ambos tipos de EF fueron eficientes en este sentido (Sene-Fiorese et al., 2010). En nuestros animales no encontramos un efecto claro del EF sobre la BAT pero sí sobre la WAT.

Como referencia de posible afectación del estado funcional inmunológico tomamos el peso del timo, que presentó una involución en los ratones 3xTg-AD. Nuestros resultados han estado en correspondencia con lo realizado en otros trabajos con este modelo de la EA (Giménez-Llort et al., 2008; 2010), donde observaron una involución del timo a los 7 y 15 meses de edad. En nuestro estudio la melatonina fue capaz de aumentar el peso de este órgano, lo que ha estado de acuerdo con lo publicado por Pertsov en el 2006, que muestra que esta hormona puede hacer recuperar la involución del timo (Pertsov, 2006). No obstante, ya desde 1970 se había visto que en los animales pinealectomizados se producía una profunda desorganización histológica y la involución del timo (Csaba et al., 1970; Vaughan and Reiter, 1971; Csaba and Barath, 1975). Además, se ha visto que la melatonina puede actuar inhibiendo las vías apoptóticas en los timocitos (Hoiyman et al., 2004; Presman et al., 2006). Por su parte aunque el EF no recuperó la involución producida, pero como se ha comentado en el capítulo anterior se ha visto que el EF puede producir una sustancial redistribución de

las células T dentro y fuera de los órganos linfoides, haciendo que esta movilización pueda aumentar la vigilancia y actuación del sistema inmune (Krüger and Moren, 2007). Las glándulas adrenales también representaron un menor porcentaje del peso total en los ratones del grupo Tg, lo cual podría producir un mal funcionamiento del eje HPA y traducirse en afectaciones del ritmo circadiano, y por consiguiente conductuales, emocionales, sociales, cognitivas y de las funciones fisiológicas (Bob et al., 2008; Kiessling et al., 2010). Además, al envejecimiento se han asociado anomalías en la respuesta neuroendocrina al estrés, en particular con alteraciones en la función del eje HPA (Pedersen et al., 2001). Como ya se ha dicho, este eje es crucial para la regulación de la respuesta al estrés y a la ansiedad (De Kloet 2003; Muller et al., 2003).

Se ha sugerido que el EF podría influir en el buen funcionamiento del eje HPA (Stranahan et al., 2009), que podría producir una disminución de la liberación de cortisol y de esta manera actuar en la disminución del tejido adiposo visceral (Björntorp, 2001). Aunque nuestros tratamientos no aumentaron el peso de esta glándula, se ha visto que el EF puede aumentar la eficiencia de la misma (Campbell et al., 2010; Mazzardo-Martins et al., 2010). También se ha descrito que un corto período de tiempo de EF en rueda de actividad puede causar una hiperactividad del eje HPA, debido a un aumento de la sensibilidad de las glándulas adrenales a la ACTH, pero que la actividad del eje se restablece totalmente con un período largo de EF (Campbell et al., 2009). Además, ha sido publicado que el EF voluntario crónico puede reducir el impacto negativo de una situación estresante prolongada mediante la habituación del eje HPA, reduciendo la cantidad de glucocorticoides que se liberan al cerebro y al resto del organismo (Sasse et al., 2008). Por su parte la melatonina se ha visto muy relacionada con el adecuado funcionamiento del eje HPA, por ejemplo manteniendo el ritmo circadiano y jugando un importante papel en la respuesta adecuada frente a una situación estresante (Dagnino-Subiabre et al., 2006; Bob et al., 2008).

### **2.3. Patrones conductuales**

Las afectaciones conductuales, como el miedo a una nueva jaula de vida o las afectaciones relacionadas con la ansiedad o la exploración en los ratones 3xTg-AD ya han sido observadas en diferentes edades de este modelo animal (Giménez-Llort et al., 2007; 2010; García et al., 2009a,b). En el presente trabajo las terapias con EF influyeron positivamente en la recuperación de la fobia del animal, aunque en un trabajo previo con animales más jóvenes no se encontró un efecto beneficioso del EF sobre esta

conducta (Giménez-Llort et al., 2010). No obstante, debemos decir que en aquel trabajo el tratamiento empleado fue de EF forzado y de un corto período de tiempo (4 semanas) (Giménez-Llort et al., 2010). Recientemente se ha publicado un trabajo donde muestran que el EF voluntario, aplicado sobre otro modelo de ratón transgénico para la EA, fue superior al EF forzado en mejorar ciertos aspectos de la EA, como las afectaciones conductuales, la deposición de la placa y las deficiencias cognitivas (Yuede et al., 2009).

En el presente trabajo, así como en estudios anteriores realizados con este modelo animal y a diferentes edades, también observamos un efecto beneficioso del EF sobre las afectaciones conductuales (García et al., 2009a,b; Giménez-Llort et al., 2010). Ha sido publicado que el EF puede activar factores de crecimiento cerebrales, que pueden mejorar la proliferación y supervivencia neuronal y actuar positivamente sobre las afectaciones conductuales (ver refs. Cotman and Berchtold, 2002; Vaynman et al., 2004).

Hemos mostrado que los tratamientos que incluyeron EF influyeron satisfactoriamente en la recuperación de la mayoría de los patrones conductuales afectados, pero que el tratamiento con melatonina produjo pocas mejoras conductuales. Sin embargo, en varios trabajos han mostrado que la melatonina puede estar implicada en la regulación de la ansiedad, así como en la disminución de la neofobia y en la regulación de las conductas relacionadas con la emotividad (Kopp et al., 1999a,b; 2000a,b). El papel de la melatonina en modular muchos de los procesos biológicos, tales como la conducta o la función inmunológica, está recibiendo un aumento en su atención (ver ref. Macchi and Bruce, 2004) y se ha sugerido su papel en varios procesos conductuales como la percepción del dolor, la ansiedad y la depresión (Lakin et al., 1981; Kurtuncu et al., 2004; Mantovani et al., 2004). En el 2006 se publica un trabajo donde observan, en un modelo de ratón carente del receptor MT1, una disminución significativa de su actividad en el campo abierto, por lo que sugieren la relación de la melatonina con un patrón conductual adecuado (Weil et al., 2006). Se ha sugerido además que la melatonina puede influir sobre la conducta a través de su interacción con el sistema central de neurotransmisores, como por el ejemplo alterando la transmisión GABAérgica (Golombek et al., 1996). También podría actuar interaccionando con el sistema serotoninérgico, como antagonista del receptor de 5HT2c (Bourin et al., 2004).

#### **2.4. Adquisición y retención del aprendizaje en el MWM**

Cuando medimos las afectaciones cognitivas mediante el MWM encontramos que estas capacidades en el grupo Tg estaban considerablemente disminuidas y que los tratamientos producían recuperación, con una mayor significación en el Tg Mel. Estos resultados concuerdan con lo publicado por varios autores donde el tratamiento con melatonina ha producido mejoras cognitivas significativas en diferentes modelos animales (Manda et al., 2007; Olcese et al., 2009; Yang et al., 2010; Esteban et al., 2010) y este efecto protector también se ha observado en pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI del inglés, Mild cognitive impairment) tratados con melatonina (Furio et al., 2007). Esta acción de la melatonina se ha sugerido que podría ser a través de intervenir en la plasticidad sináptica y en la LTP, en el hipocampo y otras regiones cerebrales (Baydas et al., 2005; Larson et al., 2006a; Gorfine and Zisapel, 2007).

En cuanto a los efectos del EF sobre la actividad cognitiva podemos decir que ha sido publicado por muchos autores, un efecto beneficioso de este sobre la memoria y el aprendizaje, en diferentes modelos animales (Adlard et al. 2005; Parachikova et al., 2008; Nichol et al, 2007; 2009; García et al., 2009a; 2009b). Además, se ha visto la superioridad del EF voluntario sobre el forzado en la mejora de las afectaciones cognitivas en un modelo de ratón transgénico para la EA (Yuede et al., 2009). El efecto beneficioso del EF sobre la capacidad cognitiva también ha sido estudiada en humanos, por ejemplo en preadolescentes (Hilman et al., 2009) y en adultos viejos (Kramer et al., 1999). Se ha sugerido que el efecto beneficioso del EF sobre la memoria puede ser por su capacidad de preservar o aumentar la plasticidad sináptica, incrementando la liberación de factores neurotróficos (Neeper et al., 1995), disminuyendo el estrés oxidativo (Pratico et al., 2001; Yao et al., 2004) o indirectamente, mediante la mejora del sistema cardiovascular (Hicks and Birren, 1970; Colcombe et al., 2004).

#### **2.5. Evaluación del estado del estrés oxidativo cerebral**

Los tratamientos aplicados también fueron eficaces en la disminución del exceso de los niveles de oxidación lipídica, que se encontraron muy aumentados en los ratones del grupo Tg. Esto concuerda con varios trabajos investigativos, que han concluido que el tratamiento con melatonina es capaz de reducir significativamente los LPO (Manda et al., 2007; Dilek et al., 2010; Yang et al., 2010). Por otra parte este efecto protector también lo hemos observado en nuestros estudios con diferentes tratamientos de EF sobre este modelo animal (García et al., 2009a; 2009b; Giménez-Lort et al., 2010).



Además el efecto protector del EF para disminuir los lípidos y proteínas oxidadas también se ha sido observado en diferentes modelos animales (Ogonovszky et al., 2005; Radak et al., 2001a).

Al medir la actividad enzimática antioxidante en una muestra de corteza cerebral encontramos que en el grupo Tg todas las enzimas presentaban disminuida significativamente su actividad y que los tratamientos fueron eficaces para recuperar la actividad de estas. Muchos trabajos investigativos han mostrado a la melatonina como una hormona con una potente capacidad de detoxificar una amplia variedad de ROS, en muchos estados patofisiológicos y en diferentes tipos de muestras (Allegra et al., 2003; Tan et al., 2007; Hibaoui et al., 2009; Dilek et al., 2010). Se ha visto que la melatonina es capaz de regular muchas de las enzimas antioxidantes (Rodríguez et al., 2004; Tan et al., 2007; Tomás-Zapico and Coto-Montes 2008; Olcese et al., 2009). En el 2003 se publicó un trabajo donde se muestra el efecto protector de la melatonina como antioxidante e inhibidor de la formación de A $\beta$  en un modelo transgénico para la EA (Matsubara et al., 2003). Además, Manda et al. en el 2007 muestran que la melatonina protege de los daños oxidativos producidos por la exposición a radiaciones T, mejorando los niveles cerebrales de GSH y disminuyendo los LPO. Nuestros resultados concuerdan con estas evidencias que muestran la melatonina como un potente antioxidante.

En cuanto al EF voluntario podemos decir que se ha visto que este disminuye el estrés oxidativo periférico en humanos y en animales (Gómez-Cabrera et al., 2008) y el daño oxidativo cerebral en animales envejecidos (Cui et al., 2007; Opii et al., 2008). En el presente trabajo (Capítulo 1) y en trabajos previos con este modelo animal, aplicando diferentes terapias de EF, hemos observado su efecto regulador sobre las enzimas antioxidantes (García et al., 2009a; 2009b; Giménez-Lort et al., 2010).

Consideramos de gran importancia que las SOD se hayan activado con los tratamientos ya que se ha visto que en un modelo de ratón transgénico para la EA, comprometido para la SOD-CuZn, se incrementó considerablemente el estrés oxidativo (Schuessel et al., 2005); mientras que en otro trabajo la sobreexpresión de esta enzima protegió contra la toxicidad producida por A $\beta$  “*in vitro*” (Celsi et al., 2004). También se ha visto que una inactivación parcial de la SOD-Mn en otro modelo de ratón transgénico para la EA potencia la patología neuronal y la disfunción vascular con un aumento de las afectaciones cognitivas (Esposito et al., 2006).

## 2.6. Western Blot

Se ha sugerido que el subtipo R2B del receptor NMDA es de los más importantes para las funciones de memoria (Tang et al., 1999; Clayton et al., 2002; Bartlett et al., 2007). En el presente trabajo, cuando medimos los niveles del receptor NR2B, encontramos que estaban significativamente disminuidos en los ratones machos 3xTg-AD de 12 meses de edad y que los tratamientos actuaban positivamente en el restablecimiento de los niveles del mismo. Estos resultados están en correspondencia con lo publicado por otros investigadores, que muestran que el tratamiento con melatonina puede hacer aumentar los niveles del subtipo R2B del receptor NMDA (Sutcu et al., 2006; Dilek et al., 2010). Por otra parte, la capacidad del EF voluntario de actuar sobre la subunidad NR2B también ha sido descrita (Farmer et al., 2004). Además, se ha comprobado que aumenta la capacidad de inducir LTP “*in vitro*” e “*in vivo*”, en animales adultos (Christie et al., 2005; Farmer et al., 2004; van Praag et al., 1999).

Mediante western blot también encontramos que la sinaptofisina estaba disminuida significativamente en el BO. En los ratones 3xTg-AD esta proteína se ha encontrado disminuida en el córtex a los 7 meses de edad (Hedberg et al., 2010), pero en el capítulo anterior mostramos que no lo observamos así en el hipocampo. No obstante, los ratones utilizados en este capítulo tenían 12 meses de edad al terminar el experimento y es muy posible que con la edad aumentaran las afectaciones cerebrales. Esto estaría en correspondencia con el aumento de las afectaciones conductuales, que en este trabajo se han mostrado que se producen con el avance de la edad.

En cuanto a la recuperación de los niveles de sinaptofisina podemos decir que en investigaciones recientes se ha demostrado que la melatonina puede aumentar la cantidad de esta proteína en diferentes zonas del cerebro de roedores (Kaewsuk et al., 2009; Yang et al., 2010). Por otra parte el EF también se ha visto que es capaz de aumentar proteínas pre- y post-sinápticas (Hu et al., 2009), incluyendo entre estas la sinaptofisina (Vaynman et al., 2004; Hescham et al., 2009; Macías et al., 2009). Además, también ha sido descrito que el EF puede aumentar la neurogénesis y la sinaptogénesis (van Praag et al., 1999; 2005; Eadie et al., 2005).

El aumento de la sinaptofisina por ambos tratamientos independientes podría causar un efecto sinérgico con la combinación de ambos y ser la causa de su aumento significativo en el BO de los animales Tg EXE-Mel. Un sinergismo similar entre estos tratamientos ha sido observado en un modelo de lesión de la médula espinal (SCI del inglés spinal cord injury) con una recuperación significativa de sus afectaciones (Park et al., 2010).

### **CAPÍTULO 3. EFECTO TERAPÉUTICO DEL EJERCICIO FÍSICO VOLUNTARIO EN RATONES HEMBRAS 3xTg-AD DE AVANZADA EDAD**

#### **1. RESULTADOS**

En este experimento utilizamos ratones hembras NTg y 3xTg-AD de 12 a 15 meses de edad. A los 12 meses la mitad de los animales se colocaron, formando grupos de 4 ó 5, en jaulas con libre acceso a una rueda de actividad por un período de 3 meses (NTg EXE y Tg EXE) y la otra mitad se utilizó como control sin ejercicio (NTg SED y Tg SED).

##### **1.1. Distancia recorrida en la rueda de actividad**

La distancia promedio recorrida por cada ratón en cada semana se estimó como en el capítulo anterior, según el número de los ratones en cada caja y los recuentos de cada rueda (Figura 33). El grupo Tg EXE recorrió mayor distancia cada semana durante los 3 meses de tratamiento que el grupo NTg EXE. Se produjo un efecto del genotipo y una interacción entre las semanas (ANOVA, genotipo  $F_{(1,208)}=91.04$ ,  $P<0.0001$ ; semanas  $F_{(12,208)}=10.71$ ,  $P<0.0001$ ).

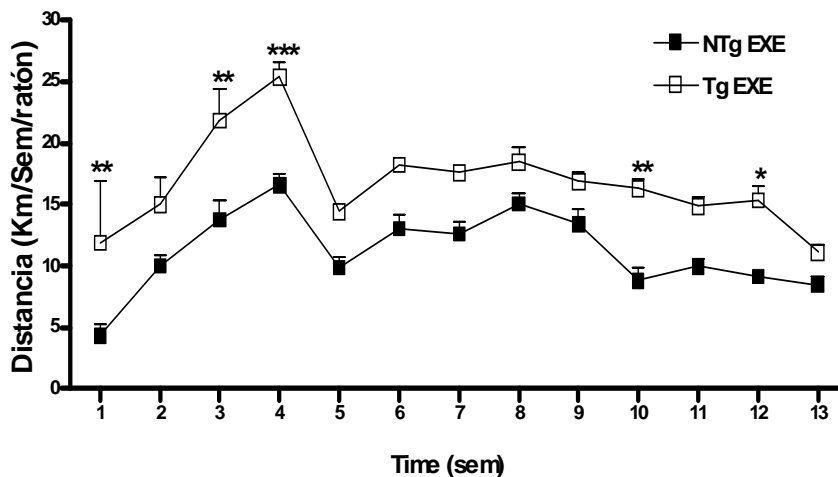


Figura 33. Distancia en la rueda de actividad. Se aprecia un efecto del genotipo y de las semanas. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: Two-way ANOVA Bonferroni posttests, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  comparando NTg EXE al Tg EXE.

### 1.2. Función sensorial y motora

Los ratones 3xTg-AD no presentaron afectaciones sensoriales ni motoras. En la Tabla 15 se observan los efectos beneficiosos del EF voluntario, tanto en los ratones NTg como en los 3xTg-AD.

Tabla 15. Efectos beneficiosos del EF sobre la función sensorial y motora en ratones hembras de 15 meses de edad.

	NTg SED (n=9)	NTg EXE (n=9)	Tg SED (n=9)	Tg EXE (n=9)
<b>Función sensorial y motora</b>				
<i>Prueba de reflejos</i>				
Incidencia de ambos reflejos	9/9	8/9	8/9	8/9
<i>Varilla de madera</i>				
Equilibrio (permanencia, s)	12.2± 2.3	18.1± 1.5**	19.3± 0.8**	20.0± 0.0**
Coordinación (distancia, cm)	0.3± 0.3	0.8± 0.3	0.2± 0.1	1.8± 0.5*,###
<i>Varilla de metal</i>				
Equilibrio (permanencia, s)	0.9± 0.1	2.2± 0.9	2.7± 0.8	8.6± 1.2***,###
Coordinación (distancia, cm)	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
<i>Cuerda de metal (2 ensayos 5s)</i>				
Fuerza (latencia de caída, s)	1.8± 0.4	2.9± 0.4	3.1± 0.4	4.2± 0.4**
Coordinación (distancia, cm)	0.1± 0.1	0.3± 0.3	0± 0	0.2± 0.1
Elementos de soporte (n)	1.5± 0.2	1.7± 0.1	1.8± 0.2	2.1± 0.2
<i>Cuerda de metal (1 ensayo 60s)</i>				
Fuerza (latencia de caída, s)	1.2± 0.2	4.0± 1.0	25.4± 8.8*	27.9± 8.6*
Coordinación (distancia, cm)	0± 0	0± 0	1.0± 0.5	1.8± 0.6*
Elementos de soporte (n)	1.3± 0.2	1.8± 0.3	2.6± 0.2**	2.5± 0.2**

Nota: Se muestran las medias ± SEM, n=9. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparados al NTg SED; ##p<0.01, ###p<0.001 Tg SED comparado al Tg EXE.

### 1.3. Función inmuno-endocrina

El peso corporal de los NTg SED y de los Tg SED no fue significativamente diferente. Sin embargo, el EF produjo una disminución significativa del peso corporal en ambos genotipos (ANOVA,  $F_{(3,31)}=17.64$ ,  $P=0.0010$ ) (Figura 34 A). La aportación al peso corporal del WAT de los Tg SED fue significativamente mayor (ANOVA,  $F_{(3,31)}=5.320$ ,  $P=0.0002$ ) (Figura 34 B). Por otra parte, se detectó que los Tg SED presentaban aumentado el peso del bazo, respecto de los NTg SED, con un porcentaje de aportación al peso corporal significativamente mayor (ANOVA,  $F_{(3,31)}=4.119$ ,  $P=0.0144$ ) (Figura 34 C). El timo de los Tg SED mostró una tendencia a representar un menor porcentaje

del peso corporal respecto de los NTg (ANOVA,  $F_{(3,31)}=3.623$ ,  $P=0.0237$ ) (Figura 34 D). El BAT se observó disminuido en los Tg SED (Student's test,  $P<0.05$ : NTg SED vs Tg SED) (Tabla 16). No se observaron variaciones en el peso de las glándulas adrenales, ni del gastrocnemius y el soleus de los grupos. En todas las afectaciones el EF produjo recuperación o mejora de los valores alterados.

Tabla 16. Efecto del tratamiento de EF sobre la función inmuno-endocrina.

	NTg SED (n=9)	NTg EXE (n=9)	Tg SED (n=8)	Tg EXE (n=9)
<b>Peso Corporal</b>				
Inicio del experimento (g)	Ver Figura 34 A			
Final del experimento (g)	Ver Figura 34 A			
WAT (% respecto peso corporal)	Ver Figura 34 B			
Adrenales (% respecto peso corporal)	0.06± 0.01	0.07± 0.01	0.06± 0.01	0.06± 0.01
Bazo (% respecto peso corporal)	Ver Figura 34 C			
Timo (% respecto peso corporal)	Ver Figura 34 D			
BAT (% respecto peso corporal)	0.50± 0.08	0.38± 0.08	0.27± 0.05	0.31± 0.05
Gastrocnemius (% respecto peso corporal)	0.46± 0.07	0.35± 0.09	0.47± 0.06	0.37± 0.08
Soleus (% respecto peso corporal)	0.07± 0.01	0.06± 0.02	0.08± 0.01	0.06± 0.01

Nota: Estadística, One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test. Se muestran las medias ± SEM.

#### 1.4. Patrones conductuales

Como en los dos capítulos anteriores, debido a la dispersión de los resultados no encontramos diferencias estadísticas en algunas de las evaluaciones conductuales realizadas (ver Tabla 17).

##### 1.4.1. Neofobia

No se apreciaron diferencias entre los grupos en la exploración a una nueva jaula de vida (Tabla 17).

##### 1.4.2. Campo abierto

Ante la exposición de los ratones hembras 3xTg-AD de 15 meses de edad a un ambiente desconocido, observamos una conducta totalmente afectada (Figura 35 y Tabla 17). El grupo Tg SED mostró una inhibición de las latencias de exploración horizontal (ANOVA,  $F_{(3,32)}=4.240$ ,  $P=0.0124$ ), de exploración vertical (ANOVA,  $F_{(3,32)}=4.861$ ,  $P=0.0067$ ) y de llegada a la periferia (ANOVA,  $F_{(3,32)}=3.403$ ,  $P=0.0294$ ). También mostraron una disminución de la exploración horizontal (ANOVA,  $F_{(3,32)}=4.431$ ,  $P=0.0103$ ) y de la vertical del campo abierto (ANOVA,  $F_{(3,32)}=2.924$ ,

$P=0.0488$ ). El tratamiento de EF voluntario hizo que los 3xTg-AD se recuperaran de las afectaciones conductuales (Figura 35 A-F).

Tabla 17. Afectaciones conductuales en los ratones 3xTg-AD a los 12 meses de edad y el efecto de los tratamientos.

	NTg SED (n=9)	NTg EXE (n=9)	Tg SED (n=9)	Tg EXE (n=9)
<b>Neofobia</b>				
Actividad vertical (latencia, s)	21.6± 3.2	21.0± 3.6	21.9± 3.4	18.4± 3.8
Números de corner (n)	5.8± 1.1	4.7± 1.1	5.3± 1.8	5.9± 1.8
Actividad vertical (n)	0.9± 0.5	1.0± 0.4	1.7± 0.9	1.3± 0.5
<b>Campo abierto</b>				
Latencia de movimiento (s)	0± 0	0± 0	0.4± 0.3	0± 0
Actividad horizontal (latencia, s)	<i>Ver Figura 35 A</i>			
Entrada a periferia (latencia, s)	<i>Ver Figura 35 B</i>			
Actividad vertical (latencia, s)	<i>Ver Figura 35 C</i>			
Higiene (latencia, s)	<i>Ver Figura 35 D</i>			
Actividad vertical (n)	<i>Ver Figura 35 E</i>			
Actividad horizontal (n)	<i>Ver Figura 35 F</i>			
Duración de la higiene (s)	8.6± 1.2	8.2± 1.7	3.2± 0.8*	7.6± 1.2 <sup>#</sup>
Defecación (n)	1.4± 0.4	2.1± 0.6	1.8± 0.4	2.2± 0.6
<b>Caja oscura/iluminada</b>				
Entrada al área blanca (latencia, s)	<i>Ver Figura 36 A</i>			
Tiempo en área blanca (s)	<i>Ver Figura 36 B</i>			
Entradas al área blanca (n)	4.2± 0.6	3.4± 0.9	5.6± 0.7	3.8± 0.7
Defecación (n)	1.8± 0.8	2.1± 0.7	2.4± 0.5	1.3± 0.6
<b>Caja de 4 agujeros</b>				
Latencia de movimiento (s)	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Primer agujero (latencia, s)	13.2± 4.6	16.6± 7.9	5.9± 1.5	15.0± 8.9
Cuatro agujeros (latencia, s)	57.5± 8.1	161.2± 2.0*	172.3± 33.1*	90.0± 17.0
Tiempo de exploración (s)	47.2± 9.1	58.2± 16.7	81.9± 30.6	96.8± 33.1
Número de exploraciones (n)	<i>Ver Figura 37 A</i>			
Defecación (n)	0.8± 0.4	2.1± 0.4	3.3± 0.7*	1.9± 0.7

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p<0.05$  comparados al NTg; <sup>#</sup> $p<0.05$  Tg SED comparado al Tg EXE.

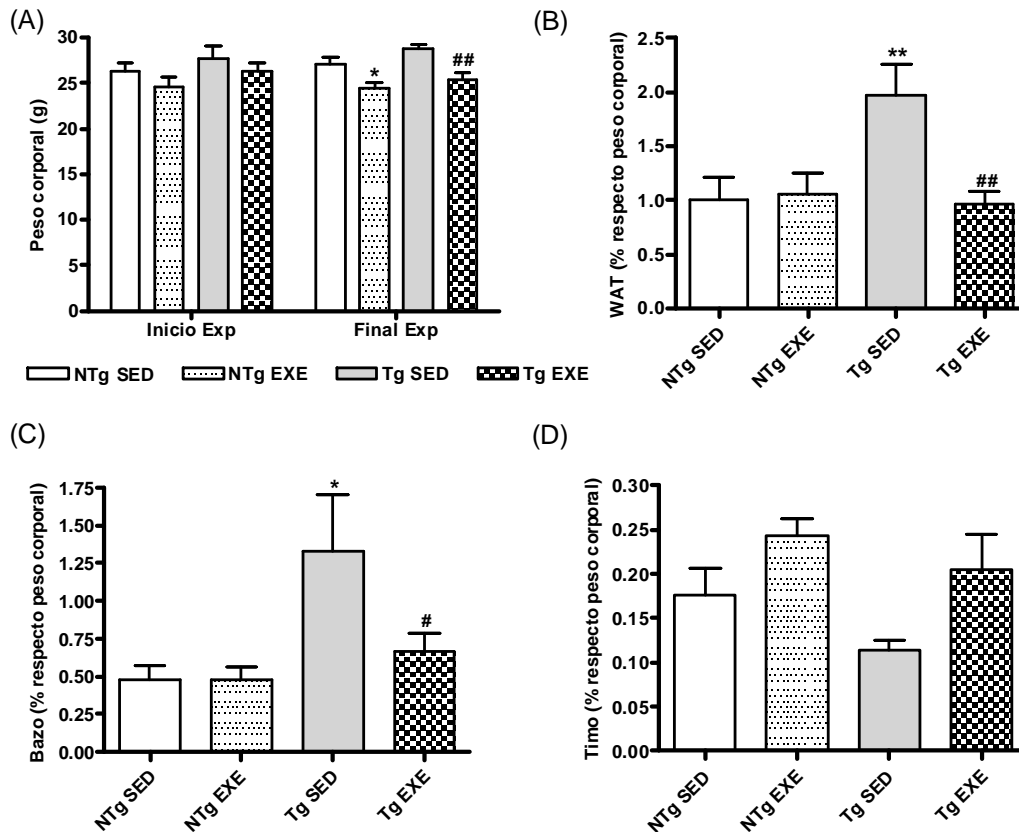


Figura 34. Afectación de la función inmuno-endocrina del ratón 3xTg-AD hembra a los 15 meses de edad. (A) Peso corporal al inicio y final del experimento, (B), (C) y (D) Porcentaje de aportación al peso corporal total del tejido adiposo blanco (WAT), Bazo y Timo. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  comparados al NTg SED; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  comparando Tg SED y Tg EXE.

### 1.4.3. Caja oscura/iluminada

En esta prueba observamos un perfil ansioso en los ratones Tg SED, dado que presentaron mayor latencia de salida al lado iluminado (ANOVA,  $F_{(3,32)}=4.403$ ,  $P=0.0106$ ) y que fueron los que menos tiempo estuvieron explorando esta zona (ANOVA,  $F_{(3,32)}=2.933$ ,  $P=0.0483$ ) (Figura 36 A y B) (Tabla 17). No obstante, los Tg SED realizaron más entradas al área en cuestión (Figura 36 C), aunque el número total de entradas no fue significativamente diferente de los demás grupos. El EF produjo un efecto terapéutico.

### 1.4.4. Caja de 4 agujeros

En la Tabla 17 y en la Figura 37 se puede observar que los ratones Tg SED presentaron una conducta exploratoria inadecuada. Este grupo presentó la mayor latencia de exploración de los 4 agujeros (ANOVA,  $F_{(3,32)}=4.973$ ,  $P=0.0060$ ). Además, el número

de exploraciones totales realizadas por los Tg SED fue significativamente menor (ANOVA,  $F_{(3,32)}=5.800$ ,  $P=0.0028$ ). En esta prueba los ratones Tg SED mostraron afectaciones de la emotividad, con un aumento significativo de las defecaciones (ANOVA,  $F_{(3,32)}=3.620$ ,  $P=0.0234$ ). La terapia de EF actuó positivamente en la recuperación de los patrones conductuales de exploración.

### **1.5. Adquisición y retención del aprendizaje en el MWM**

En la prueba de aprendizaje en el MWM no observamos diferencias entre los grupos, ya que todos bajaron de manera muy similar las latencias de llegada a la plataforma (Figura 38 A). Se observó un efecto entre los días (ANOVA,  $F_{(4,155)}=3.107$ ,  $P=0.0171$ ). Cuando realizamos la prueba de retención encontramos que los ratones Tg SED presentaban problemas de memoria, al no recordar en que cuadrante debía encontrarse la plataforma. El tratamiento de 3 meses de EF, aplicado en hembras de 12 meses de edad, produjo una tendencia a la recuperación de la capacidad cognitiva (Student's test, Tg EXE  $P<0.05$ : CO vs CP) (Figura 38 B).

### **1.6. Evaluación del estado de estrés oxidativo cerebral**

#### **1.6.1. Niveles de lípidos oxidados**

En la Figura 39 se muestra que los ratones Tg SED hembras de 15 meses de edad presentaron un aumento significativo de los niveles de lípidos oxidados y que el EF hizo que estos niveles se restablecieran respecto a los controles NTg SED.

#### **1.6.2. Niveles de GSH y GSSG**

Al determinar los niveles de GSH y GSSG encontramos un aumento significativo del glutatión oxidado en el grupo Tg SED respecto del NTg SED (Figura 40). El tratamiento hizo que se recuperaran los niveles adecuados de acuerdo con el grupo control NTg SED.



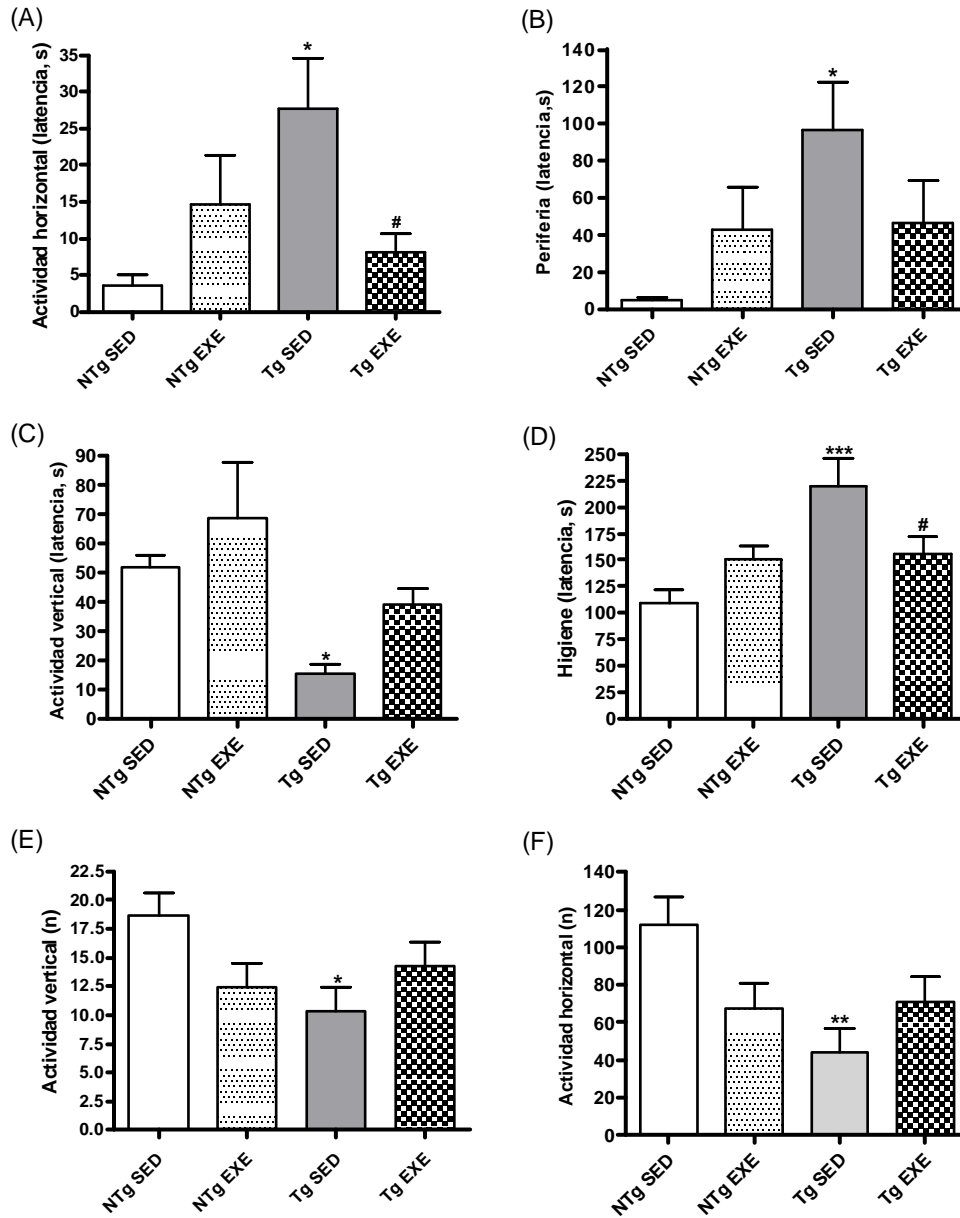


Figura 35. Campo abierto. Afectaciones de la conducta de los ratones 3xTg-AD hembras de 15 meses de edad. Efecto beneficioso de un tratamiento de 3 meses de EF. (A) Latencia de exploración horizontal, (B) Latencia de llegada a la periferia, (C) Latencia de exploración vertical, (D) Latencia de inicio de la higiene, (E) Actividad vertical total y (F) Actividad horizontal total. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparados al NTg SED; # $p < 0.05$  comparando Tg SED y Tg EXE.

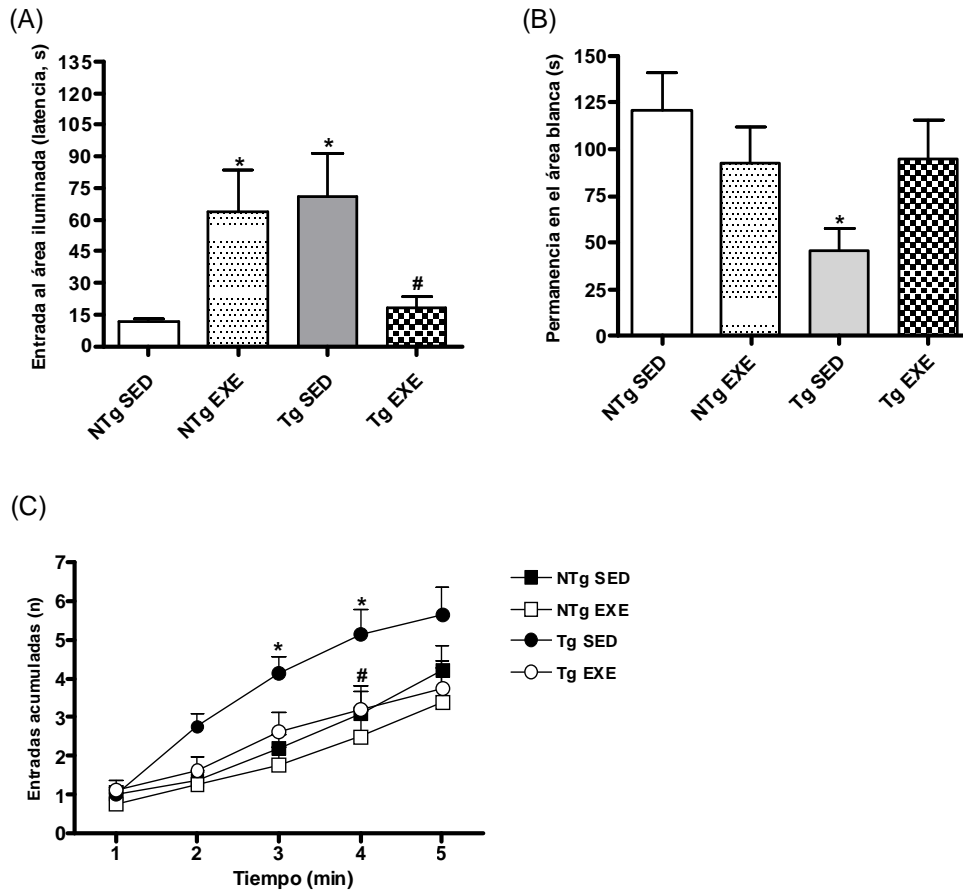


Figura 36. Caja oscura/iluminada. Se aprecia una conducta ansiosa en el grupo Tg SED. El EF mostró propiedades ansiolíticas. (A) Latencia de salida al área iluminada; (B) Tiempo de permanencia en el área blanca, One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test. (C) Entradas al área iluminada acumuladas en cada minuto, Two-way ANOVA Bonferroni posttests. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: \* $p < 0.05$  comparados al NTg SED; # $p < 0.05$  comparando Tg SED y Tg EXE.

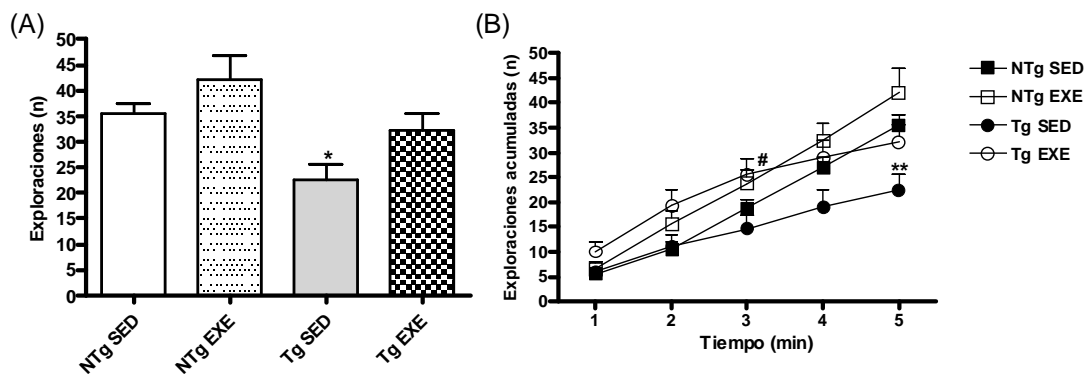


Figura 37. Caja de 4 agujeros. Afectaciones en la conducta exploratoria de los ratones 3xTg-AD hembras de 15 meses de edad. Aumento de la exploración con el tratamiento de EF. (A) Número de exploraciones de los agujeros, One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test. (B) Número de exploraciones acumuladas en cada minuto, Two-way ANOVA Bonferroni posttests. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  comparados al NTg SED; # $p < 0.05$  comparando al Tg SED y al Tg EXE.

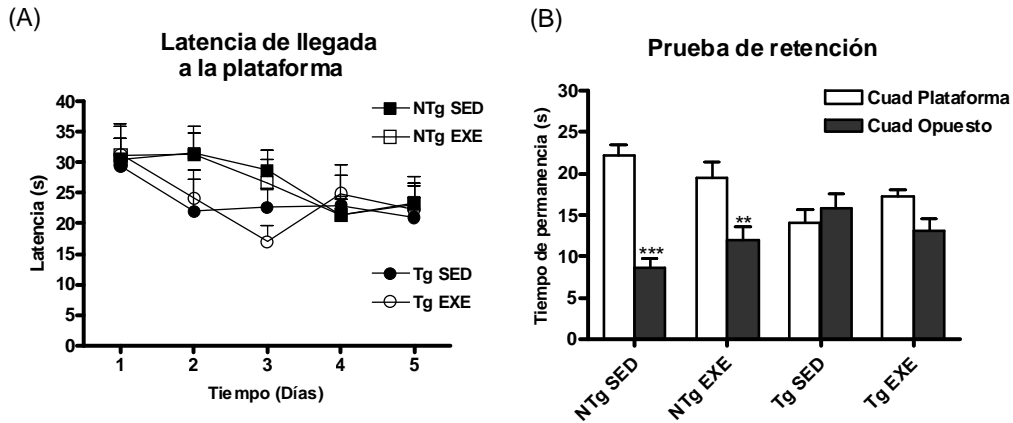


Figura 38. Laberinto acuático de Morris. Afectaciones cognitivas de los ratones 3xTg-AD hembras de 15 meses de edad. El EF produjo cierta recuperación. (A) Latencia de llegada a la plataforma. (B) Retención del aprendizaje. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: Two-way ANOVA Bonferroni posttests, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparando tiempo de permanencia en el cuadrante plataforma contra el cuadrante opuesto.

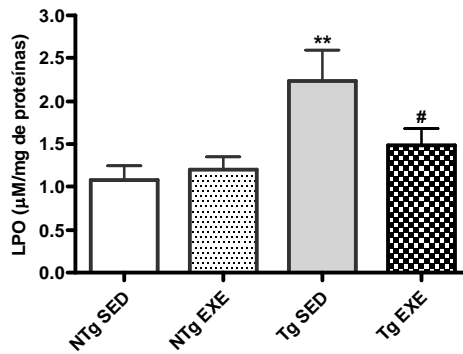


Figura 39. Niveles de lípidos oxidados. Se encontró un claro aumento de los LPO en el grupo Tg SED. El tratamiento bajó el exceso de estos niveles. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*\*\* $p < 0.001$  comparados al NTg y  $^{\#\#}p < 0.001$  comparando los tratamientos al Tg.

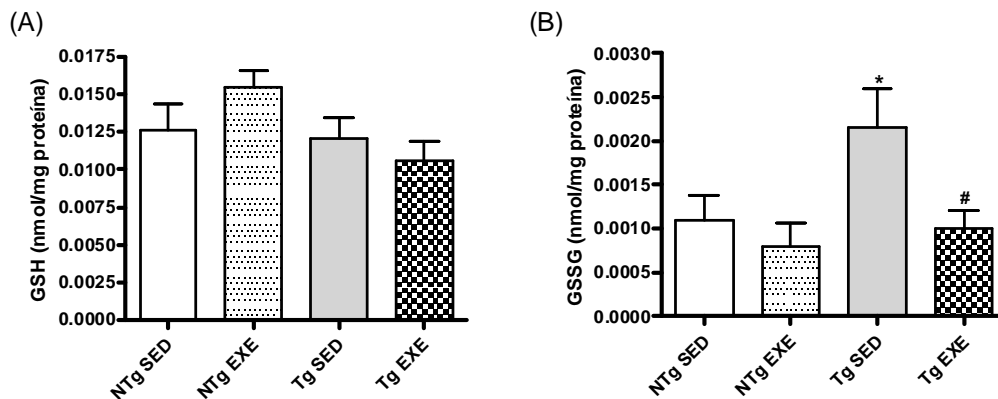


Figura 40. Niveles de glutatión. Los ratones hembras 3xTg-AD de 15 meses de edad presentaron afectaciones en el metabolismo del glutatión. El EF produjo la disminución del GSSG. (A) Glutatión Reducido, (B) Glutatión Oxidado. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$  comparados al NTg SED;  $^{\#}p < 0.05$  comparando el grupo Tg SED al Tg EXE.

### 1.6.3. Actividad enzimática antioxidante

A los 15 meses de edad la actividad enzimática del ratón hembra 3xTg-AD se encontró muy afectada, con un aumento de la actividad del complejo enzimático GPx/GR y una disminución de la SOD-CuZn y SOD-Mn (Figura 41 A-D). El EF actuó en el sentido de la recuperación de los valores respecto al NTg SED.

### 1.7. Western Blot

Las determinaciones de la expresión proteica por la técnica de western blot se realizaron en hipocampo. En la figura 42 B se puede observar que solo la sinapsina fue significativamente menor en los Tg SED con respecto a los NTg SED. La terapia de EF voluntario indujo recuperación de estos valores en el grupo Tg EXE.

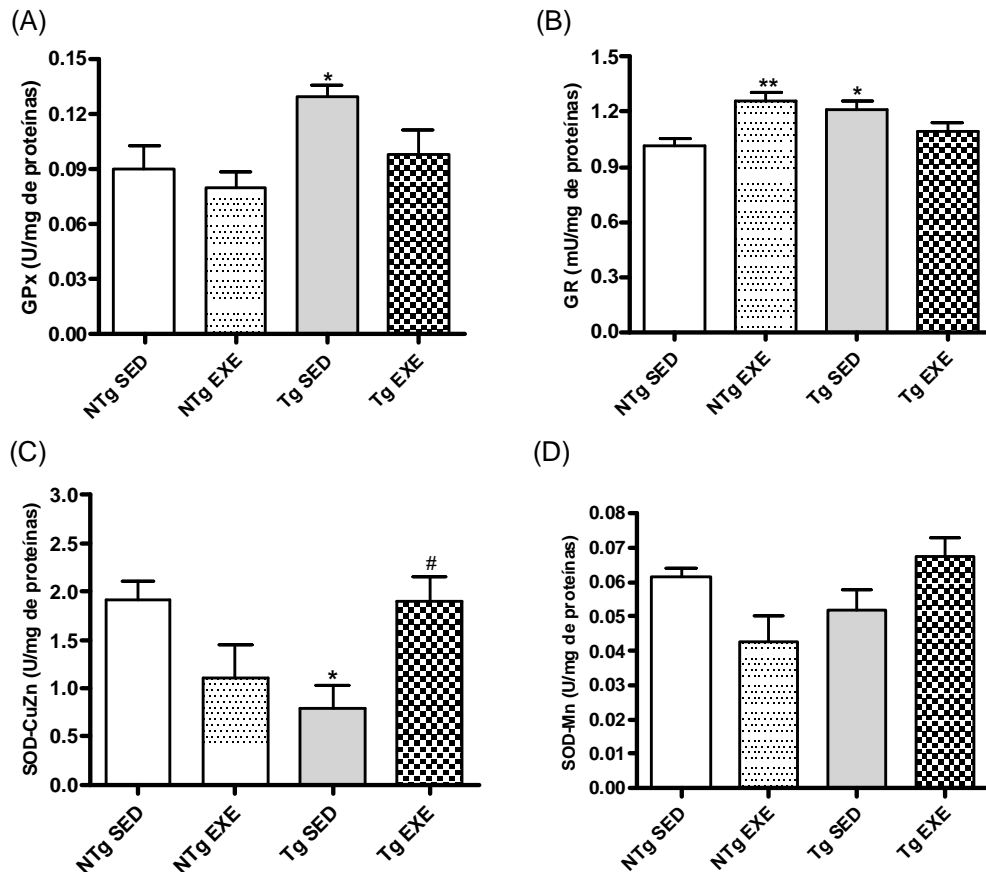


Figura 41. Actividad enzimática. Se muestran las afectaciones de la actividad enzimática de la corteza cerebral de los ratones hembras 3xTg-AD de 15 meses de edad. (A) Glutación Peroxidasa, (B) Glutación Reductasa, (C) Superóxido dismutasa-CuZn y (D) Superóxido dismutasa-Mn. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  comparados al NTg SED; # $p < 0.05$  comparando Tg SED al Tg EXE.

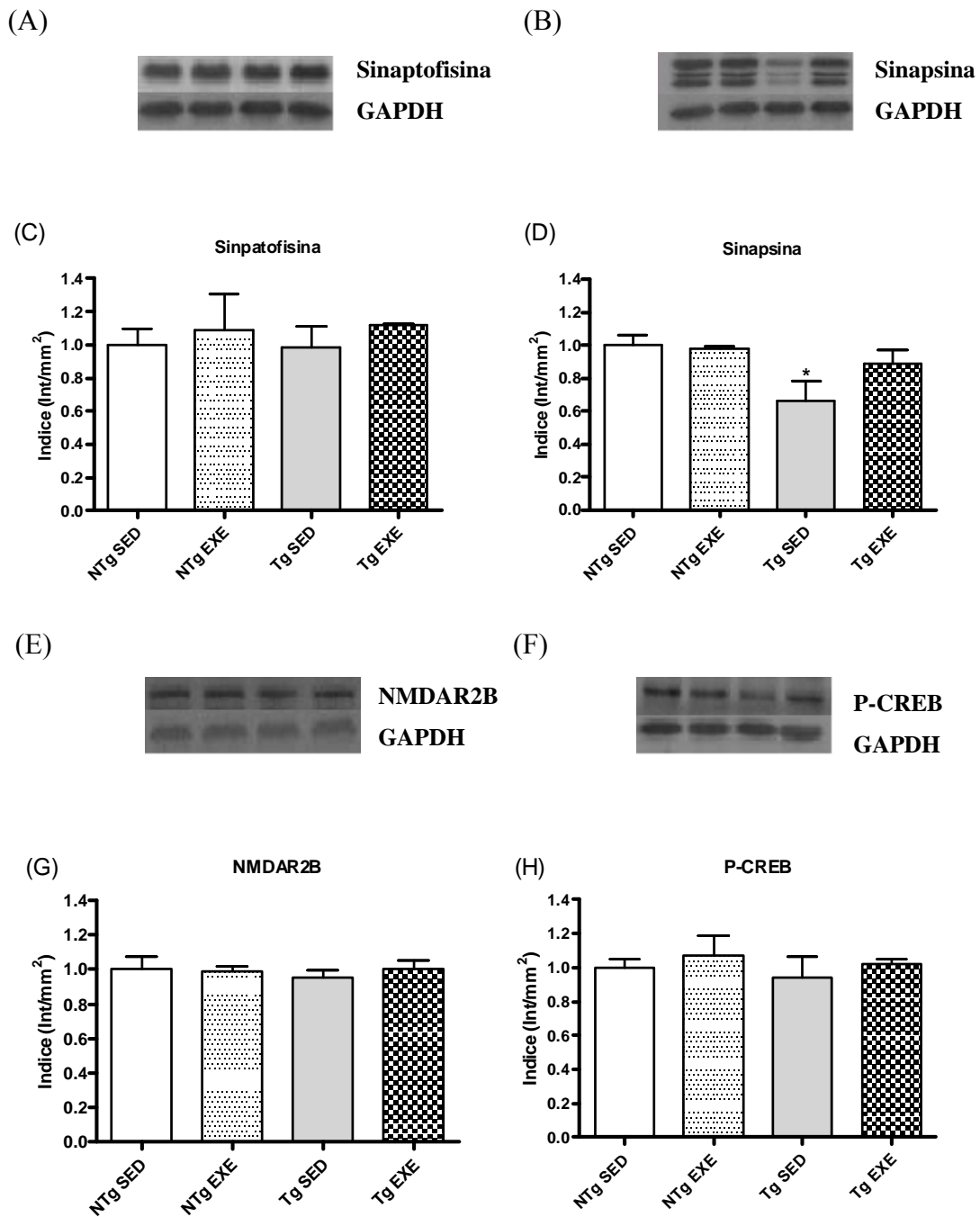


Figura 42. Western Blot. (A) y (B) Expresión proteica de la Sinaptofisina (anti- Sinaptofisina 1: 8 000) y la Sinapsina (anti- Sinapsina 1: 1 000), respectivamente, detectados por western blot (60 µg prot/carril) en muestras de hipocampo; (C) y (D) Cuantificación de los niveles de expresión proteica de la Sinaptofisina y la Sinapsina, respectivamente; (E) y (F) Expresión proteica del NMDAR2B (anti- NMDAR2B 1: 500) y el P-CREB (anti- P-CREB 1: 500), respectivamente, detectados por western blot (60 µg prot/carril), (G) y (H) Cuantificación de los niveles de expresión proteica del NMDAR2B y el P-CREB, respectivamente; el GAPDH se utilizó como control de carga (1: 4 000). Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05 comparados al NTg SED.

## **2. DISCUSIÓN**

El objetivo de este trabajo ha sido comprobar la eficacia terapéutica de un tratamiento prolongado de EF voluntario sobre ratones hembras 3xTg-AD de 15 meses de edad. En este modelo animal, a los 12 meses de edad, se ha visto que ya presentan un cuadro neuropatológico típico de la EA, con placas de A $\beta$  y los ONF presentes en el hipocampo y en varias regiones corticales (Oddo et al., 2003a). Además, se han observado en hembras de esta edad afectaciones sensoriales, conductuales y cognitivas (Giménez-Llort et al., 2007).

### **2.1. Ensayo de habilidades sensoriales y motoras**

Las afectaciones sensoriales y motoras que se producen con la EA se ha publicado que comienzan a ser más evidentes en etapas avanzadas de la enfermedad (Suva eta al., 1999). En el 2007, cuando realizaron la caracterización de este modelo animal, encontraron pequeñas afectaciones sensoriales en hembras de 12 meses de edad (Giménez-Llort et al., 2007). En el trabajo realizado por Sterniczuka et al., (2010) en hembras 3xTg-AD de 10 meses aún no aprecian este tipo de afectaciones. En el presente trabajo, con hembras de 15 meses de edad, no observamos cambios en la función sensorial, ni en la coordinación motora y el equilibrio. Es probable que las diferencias entre este trabajo y el de otro investigadores se deba a la manipulación de los animales. El tratamiento de EF produjo mejoras de las habilidades motoras en ambos genotipos, en correspondencia con lo encontrado en un trabajo anterior con este modelo animal (Giménez-Llort et al., 2010).

### **2.2. Función inmuno-endocrina**

Cuando estimamos el peso corporal de los animales solo apreciamos una tendencia a que los Tg SED tuvieran incrementado este valor, aunque en este y otros estudios se han encontrado diferencias significativas entre los pesos de estos dos genotipos pero a edades menores (Giménez-Llort et al., 2007; 2010). No obstante, el EF hizo que ambos grupos bajaran significativamente su peso total. Dato que concuerda con los resultados de los capítulos anteriores y con lo publicado por diferentes autores, donde encuentran que el ejercicio puede actuar en la inducción de la pérdida de peso corporal (Sakurai et al., 2010; Sene-Fiorese et al., 2010).

Al medir la aportación de WAT al peso corporal encontramos que el Tg SED tenía mayor cantidad de WAT que los otros tres grupos. Este resultado está en correspondencia con otro trabajo previo, donde apreciamos un aumento de este tejido en los 3xTg-AD y la capacidad del EF de hacerlo disminuir (Giménez-Llort et al., 2010). Otros autores también han publicado que el EF puede influir positivamente en la disminución de este tipo de tejido (Sakurai et al., 2010; Sene-Fiorese et al., 2010).

También se observó una clara tendencia a que el BAT estuviera disminuido en el grupo Tg SED y a su restablecimiento con el tratamiento, respecto al NTg SED. Consideramos de gran importancia este resultado ya que se han mostrado evidencias del riesgo que pueden representar los cambios energéticos, en humanos y animales, para padecer ciertas enfermedades (Bianchini et al., 2002). El BAT ha sido relacionado con el mantenimiento de la temperatura corporal (Himms-Hagen, 1985) y con la eficiencia energética del organismo (Cannon and Nedergaard, 2004). Por otra parte se ha sugerido su posible implicación en la disminución de la obesidad (Seale et al., 2010; Tan et al., 2010).

Para analizar las posibles afectaciones del estado funcional inmunológico tomamos el peso del bazo y del timo. Al determinar el porcentaje de aportación de estos órganos al peso corporal observamos una involución del timo y un aumento del bazo en los Tg SED. Estos resultados concuerdan con otros trabajos realizados con este modelo animal, donde también han observado una afectación de la función inmunológica a los 7 y 15 meses de edad, con una involución del timo (Giménez-Llort et al., 2008; 2010). Con el tratamiento de EF se produjo el restablecimiento del peso de estos órganos, respecto al NTg SED. Se ha visto que el ejercicio físico puede producir una bajada del peso del bazo con una disminución de los linfocitos T y B (Rogers et al., 2008). No obstante, como se comentó en capítulos anteriores, se ha sugerido que lo que se produce es una sustancial redistribución de las células dentro y fuera de los órganos linfoides, y que esta movilización parece que puede aumentar la vigilancia y la actuación del sistema inmunológico (Krüger and Moren, 2007).

### **2.3. Patrones conductuales**

En este trabajo hemos aplicado una amplia batería de pruebas conductuales, para poder evaluar consistentemente las afectaciones de las hembras de este modelo a los 15 meses de edad y el efecto del tratamiento de tres meses de ejercicio, en esta etapa avanzada de la enfermedad. Las afectaciones conductuales en la EA se ha sugerido que pueden ser

debido a la muerte neuronal y a las disfunciones que se producen en el hipocampo, la amígdala y otras regiones corticales. Estas regiones sufren una degeneración de las sinapsis y de las neuronas, lo cual se asocia a la acumulación de A $\beta$  y a la hiperfosforilación de tau con la consecuente formación de los ONF (Selkoe and Schenk, 2003; Mattson, 2004).

Al evaluar los patrones conductuales en hembras 3xTg-AD de 15 meses de edad, observamos que presentaban una conducta completamente afectada, con una baja motivación por la deambulación en el campo abierto, claras evidencias de ansiedad y una baja conducta exploratoria. En los capítulos anteriores hemos comentado que varios trabajos realizados con este modelo de ratón transgénico, coinciden en mostrar afectaciones conductuales, desde etapas tempranas de la vida de este animal, con una conducta exploratoria reducida y evidentes síntomas de ansiedad, tanto en machos como en hembras (Nelson et al., 2007; García et al., 2009a,b; Giménez-Llort et al., 2007; 2010; Sterniczuka et al., 2010). Los resultados del presente trabajo han estado en total correspondencia con lo mostrado en estos estudios citados, mostrando que con el avance de la edad, en este modelo, se produce un marcado deterioro conductual.

En correspondencia con lo que ocurre en humanos, este ratón a esta edad presenta depósitos de A $\beta$  y de tau hiperfosforilada en la amígdala, y esta es una zona del cerebro que se ha relacionado con un comportamiento ansioso (Goedert et al., 1991; Nelson et al., 2007). La patología de la amígdala ha sido sugerida como una de las principales implicadas en el aumento de la ansiedad en el ratón 3xTg-AD (Nelson et al., 2007).

Por otra parte, cuando aplicamos el tratamiento de EF observamos la recuperación de las afectaciones conductuales, como la ansiedad y la exploración. Estos resultados muestran que los efectos del EF sobre los patrones conductuales, discutidos en los dos capítulos anteriores, se materializan también en edades avanzadas de la patología en el modelo 3xTg-AD.

#### **2.4. Adquisición y retención del aprendizaje en el MWM**

Una de las afectaciones más importantes que se producen durante la EA es la pérdida progresiva de la memoria y esta afectación ha podido ser comprobada en muchos de los modelos experimentales para la enfermedad (Hsiao et al., 1996; Morgan et al., 2000; Gordon et al., 2001; Kotilinek et al., 2002). En nuestro estudio, al medir las afectaciones cognitivas a través del MWM, no encontramos diferencias entre los grupos durante la fase de aprendizaje pero sí en la retención, donde observamos una disminución



cognitiva en los Tg SED. Este resultado ha estado en correspondencia con lo observado en etapas anteriores de la vida de los ratones 3xTg-AD, en el presente trabajo y en varios estudios realizados con este modelo animal (Billings et al., 2005; Nelson et al., 2007; Giménez-Llort et al., 2007; 2010; Sterniczuka et al., 2010). En algún caso las afectaciones cognitivas, evaluadas mediante MWM en este modelo, se han encontrado en la fase de aprendizaje y no en la retención (Nelson et al., 2007). En otras investigaciones publicadas con diferentes modelos de la enfermedad, también muestran que no existe una relación directa entre la capacidad de aprendizaje y la memoria (Daumas et al., 2008; Dumont et al., 2009a,b).

El tratamiento de EF en los ratones hembras 3xTg-AD de 15 meses de edad produjo una tendencia a recuperar esta afectación. No obstante muchos trabajos, con diferentes modelos de ratones transgénicos para la EA y con diferentes períodos de EF, han publicado que este tratamiento produce mejoras cognitivas (Adlard et al., 2005; Nichol et al., 2007; 2009), incluyendo en etapas avanzada de la vida del modelo animal (Parachikova et al., 2008). En los resultados del capítulo 1, realizado con hembras de menor edad (4 y 7 meses), sí observamos que el EF voluntario produjo mejoras cognitivas significativas. Es evidente que las afectaciones neuropatológicas presentes cuando se inició este tratamiento (12 meses de edad) pudieron influir en que la recuperación cognitiva no fuera total.

### **2.5. Evaluación del estado del estrés oxidativo cerebral**

En los ratones 3xTg-AD hemos detectado daños oxidativos cerebrales desde edades tempranas, con aumento de los LPO, afectaciones del metabolismo del glutatión, así como variabilidad en la actividad de las enzimas antioxidantes con respecto al control NTg (García et al., 2009a,b; Giménez-Llort et al., 2010). En este trabajo, con hembras de 15 meses, hemos encontrado un aumento significativo de los LPO y del GSSG. Además también encontramos aumentado el complejo enzimático GPx/GR, implicado en el metabolismo del glutatión, y disminuidas la SOD-CuZn y la SOD-Mn. Los resultados de este trabajo concuerdan con lo encontrado por Resende et al., (2008) en hembras 3xTg-AD de entre 3 y 5 meses de edad.

En todos los patrones de estrés medidos, el tratamiento de EF hizo posible el restablecimiento de los valores respecto al control NTg SED. Esto está en correspondencia con varios trabajos, donde han observado la disminución de marcadores de estrés oxidativo, como los LPO, con diferentes tratamientos de EF en

diferentes modelos animales (Radak et al. 2001a; Ogonovszky et al., 2005; García et al., 2009a,b; Giménez-Llort et al., 2010). Por otra parte, la regulación de la actividad enzimática por la práctica regular de EF ha sido muy documentada por diferentes trabajos investigativos publicados (Somani et al., 1995; Somani and Husain, 1996; 1997; Radak et al., 2001a,b; Devi and Kiran, 2004).

En este estudio hemos observado elevados los LPO y baja la actividad de la SOD-CuZn, coincidiendo con un trabajo, con otro modelo de la EA, que muestran que al reducir la actividad de la SOD-CuZn se produce un incremento de los niveles de los LPO (Schuessel et al., 2005). En este y en los capítulos anteriores se ha discutido la importancia que tiene el funcionamiento de las SOD, para mantener un nivel bajo de estrés oxidativo y obtener mejoras cognitivas (Li et al., 2004a; Esposito et al., 2006; Dumont et al., 2009a). Es por esto que consideramos de gran importancia que el tratamiento de EF utilizado en este experimento aumentara la actividad estas enzimas.

## 2.6. Western blot

La pérdida de las proteínas sinápticas ha sido sugerida como una de las principales afectaciones neurológicas que se producen en la EA (DeKosky and Scheff, 1990; Terry et al., 1991). En este trabajo cuantificamos, mediante la técnica de western blot, la sinaptofisina y sinapsina como posible medida de este tipo de afectación. La sinapsina es una proteína específica de neuronas que está presente en las terminaciones pre-sinápticas, considerada como una fosfoproteína que modula la liberación de neurotransmisores (Jovanovic et al., 2000), involucrada en mantener la estructura presináptica (Takei et al., 1995) y la elongación axonal (Akagi et al., 1996). Dado el papel crítico de la sinapsina en las funciones cerebrales, consideramos de gran importancia que el tratamiento aplicado haya influido beneficiosamente en la recuperación de sus valores, que se encontraban significativamente disminuidos en los Tg SED. Este resultado concuerdan con el trabajo realizado por Gómez-Pinilla et al. (2001), donde muestran que el ejercicio físico produce un aumento de la sinapsina. Además, en otro trabajo de este grupo se muestra que este aumento se produce en las zonas CA1 y CA3 (Vaynman et al., 2004).

En algunos de los modelos de ratones transgénicos para la EA se ha podido observar una disminución de los niveles de sinaptofisina, que aumentan con la sobre-expresión de la SOD-Mn (Dumont et al., 2009a). En los ratones 3xTg-AD se ha publicado que se produce una disminución de esta proteína en zonas corticales en ratones machos de 7

meses de edad (Hedberg et al., 2010). En este estudio también hemos observado la disminución de esta proteína en el BO de ratones machos 3xTg-AD de 12 meses de edad. Sin embargo, no encontramos diferencias en su cuantificación, entre el control NTg SED y el Tg SED, en muestras de hipocampo de hembras de 15 meses. Con el tratamiento de EF observamos una pequeña tendencia a que esta proteína aumente, en correspondencia a lo observado en el capítulo 1 con ratones machos de 7 meses de edad. No obstante, otros autores citan el aumento de la sinaptofisina en diferentes modelos animales, cuando aplican tratamientos de ejercicio físico (Vaynman et al., 2004; Heschem et al., 2009; Macías et al., 2009).

Además de las dos proteínas sinápticas, también se cuantificó el subtipo R2B del receptor NMDA y el CREB fosforilado (CREB, del inglés cyclic AMP response element binding protein). A pesar de que en varios trabajos se ha asociado el aumento o la disminución del receptor NMDAR2B con la memoria (Tang et al., 1999; Xu et al., 2005; Chytrova et al., 2009), otorgándole una gran importancia, nosotros no encontramos diferencias entre los ratones del grupo NTg SED y del Tg SED. Tampoco observamos que este aumentara con el tratamiento de EF. Este resultado concuerda con algunos trabajos donde tampoco han encontrado que aumente este subtipo del NMDA con el EF (Dietrich et al., 2005; Vasuta et al., 2007). Sin embargo, como se mostró en los dos capítulos anteriores, el EF voluntario parece que puede actuar aumentando la subunidad NR2B (Farmer et al., 2004). En machos de 7 meses de edad (Capítulo 1) observamos una tendencia a que el NMDAR2B aumentara con el tratamiento de 6 meses de EF y este aumento fue más evidente en los machos de 12 meses (Capítulo 2). Parece que el efecto del EF sobre la subunidad R2B del receptor NMDA podría estar relacionado con la edad, con el sexo y con la duración del tratamiento.

En cuanto al CREB se ha dicho que es un factor de transcripción importante involucrado en el aprendizaje y la memoria (Finkbeiner, 2000; Gómez-Pinilla et al., 2001) y que su fosforilación es un paso crucial para que este factor pueda realizar su actividad transcripcional (Bito et al., 1996; Finkbeiner et al., 1997; Silva et al., 1998). Al medir la cantidad de P-CREB, en muestras de hipocampo de estos animales, no encontramos diferencias entre ninguno de los grupos. En un trabajo realizado por Molteni et al. en 2004, encuentran mediante western blot, que el EF no aumentó los niveles de esta proteína en el hipocampo de ratas con una dieta regular, pero sí en las que tenían una dieta rica en grasas. En otro trabajo se ha publicado que el EF aumentó la expresión de esta proteína (Vaynman et al., 2003) y que indujo su activación,

produciendo la fosforilación del CREB (Vaynman et al., 2004). No obstante, hay que tener presente que en estos tres estudios los animales fueron sacrificados inmediatamente después de realizar el tratamiento de EF, que fue de un corto período de tiempo. Por otra parte, ha sido publicado que los niveles de P-CREB sufren un acusado incremento en las neuronas del hipocampo durante la formación de la memoria (Impey et al., 1998). En nuestro trabajo los animales se sacrificaron 12 días después de haber terminado el tratamiento de 3 meses de EF y dos días después de haber realizado la prueba de MWM, muy vinculada a los procesos cognitivos. Es posible que estos factores influyeran en que no detectáramos cambios significativos entre los grupos en los niveles del P-CREB.

## **CAPÍTULO 4. EFECTO TERAPÉUTICO DEL EJERCICIO FÍSICO VOLUNTARIO EN RATONES HEMBRAS NTg Y 3xTg-AD OVARIECTOMIZADAS**

### **1. Resultados**

Un grupo de hembras NTg y 3xTg-AD de 4 meses de edad fueron ovariectomizadas y otro grupo se expuso a la operación simulada. A los 6 meses de edad, por un período de 3 meses, la mitad de cada grupo fueron colocadas en jaulas con libre acceso a una rueda de actividad (NTg S+EXE, NTg Ov+EXE, Tg S+EXE, Tg Ov+EXE) y la otra mitad se utilizó como control sin ejercicio (NTg S+SED, NTg Ov+SED, Tg S+SED, Tg Ov+SED). A los 9 meses de edad todos los grupo fueron evaluados en cuanto a los patrones sensoriales, motores, conductuales y cognitivos.

#### **1.1. Distancia recorrida en la rueda de actividad**

La distancia promedio total recorrida por cada ratón se estimó como en el Capítulo 1, según el número de los ratones en cada caja y los recuentos de cada rueda (Figura 43). El grupo Tg S+EXE recorrió mayor distancia que el grupo control NTg S+EXE (ANOVA, genotipo  $F_{(1,32)}=88.24$ ,  $P<0.0001$ ). La ovariectomía indujo una menor actividad en la rueda en ambos genotipos (ANOVA, ovariectomía  $F_{(1,32)}=142.2$ ,  $P<0.0001$ ).

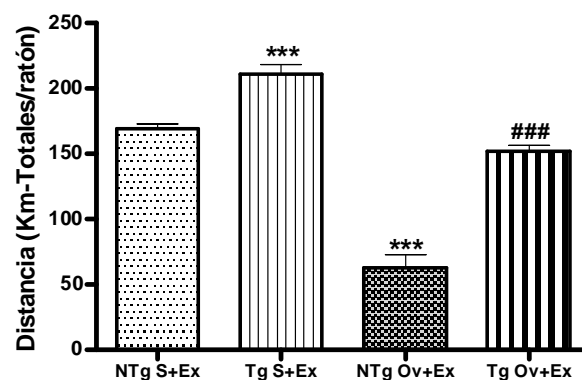


Figura 43. Distancia en la rueda de actividad. Se aprecia un efecto del genotipo y de la ovariectomía. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: Two-way ANOVA Bonferroni posttests, \*\*\* $p<0.001$  comparados al NTg S+EXE; ### $p<0.001$ , comparando Tg S+EXE y Tg Ov+EXE.

### 1.2. Función sensorial y motora

La función sensorial y motora de los ratones hembras 3xTg-AD no se vio afectada a esta edad (Tabla 18). Al realizar la ovariectomía solo se encontraron afectaciones sensoriales en los NTg y estas afectaciones desaparecieron con el tratamiento de EF (ANOVA,  $F_{(7,61)}=11.38$ ,  $P<0.0001$ ). Los 3xTg-AD presentaron mayor coordinación y equilibrio y el EF las potenció en todos los grupos.

Cuando medimos la fuerza muscular encontramos que los ratones 3xTg-AD presentaron más fuerza muscular que los NTg. Mientras que el ejercicio aumentó la fuerza muscular (ANOVA, efecto ejercicio:  $F_{(1,61)}=16.19$ ,  $P=0.0002$ ), la ovariectomía produjo disminución (ANOVA, efecto ovariectomía:  $F_{(1,61)}=5.449$ ,  $P=0.0229$ ), pero de forma más marcada en los 3xTg-AD (Figura 44 B). La ovariectomía también produjo disminución de la masa muscular en el gastrocnemius pero más claramente en los NTg (ANOVA,  $F_{(7,61)}=3.201$ ,  $P=0.0060$ ; Student's test,  $P<0.05$ : NTg S+SED vs NTg Ov+SED) (ver Tabla 18). La terapia de EF indujo un aumento de la fuerza muscular en todos los grupos (ANOVA, efecto ejercicio  $F_{(1,61)}=16.19$ ,  $P=0.0002$ ) y la recuperación de la masa muscular de los controles ovariectomizados.

### 1.3. Función inmuno-endocrina

Realizamos la comprobación de la cirugía pesando el útero de todos los grupos y observamos que el de las ovariectomizadas era significativamente menor (ANOVA,  $F_{(1,61)}=121.6$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 44 A). El tratamiento de EF produjo una tendencia al aumento del valor porcentual de aportación al peso corporal del útero, más claramente en las NTg ovariectomizadas (ANOVA, efecto ejercicio  $F_{(1,61)}=4.043$ ,  $P=0.0459$ ; Student's test,  $P<0.05$ : NTg Ov+SED vs NTg Ov+EXE).

No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos en cuanto al peso corporal (Tabla 19). No obstante, los grupos ovariectomizados presentaron un mayor porcentaje de aportación de WAT al peso corporal, con valores significativos en el grupo NTg Ov+SED respecto al NTg S+SED (ANOVA,  $F_{(1,61)}=11.97$ ,  $P=0.0010$ ). El EF actuó disminuyendo los valores de aportación al peso corporal de este tejido, de forma más clara en los grupos de 3xTg-AD ovariectomizadas (ANOVA,  $F_{(1,61)}=11.33$ ,  $P=0.0013$ ; Student's test,  $P<0.01$ : Tg Ov+SED vs Tg Ov+EXE) (Figura 44 C).

Al medir el porcentaje de las glándulas adrenales, no observamos un patrón claro entre los grupos. No obstante, se pudo apreciar una tendencia a que las glándulas adrenales

estuvieran disminuidas en las NTg Ov+SED y a estar aumentadas en las Tg Ov+SED, respecto sus grupos controles. También observamos cierta tendencia a que el EF disminuyera este valor en los grupos 3xTg-AD.

El bazo aumentó significativamente en los Tg S+SED con respecto a los NTg S+SED, se observó un efecto del genotipo (ANOVA,  $F_{(1,61)}=14.97$ ,  $P=0.0003$ ) (Figura 44 D). Con la ovariectomía se produjo la disminución de la aportación del bazo al peso corporal, de forma significativa en los 3xTg-AD respecto a sus controles Tg S+SED (ANOVA,  $F_{(1,61)}=5.259$ ,  $P=0.0253$ ). El tratamiento de EF indujo la recuperación del peso de este órgano en ambos grupos respecto a sus controles.

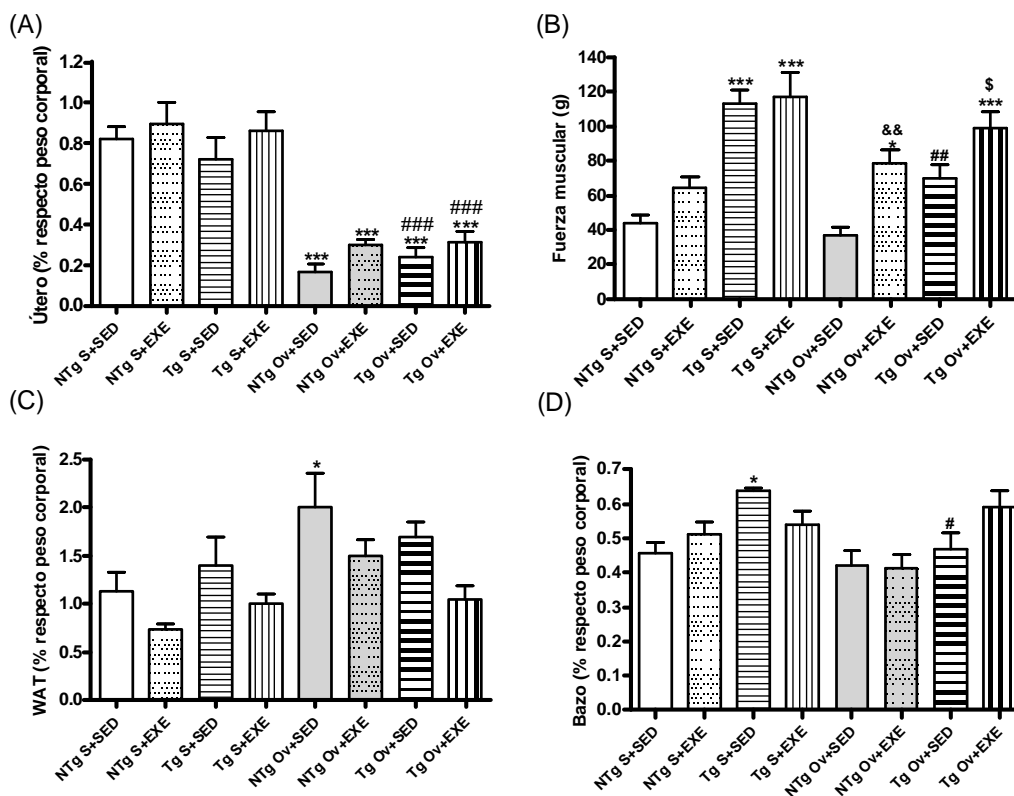


Figura 44. Fuerza muscular y afectaciones endocrinas. Valor terapéutico del EF voluntario, (A) Porcentaje de aportación al peso corporal total del Útero, (B) Fuerza muscular, (C) y (D) Porcentaje de aportación al peso corporal total del WAT y del Bazo. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$  comparados al NTg S+SED; # $p<0.05$ , ## $p<0.01$ , ### $p<0.001$  comparando las 3xTg-AD al Tg S+SED; && $p<0.01$  comparando NTg Ov+SED y NTg Ov+EXE; \$ $p<0.05$  comparando Tg Ov+SED y Tg Ov+EXE.

Tabla 18. Efecto de la ovariectomía y del tratamiento de 3 meses de EF voluntario sobre la función sensorial y motora.

	NTg S+SED (n=8)	NTg S+EXE (n=9)	Tg S+SED (n=8)	Tg S+EXE (n=9)	NTg Ov+SED (n=9)	NTg Ov+EXE (n=9)	Tg Ov+SED (n=8)	Tg Ov+EXE (n=9)
<b>Función sensorial y motora</b>								
<i>Prueba de reflejos</i>								
Incidencia de ambos reflejos	8/8	8/9	7/8	8/9	1/9	8/9	8/8	9/9
<i>Fuerza muscular</i>								
Fuerza (g)	Ver Figura 44 B							
Gastrocnemius (% peso corporal)	0.50± 0.01	0.47± 0.02	0.50± 0.01	0.53± 0.02	0.45± 0.01	0.49± 0.01	0.50± 0.02	0.52± 0.01
Soleus (% peso corporal)	0.10± 0.01	0.09± 0.01	0.10± 0.01	0.09± 0.01	0.07± 0.01	0.10± 0.01	0.09± 0.01	0.10± 0.01
<i>Varilla de madera</i>								
Equilibrio (permanencia, s)	14.7± 1.4	18.1± 0.8	20.0± 0*	20.0± 0*	13.7± 1.7	17.1± 2.2	19.3± 1.1	20.0± 0
Coordinación (distancia, cm)	0.3± 0.2	1.6± 0.4	0.7± 0.1	4.7± 0.8***,###	0.1± 0.1	1.6± 0.5	0.4± 0.1	4.8± 0.1***,###, \$\$\$
<i>Varilla de metal</i>								
Equilibrio (permanencia, s)	2.0± 0.7	4.0± 0.8	4.0± 0.8	12.4± 1.7***,###	1.9± 1.1	4.4± 1.4	5.6± 1.1	14.4± 1.2***,###, \$\$\$
Coordinación (distancia, cm)	0± 0	0.1± 0.1	0± 0	0.5± 0.2	0± 0	0.1± 0.1	0± 0	1.0± 0.5*,#, \$
<i>Cuerda de metal (2 ensayos 5s)</i>								
Fuerza (latencia de caída, s)	0.8± 0.1	1.1± 0.1	2.6± 0.7	2.7± 0.6	0.8± 0.2	1.0± 0.2	2.9± 0.8*	3.2± 0.6*
Coordinación (distancia, cm)	0.8± 0.4	1.1± 0.5	1.9± 0.7	1.6± 0.6	0.4± 0.2	0.7± 0.4	1.7± 0.5	1.8± 0.6
Elementos de soporte (n)	0.7± 0.1	0.8± 0.1	1.3± 0.4	1.5± 0.3	0.8± 0.2	0.9± 0.2	1.3± 0.3	1.9± 0.3*
<i>Cuerda de metal (1 ensayo 60s)</i>								
Fuerza (latencia de caída, s)	1.3± 0.3	4.2± 1.5	45.9± 6.9***	42.8± 8.6***	1.8± 0.1	2.8± 0.5	47.7± 7.9***	59.8± 0.2***
Coordinación (distancia, cm)	0.1± 0.1	0.2± 0.1	2.8± 0.6***	2.9± 0.7***	0± 0	0± 0	3.6± 0.6***	3.2± 0.5***
Elementos de soporte (n)	1.4± 0.3	1.8± 0.2	2.9± 0.1***	3.0± 0***	1.1± 0.1	1.7± 0.1 <sup>&amp;&amp;</sup>	2.9± 0.1***	3.0± 0***

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 comparadas al NTg S+SED; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 comparando Tg a la Tg S+SED; &&p<0.01, &&&p<0.001 comparando NTg Ov+SED y NTg Ov+EXE; \$\$\$p<0.001 comparando Tg Ov+SED y Tg Ov+EXE.



Tabla 19. Efecto de la ovariectomía y del tratamiento de 3 meses de EF voluntario sobre la función inmuno-endocrina.

	NTg S+SED (n=8)	NTg S+EXE (n=9)	Tg S+SED (n=8)	Tg S+EXE (n=9)	NTg Ov+SED (n=9)	NTg Ov+EXE (n=9)	Tg Ov+SED (n=8)	Tg Ov+EXE (n=9)
<b>Peso corporal</b>								
Inicio del experimento (g)	21.2± 0.4	20.4± 0.4	22.7± 0.8	22.9± 0.8	20.8± 0.5	20.8± 0.4	20.8± 0.4	21.4± 0.4
Inicio del ejercicio (g)	23.4± 0.5	22.4± 0.5	24.1± 0.8	24.4± 0.9	22.8± 0.6	22.8± 0.4	23.1± 0.4	24.1± 0.5
Final del ejercicio (g)	25.0± 0.8	22.9± 0.6	26.0± 1.3	24.8± 0.8	23.9± 0.8	22.2± 0.9	23.1± 0.4	22.7± 0.6
Útero (% del peso corporal)	<i>Ver Figura 44 A</i>							
WAT (% del peso corporal)	<i>Ver Figura 44 C</i>							
Adrenales (% del peso corporal)	0.044± 0.005	0.041± 0.003	0.042± 0.006	0.035± 0.006	0.037± 0.004	0.040± 0.004	0.048± 0.006	0.036± 0.004
Bazo (% del peso corporal)	<i>Ver Figura 44 D</i>							
Thymus (% del peso corporal)	0.17± 0.02	0.14± 0.02	0.16± 0.01	0.15± 0.01	0.18± 0.02	0.16± 0.01	0.17± 0.01	0.18± 0.01
BAT (% del peso corporal)	0.45± 0.06	0.36± 0.04	0.40± 0.06	0.46± 0.03	0.56± 0.06	0.51± 0.04	0.50± 0.02	0.46± 0.04

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

## 1.4. Patrones conductuales

### 1.4.1. Neofobia

Como se muestra en la Figura 45 y en la Tabla 20 los ratones Tg S+SED mostraron un comportamiento neofóbico en la exposición a la nueva jaula de vida, con una elevada latencia de exploración vertical (ANOVA,  $F_{(7,61)}=7.237$ ,  $P<0.0001$ ) y una baja exploración vertical (ANOVA,  $F_{(7,61)}=7.237$ ,  $P=0.0012$ ) y de las esquinas (ANOVA,  $F_{(7,61)}=3.643$ ,  $P=0.0024$ ). La ovariectomía produjo cierta neofobia en los NTg, que bajaron el número de exploraciones verticales y de las esquinas (Student's test, para ambos  $P<0.5$ : NTg S+SED vs NTg Ov+SED). Los Tg Ov+SED mantuvieron la conducta de su control Tg S+SED, que ya era neofóbica. El EF hizo que se produjera un comportamiento adecuado frente a la nueva jaula de vida. El efecto del EF se observó sobre la latencia de exploración vertical (ANOVA,  $F_{(1,61)}=20.97$ ,  $P<0.0001$ ) y sobre el número de exploraciones de las esquinas (ANOVA,  $F_{(1,61)}=4.789$ ,  $P=0.0325$ ).

### 1.4.2. Campo abierto

Ante la exposición a un campo abierto observamos un perfil ansioso en los ratones 3xTg-AD hembras de 9 meses de edad (Tabla 20 y Figura 46 A-D). En la Figura 46 se puede observar como el grupo Tg S+SED presentó una elevada latencia de exploración horizontal (ANOVA,  $F_{(7,61)}=4.717$ ,  $P=0.0003$ ) y vertical (ANOVA,  $F_{(7,61)}=3.798$ ,  $P=0.0017$ ). En los NTg la ovariectomía indujo una conducta similar a la de los Tg S+SED, con una latencia de exploración vertical significativamente aumentada. En la exploración horizontal se observó un efecto de los grupos (ANOVA,  $F_{(7,305)}=8.431$ ,  $P<0.0001$ ) y del tiempo (ANOVA,  $F_{(7,305)}=9.545$ ,  $P<0.0001$ ). La ovariectomía empeoró esta conducta en los 3xTg-AD e indujo una tendencia a su aparición en los NTg (ANOVA, efecto ovariectomía:  $F_{(1,145)}=8.495$ ,  $P=0.0041$ ). La exploración vertical también se observó disminuida en el grupo Tg S+SED (ANOVA,  $F_{(7,61)}=6.168$ ,  $P<0.0001$ ). La ovariectomía en este patrón produjo el mismo efecto que en la exploración horizontal (ANOVA,  $F_{(1,145)}=5.268$ ,  $P=0.0231$ ). El EF, en la mayoría de las variables medidas, produjo recuperación de los patrones conductuales afectados.

Tabla 20. Efecto de la ovariectomía y del tratamiento de 3 meses de EF voluntario sobre los patrones conductuales de los ratones 3xTg-AD y de sus controles NTg.

	NTg S+SED (n=8)	NTg S+EXE (n=9)	Tg S+SED (n=8)	Tg S+EXE (n=9)	NTg Ov+SED (n=9)	NTg Ov+EXE (n=9)	Tg Ov+SED (n=8)	Tg Ov+EXE (n=9)
<b>Neofobia</b>								
Actividad vertical (latencia, s)	Ver Figura 45 A							
Números de corner (n)	7.5± 0.9	6.8± 1.2	2.9± 0.6*	5.7± 1.0	4.6± 0.9	5.6± 1.0	2.6± 0.7**	5.0± 0.5
Actividad vertical (n)	Ver Figura 45 B							
<b>Campo abierto</b>								
Latencia de movimiento (s)	0± 0	0± 0	0.6± 0.4	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Actividad horizontal (latencia,s)	Ver Figura 46 A							
Entrada a periferia (latencia, s)	5.6± 1.5	5.8± 1.1	33.2± 22.9	4.9± 2.6	4.9± 2.4	11.1± 2.1	13.4± 3.5	17.7± 11.0
Actividad vertical (latencia, s)	Ver Figura 46 C							
Higiene (latencia, s)	156.2± 31.7	113.7± 14.8	192.2± 32.6	185.0± 33.7	104.8± 13.5	105.5± 15.0	201.4± 30.1	154.3± 25.4
Actividad horizontal (n)	Ver Figura 46 B							
Actividad vertical (n)	43.9± 9.5	37.3± 6.7	7.4± 1.9***	17.2± 4.0**	31.2± 6.6	22.5± 4.3*	5.8± 1.0***	19.1± 3.6*
Duración de la higiene (s)	5.5± 1.7	7.1± 0.9	2.7± 0.9	6.0± 1.7	5.7± 1.0	8.2± 1.8	4.6± 1.7	5.4± 1.3
Defecación (n)	2.5± 0.6	1.9± 0.5	2.8± 0.4	2.0± 0.5	2.4± 0.6	2.2± 0.3	2.2± 0.6	1.6± 0.4
<b>Caja oscura/iluminada</b>								
Salida al área blanca (latencia,s)	61.5± 39.4	27.7± 16.0	96.5± 44.8	26.8± 9.3	104.5± 38.0	62.2± 32.6	158.9± 16.8	26.6± 8.3 <sup>\$</sup>
Tiempo en área blanca (s)	Ver Figura 47 A							
Entradas al área blanca (n)	Ver Figura 47 B							
Defecación (n)	1.5± 0.4	1.6± 0.6	0.9± 0.5	1.7± 0.8	1.8± 0.7	1.9± 0.7	0.4± 0.4	1.1± 0.6
<b>Caja de 4 agujeros</b>								
Latencia de movimiento (s)	0± 0	0± 0	0± 0	0.4± 0.4	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Primer agujero (latencia, s)	Ver Figura 48 A							
Cuatro agujeros (latencia, s)	Ver Figura 48 B							
Tiempo de exploración (s)	Ver Figura 48 C							
Número de exploraciones (n)	29.9± 5.2	42.0± 4.9	20.2± 6.1	37.8± 5.1	15.2± 3.3	33.4± 4.7 <sup>&amp;</sup>	8.9± 2.0*	45.6± 5.0 <sup>###, \$\$\$</sup>
Defecación (n)	2.2± 0.6	1.1± 0.3	3.6± 0.6	1.3± 0.6	3.1± 0.8	3.2± 0.6	2.5± 0.8	1.1± 0.4

Nota: Se muestran las medias ± SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparadas al NTg S+SED; <sup>###</sup>p<0.01 comparando Tg a la Tg S+SED; <sup>&</sup>p<0.05 comparando NTg Ov+SED y NTg Ov+EXE; <sup>\$</sup>p<0.05, <sup>\$\$\$</sup>p<0.001 comparando Tg Ov+SED y Tg Ov+EXE.

### 1.4.3. Caja oscura/iluminada

En correspondencia con lo observado en el campo abierto, en esta prueba también observamos un perfil ansioso en los 3xTg-AD (Tabla 20 y Figura 47). El grupo Tg S+SED presentó un menor tiempo de exploración del área iluminada, respecto al grupo control NTg S+SED y esta conducta se acrecentó con la ovariectomía (ANOVA,  $F_{(7,61)}=3.055$ ,  $P=0.0080$ ; Student's test,  $P<0.05$ : NTg S+SED vs Tg S+SED). La ovariectomía indujo una conducta ansiosa en los NTg, que disminuyeron el número de entradas al área iluminada (ANOVA, efecto ovariectomía:  $F_{(1,145)}=11.75$ ,  $P=0.0008$ ; Student's test,  $P<0.05$ : NTg S+SED vs NTg Ov+SED). El EF funcionó como una terapia de recuperación en los grupos afectados, aumentando el tiempo de exploración del área iluminada (ANOVA,  $F_{(1,61)}=5.830$ ,  $P=0.0188$ ) y aumentando el número de entradas al área en cuestión (ANOVA,  $F_{(1,305)}=30.21$ ,  $P<0.0001$ ).

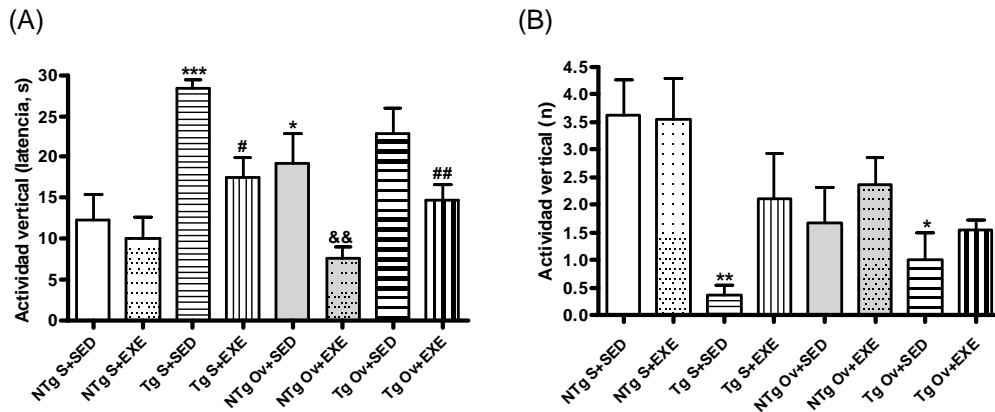


Figura 45. Neofobia. Afectaciones en los ratones hembra 3xTg-AD de 9 meses de edad. Efectos de la ovariectomía en los ratones controles NTg y en los 3xTg-AD. Valor terapéutico del EF. (A) Latencia de inicio de la actividad vertical, (B) Número de exploraciones verticales. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  comparados al NTg S+SED; # $p<0.05$ , ## $p<0.01$  comparando las 3xTg-AD al Tg S+SED; && $p<0.01$  comparando NTg Ov+SED y NTg Ov+EXE.

### 1.3.4. Caja de 4 agujeros

En el grupo Tg S+SED la latencia de inicio de exploración de los agujeros y la de haber explorado los 4 agujeros mostraron una tendencia a estar aumentadas. La ovariectomía produjo esta tendencia en los NTg y empeoró la conducta exploratoria en el grupo Tg Ov+SED, que mostró una elevada latencia de exploración de los 4 agujeros (ANOVA, efecto ovariectomía:  $F_{(1,61)}=4.257$ ,  $P=0.0434$ ) (Figura 48 A-B). Por otra parte, estos dos grupos de animales estuvieron el menor tiempo explorando (ANOVA,  $F_{(7,61)}=8.091$ ,  $P<0.0001$ ; Student's test,  $P<0.05$ : NTg S+SED vs NTg Ov+SED,  $P<0.01$ : NTg S+SED vs

Tg Ov+SED). La ovariectomía también indujo un menor número de exploraciones (ANOVA, efecto ovariectomía:  $F_{(1,145)}=24.28$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 48 C-D). El EF actuó modificando estos valores hasta niveles adecuados, según el grupo control NTg S+SED. El efecto beneficioso del EF se observó en todos los valores medidos (latencia inicio exploración: ANOVA,  $F_{(1,61)}=6.369$ ,  $P=0.0142$ ; latencia exploración 4 agujeros:  $F_{(1,61)}=40.09$ ,  $P<0.0001$ ; número de exploraciones:  $F_{(1,61)}=40.09$ ,  $P<0.0001$ ; tiempo exploración:  $F_{(1,61)}=44.62$ ,  $P<0.0001$ ).

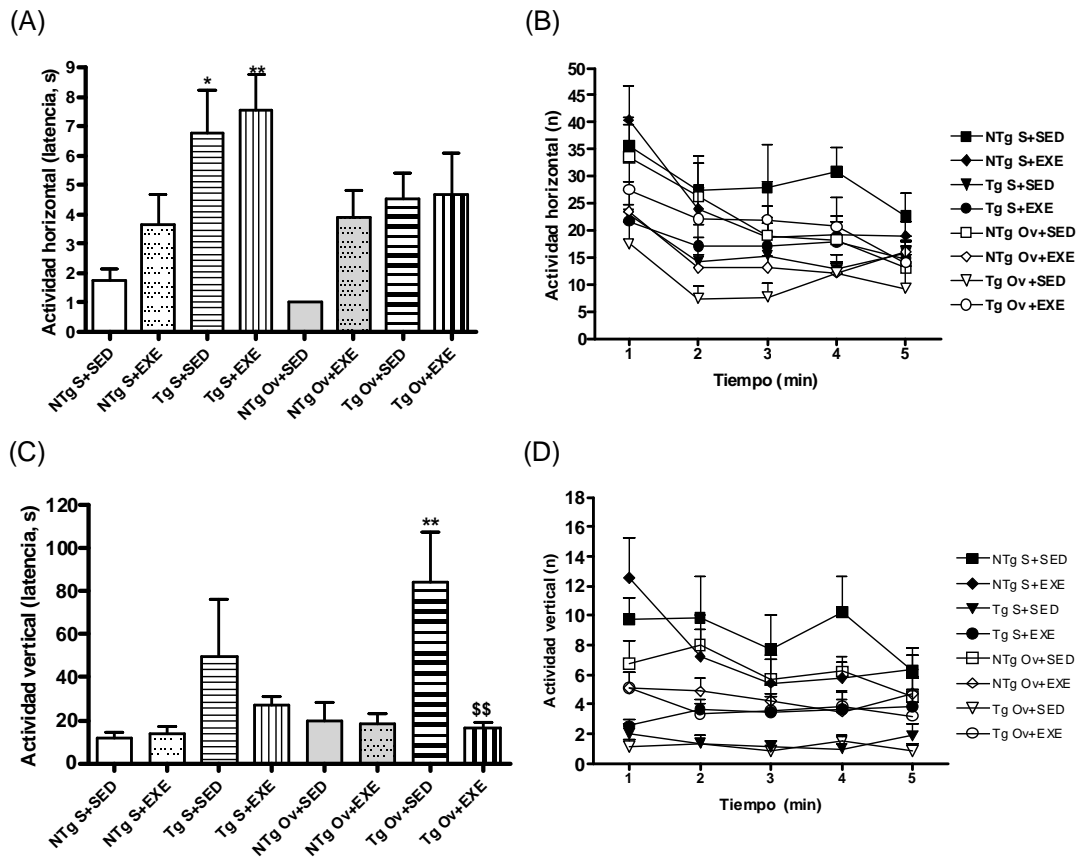


Figura 46. Campo abierto. Afectaciones en los ratones 3xTg-AD hembras de 9 meses de edad. Efectos de la ovariectomía en los ratones controles NTg y en los 3xTg-AD. Valor terapéutico del EF (A) Latencia de inicio de la actividad horizontal, (B) Número de exploraciones horizontales en cada minuto, (C) Latencia de inicio de la actividad vertical, (D) Número de exploraciones verticales en cada minuto. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  comparados al NTg S+SED; \*\* $p<0.01$  comparando Tg Ov+SED y Tg Ov+EXE.

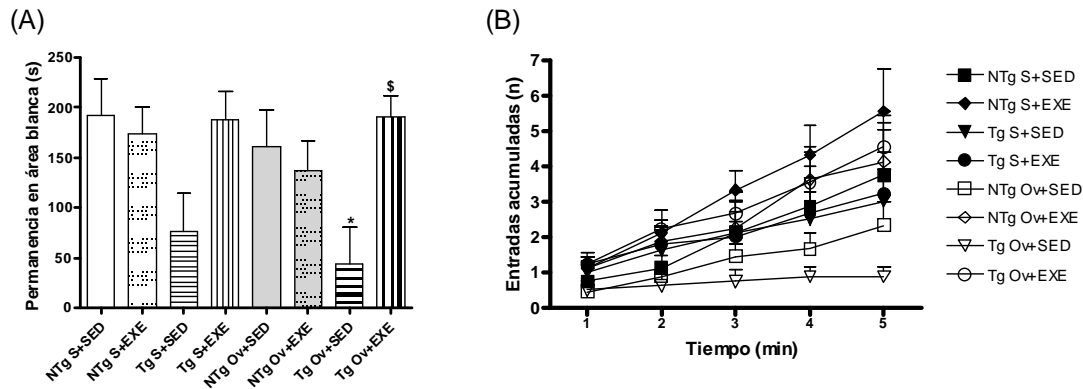


Figura 47. Caja oscura/iluminada. Afectaciones en los ratones 3xTg-AD hembras de 9 meses de edad. Efectos de la ovariectomía en los ratones controles NTg y en los 3xTg-AD. Valor ansiolítico del EF (A) Tiempo de permanencia en el área blanca, (B) Número de entradas acumuladas en cada minuto. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0.05$  comparados al NTg S+SED;  $^{\$}p < 0.05$  comparando Tg Ov+SED y Tg Ov+EXE.

#### 1.4. Adquisición y retención del aprendizaje en el MWM

Los ratones de los grupos Tg S+SED, NTg Ov+SED y Tg Ov+SED presentaron los mayores valores de latencia de llegada a la plataforma, a lo largo de la fase de aprendizaje, indicando posibles afectaciones en el aprendizaje (Figura 49 A). El tratamiento de EF indujo latencias de llegada iguales o menores que las del grupo NTg S+SED. Se observó una interacción entre los grupos (ANOVA,  $F_{(7,366)}=9.357$ ,  $P < 0.0001$ ), entre los días (ANOVA,  $F_{(7,366)}=31.91$ ,  $P < 0.0001$ ) y un efecto de disminución de las latencias del ejercicio (ANOVA,  $F_{(1,366)}=32.65$ ,  $P < 0.0001$ ). Cuando evaluamos la memoria, mediante la prueba de retención del aprendizaje, confirmamos las afectaciones cognitivas de los 3 grupos de animales con las mayores latencias (Figura 49 B). El EF fue una terapia adecuada para la recuperación cognitiva con un efecto beneficioso más marcado en los grupos de ovariectomizadas.

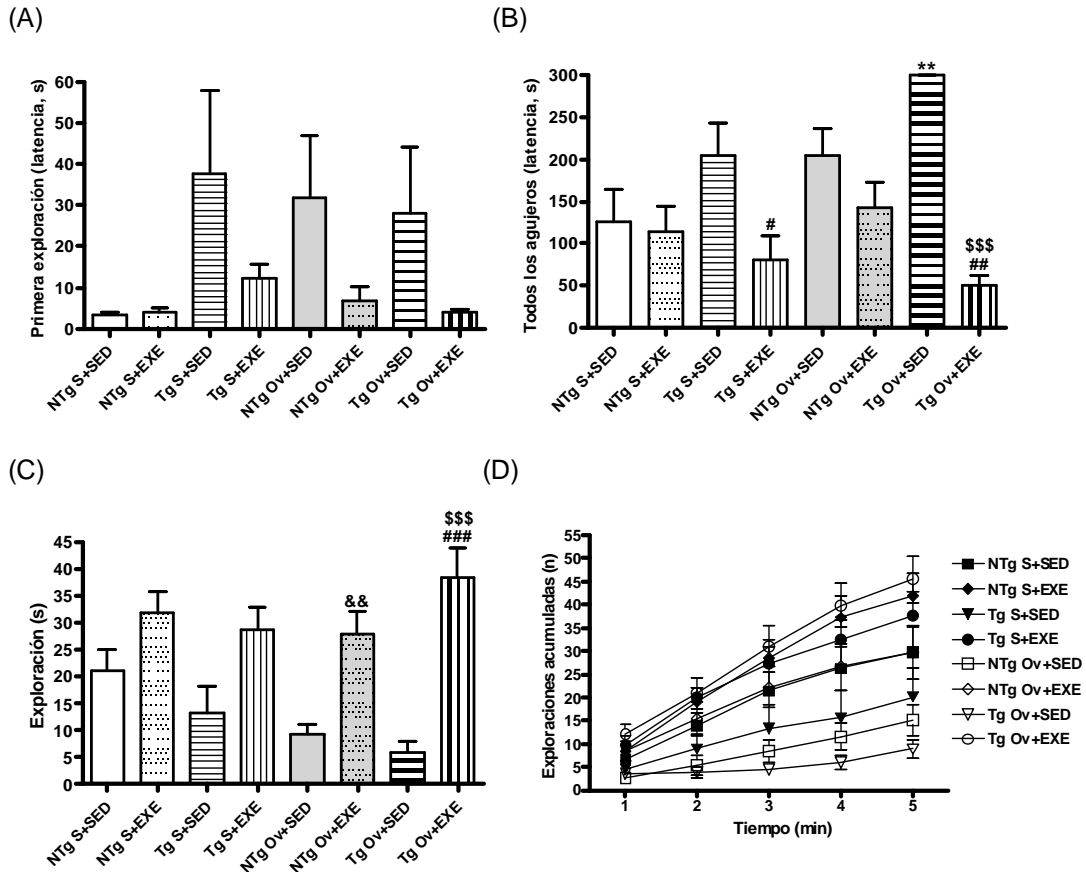


Figura 48. Caja de 4 agujeros. Afectaciones en los ratones 3xTg-AD hembras de 9 meses de edad. Efectos de la ovariectomía en los ratones controles NTg y en los 3xTg-AD. Aumento de la conducta exploratoria debido a la terapia de EF. (A) Latencia de inicio de exploración, (B) Latencia de exploración los cuatro agujeros, (C) Tiempo de exploración, (D) Exploraciones acumuladas cada minuto. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \*\* $p < 0.01$  comparados al NTg S+SED; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  comparando las Tg al Tg S+SED; && $p < 0.01$  comparando NTg Ov+SED y NTg Ov+EXE; \$\$\$ $p < 0.001$  comparando Tg Ov+SED y Tg Ov+EXE.

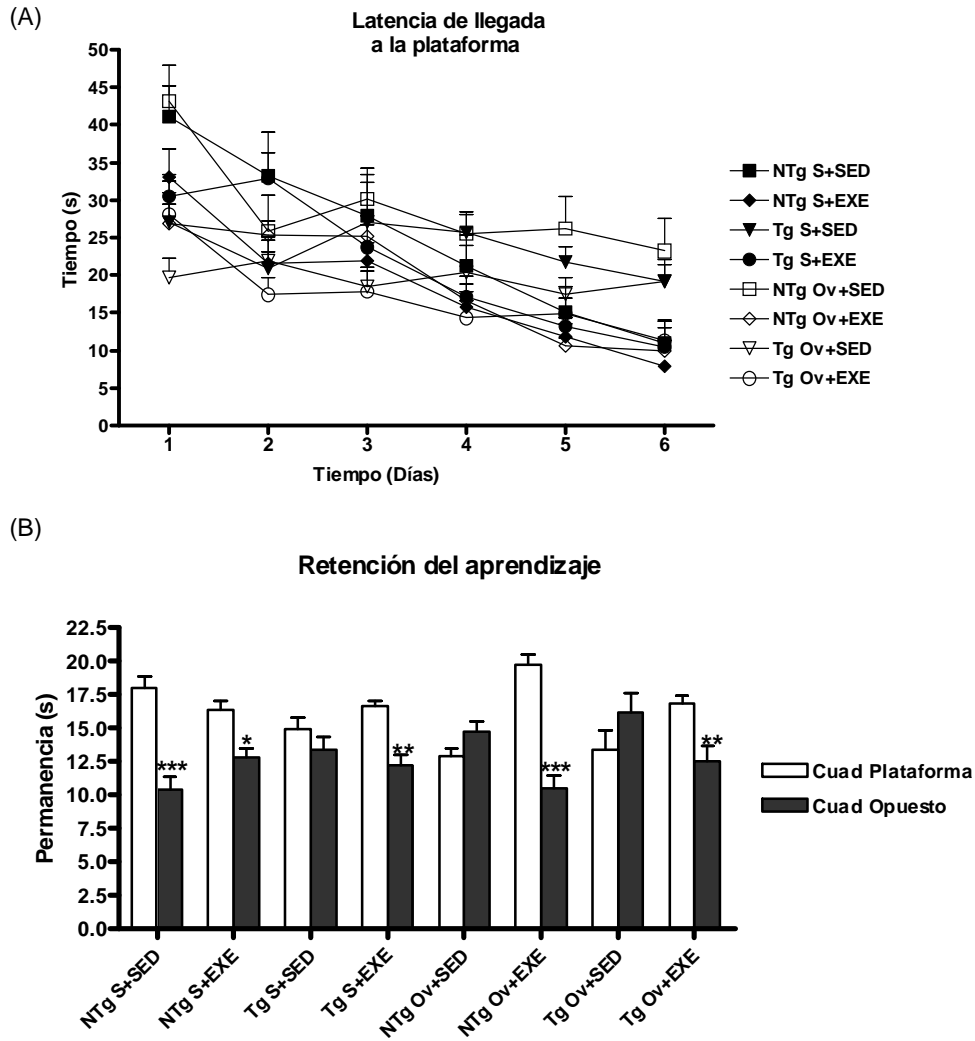


Figura 49. Laberinto acuático de Morris. (A) Latencia de llegada a la plataforma (B) Retención del aprendizaje. Se muestran las medias  $\pm$  SEM. Estadística: Two-way ANOVA Bonferroni posttests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparando tiempo de permanencia en el cuadrante plataforma contra el cuadrante opuesto.

## 2. DISCUSIÓN

La relación entre la funcionalidad de los ovarios y determinados patrones conductuales, como la ansiedad y la depresión, han podido ser reveladas en algunos estudios con modelos animales (Marcondes et al., 2001; Estrada-Camarena et al., 2003; Walf et al., 2004; Zuluaga et al., 2005; de Chaves et al., 2009; Baeza et al., 2010). Además, también se ha visto el efecto beneficioso que producen las hormonas femeninas sobre la función cognitiva (Bimonte-Nelson et al., 2003; Daniel et al., 2006; Henderson and Sherwin, 2007). En los últimos años se han realizado muchas investigaciones, principalmente en ratas, encaminadas a determinar las consecuencias de la ovariectomía en diferentes



funciones fisiológicas o sistemas, como el SNC , la función vascular, hepatocitos, huesos y la función inmune, entre otras (ver refs. Castillo et al., 2005, 2006; Perez-Martin et al., 2005; Tresguerres et al., 2008; De la Fuente et al., 2004; Baeza et al., 2007; 2009; 2010). La importancia de las hormonas femeninas en la progresión de la EA también ha sido sugerida (ver refs. Henderson et al., 1994; Tang et al., 1996; Kawas et al., 1997; Brookmeyer et al., 1998; Manly et al., 2000).

El principal objetivo de este estudio ha sido revelar la importancia que puede tener el EF sobre la recuperación de los patrones conductuales y cognitivos afectados por la carencia de hormonas femeninas, como puede ocurrir en las mujeres posmenopáusicas. Además, al realizar la ovariectomía sobre ratones hembras transgénicas para la EA, se ha podido mostrar la influencia de la carencia de los ovarios sobre la enfermedad y el papel, en ellas también, del EF como posible tratamiento.

### **2.1. Función sensorial y motora**

Las afectaciones sensoriales y motoras no han sido mostradas en ratones hembras 3xTg-AD de menos de 12 meses de edad (Giménez-Llort et al., 2007; 2010; Sterniczuka et al., 2010). En este trabajo, con hembras de 9 meses de edad, en correspondencia con los trabajos ya publicados, tampoco encontramos este tipo de afectaciones. Todos los grupos presentaron buena coordinación y equilibrio, que fueron potenciadas con el tratamiento de EF; en correspondencia a lo observado en otras edades con el modelo 3xTg-AD, discutido en este mismo trabajo y en trabajos previos publicados (Giménez-Llort et al., 2010). No obstante, las hembras NTg Ov+SED sí presentaron pequeñas afectaciones sensoriales, aunque no motoras. En el trabajo realizado por Baeza et al., (2010) muestran que, debido a la ovariectomía, los ratones presentaron afectaciones sensoriales y motoras. Especulamos que en las afectaciones sensoriales y motoras producidas por la sustracción de los ovarios podrían influir tanto la edad en la que se realiza la ovariectomía como el momento en que se realiza la estimación de estas funciones, así como la especie y el genotipo del animal utilizado en cada estudio.

En este trabajo observamos que los animales 3xTgAD ovariectomizadas disminuyeron significativamente la fuerza muscular. Además, observamos mayor masa muscular en el gastrocnemius del grupo NTg S+SED que el del NTg Ov+SED. Estos resultados se corresponden con la disminución de la actividad de los grupos de ovariectomizadas en la rueda de actividad. Varios autores sugieren la deficiencia de estrógenos en roedores como causa de una reducción significativa de la fuerza muscular (Warren et al., 1996;

Fisher et al., 1998; Baeza et al., 2010). También se ha visto que en ratones la ovariectomía puede inducir menor actividad en la rueda (Cotman and Berchtold, 2002). En correspondencia a lo observado en animales, en mujeres posmenopáusicas también se ha encontrado que se produce la disminución de la masa y la fuerza muscular (Cauley et al., 1987; Aloia et al., 1991; Phillips et al., 1993). Por otra parte Hubal et al. (2005), han mostrado el efecto beneficioso del ejercicio sobre la recuperación de este tipo de afectaciones en ratones deficientes de estrógenos.

## 2.2. Función inmuno-endocrina

La disminución del peso del útero en los grupo de ovariectomizadas confirma que se realizó una sustracción de los ovarios satisfactoria. La ovariectomía ha sido asociada directamente a la atrofia uterina en modelos murinos (Li and McMurray, 2006; García-Pérez et al., 2006). Además, su peso constituye un marcador típico de la acción estrogénica, ya que los estrógenos juegan un papel principal en el aumento de peso del útero (Frasor et al., 2003). El efecto beneficioso del EF sobre el funcionamiento del útero no ha sido ampliamente estudiado. No obstante, recientemente se publicado un trabajo en el que han observado que el tratamiento de EF, en ratas ovariectomizadas, produjo un aumento de los niveles de estradiol en el suero de estos animales (Hao et al., 2010). En el presente estudio no se realizaron este tipo de análisis, pero sí observamos una clara tendencia a que el EF aumentara el peso relativo de este órgano. Es probable que el incremento del peso de este órgano pueda estar relacionado con mejoras en su funcionamiento. No obstante, otras investigaciones en este sentido deben de ser realizadas.

El efecto de la ovariectomía sobre el peso corporal ha sido un tema polémico. Todo parece indicar que este factor puede depender de la edad en que se realice la ovariectomía, del tiempo pasado hasta que se realiza la estimación del peso, de la especie y del genotipo estudiado. Muchos autores han mostrado que la sustracción de los ovarios produce aumento de peso corporal (Hubal et al., 2005; Gomori et al., 2007; de Chaves et al., 2009; Witte et al., 2010), otros han mostrado que no se producen cambios (Holt et al., 1936; Nyda et al., 1948; Clark and Tartelin, 1982; Mason et al., 2010) y algún otro ha mostrado la pérdida de peso debido a la ovariectomía (Galletti and Klopper, 1964). En nuestro estudio no observamos diferencias significativas entre el peso de los grupos. Por otra parte, sí encontramos que la aportación de WAT del grupo Tg S+SED y de los grupos Ov+SED, de ambos genotipos, fuera mayor que el de

sus respectivos controles. En otro de nuestros trabajos, donde analizamos hembras de 7 meses de edad, también apreciamos un aumento de WAT en hembras 3xTg-AD sedentarias, respecto a los controles NTg, y la capacidad del EF de hacer disminuir este tejido (Giménez-Llort et al., 2010).

Varios autores han publicado que observan un aumento del tejido adiposo debido a la sustracción de los ovarios (Liang et al., 2002; Meli et al., 2004; Gomori et al., 2007; Blais et al., 2009; Hao et al., 2010; Witte et al., 2010). Ha sido sugerido que los estrógenos modulan la excitabilidad de las neuronas en el hipotálamo (Minami et al., 1990) y que además pueden modular la expresión génica de neuropéptidos involucrados en la regulación de la homeostasis energética (Shimizu et al., 1996; Mystkowski et al., 2000). Quizás esto pudo influir en que la ovariectomía produjera una clara tendencia a aumentar el peso del BAT. En todos los casos el tratamiento de EF actuó en función de restablecer la aportación de WAT y de BAT al peso corporal del animal respecto a los controles. Sene-Fiorese et al. (2010), en uno de sus trabajos ha mostrado que el EF puede regular el equilibrio entre estos tejidos, lo cual es observado en nuestro trabajo. También Sakurai et al., (2010) han publicado que el EF puede influir positivamente en la disminución de WAT.

Cuando analizamos la aportación al peso corporal de las glándulas adrenales, no observamos un patrón claro en los grupos. No obstante, podemos decir que encontramos una tendencia a que estas glándulas estuvieran disminuidas en las NTg Ov+SED y a estar aumentadas en las Tg Ov+SED. Ha sido sugerido que el eje HPA está sujeto a la influencia de las hormonas sexuales y de determinadas neuropatologías (Viau and Meaney, 1991; Canny et al., 1999; Viau, 2002; García-López et al., 2005) y que la actividad de muchas proteínas que actúan sobre este eje son reguladas por hormonas sexuales que están presentes a diferentes niveles del eje (Hirst et al., 1992; Herbison, 1995; Bethea et al., 1996; Madigou et al., 1996; García-López et al., 2005). Además, ha sido sugerido la influencia de estas hormonas, a través de este eje, en los estados depresivos y en los comportamientos ansiosos (García-López et al., 2005; Walf and Frye, 2005b). Según Carey et al. (1995), el eje HPA y el eje hipotalámico-pituitaria-ovarios (HPO) interaccionan claramente afectando la función neuronal. El efecto beneficioso del EF sobre el eje HPA ha sido discutido ampliamente en el capítulo 2. No obstante, en este estudio con hembras, solo observamos cierta tendencia a que el tratamiento de ejercicio aumentara el porcentaje de aportación de estas glándulas al peso corporal en los grupos 3xTg-AD.

Al medir la aportación al peso corporal del timo y el bazo para determinar posibles afectaciones inmunológicas, encontramos que el bazo era significativamente más pesado en los Tg S+SED con respecto a los NTg S+SED. Además, observamos que disminuyó la aportación del bazo al peso corporal en los Tg Ov+SED, respecto de su control Tg S+SED. En ratones ovariectomizadas se ha visto, mediante el análisis de una serie de parámetros investigados en el bazo y en los nódulos axilares, que se puede producir una inmunosenescencia prematura (Baeza et al., 2010). Estos datos se podrían tener en cuenta para realizar nuevas investigaciones, en el sentido de relacionar los procesos de envejecimiento y la EA en el modelo 3xTg-AD. En todos los casos el EF hizo que se restablecieran los valores respecto a cada control. Como se ha explicado con anterioridad, el EF produce una sustancial redistribución de las células dentro y fuera de los órganos linfoides y esta movilización parece que puede aumentar la vigilancia y actuación del sistema inmunológico (Krüger and Moren, 2007).

### **2.3. Patrones conductuales**

La depresión y la ansiedad son unos de los síntomas más citados que se observan en las mujeres menopáusicas, debido a la ausencia de las hormonas producidas por los ovarios (Pisani et al., 1998; Paoletti et al., 2001). Algún estudio epidemiológico indica que entre el 8 y 47 % de las mujeres, bajo los efectos de la etapa de la menopausia, sufren de síntomas depresivos (Schmidt, 2005; Avis et al., 2001). Este tipo de desorden, junto a la ansiedad, incrementa en las mujeres posmenopáusicas (Weissman and Olfson, 1995; Alexander, 2007). Varios estudios en animales han podido mostrar también la influencia de los ovarios en este tipo de conducta, en correspondencia a lo observado en humanos (Marcondes et al., 2001; Zuluaga et al., 2005; de Chaves et al., 2009; Baeza et al., 2010).

Nuestros resultados, de acuerdo con los trabajos citados anteriormente, muestran que la ovariectomía produjo afectaciones en la ansiedad, la motivación y la exploración de las hembras NTg y empeoró esta conducta en las 3xTg-AD. En un trabajo con ratas, a las que le evalúan la conducta entre 3 y 15 meses después de ser ovariectomizadas, también observan un estado conductual ansioso (de Chaves et al., 2009). Por otra parte, varias investigaciones con diferentes modelos animales, han mostrado que a un mayor estado de ansiedad corresponde un menor nivel plasmático de las hormonas ováricas (Marcondes et al., 2001; Gomez et al., 2002; Reddy, 2003). En otros trabajos han podido comprobar que, el estado ansioso se pone más de manifiesto en hembras que han

sido evaluadas mucho tiempo después de la ovariectomía que en otras evaluadas poco tiempo después (Picazo et al., 2006; Lagunas et al., 2010). Además, se han publicado algunos trabajos donde muestran la disminución de la actividad locomotora en diferentes modelos animales ovariectomizadas (Gomori et al., 2007; Witte et al., 2010). En el trabajo realizado por Baeza et al., (2010) también observan una disminución de las capacidades exploratorias en ratones ovariectomizadas, con una bajada significativa de la actividad exploratoria vertical.

Por otra parte, varios trabajos han mostrado que la progesterona y el estradiol disminuyen los efectos del comportamiento ansioso en ratones ovariectomizadas (ver refs. Estrada-Camarena et al., 2003; Frye et al., 2004; Frye and Walf, 2004; Frye and Wawrzycki, 2003; Koss et al., 2004; Rachman et al., 1998; Walf and Frye, 2005a; 2006). También ha sido sugerido que algunas hormonas de los ovarios pueden regular la proliferación celular en el hipocampo (ver refs. Falconer and Galea, 2003; McEwen, 2001; Tanapat et al., 1999; 2005) y esto ha sido asociado con una acción antidepresiva de estas hormonas (Brummelte et al., 2006; Darnaudéry et al., 2006; Fuchs et al., 2004; Schmitz et al., 2002; Swaab et al., 2005).

En este estudio, además, pudimos observar una conducta claramente afectada en las hembras Tg S+SED, con una baja motivación por la exploración y un estado ansioso frente a ambientes novedosos y estimulantes. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Giménez-Llort et al. (2007), en la caracterización de este modelo. En trabajos anteriores con hembras de 7 meses de edad también hemos observado este tipo de conducta (García et al., 2009a,b; Giménez-Llort et al., 2010). Otros autores también han observado este tipo de afectaciones conductuales en este modelo animal (Nelson et al., 2007; Sterniczuka et al., 2010).

El tratamiento de EF aplicado influyó positivamente en la recuperación de los patrones conductuales alterados. Esto se corresponde con varios estudios publicados, donde observan mejoras conductuales producidas por diferentes tratamientos de EF (Pietropaolo et al., 2008b; García et al., 2009a,b; Yuede et al., 2009; Giménez-Llort et al., 2010) y con los resultados mostrados en los capítulos anteriores del presente trabajo.

#### **2.4. Adquisición y retención del aprendizaje en el MWM**

El efecto beneficioso que producen las hormonas femeninas sobre la función cognitiva ha sido descrita por diferentes autores (ver refs. Bimonte-Nelson et al., 2003; Savonenko and Markowska, 2003; Daniel et al., 2006; Henderson and Sherwin, 2007).

Se ha sugerido que alguna de estas hormonas, como los estrógenos, pueden actuar positivamente sobre el sistema colinérgico en una variedad de regiones cerebrales (Simpkins et al., 1997; Gibbs and Aggarwal, 1998). El déficit de este sistema puede estar involucrado en las afectaciones cognitivas asociadas con la EA (Markowska et al., 1995; Muir, 1997; Fadel et al., 1999).

En correspondencia con algunos de los trabajos citados, en este estudio pudimos comprobar la disminución de las capacidades cognitivas en ambos genotipos, debido a la carencia de las hormonas femeninas, producida por la sustracción de los ovarios. Por otra parte, también observamos afectaciones cognitivas en las Tg S+SED; como ha sido observado que ocurre desde edades tempranas en hembras de este modelo animal (Billings et al., 2005; Nelson et al., 2007; García et al., 2009a,b; Giménez-Llort et al., 2007; 2010; Sterniczuka et al., 2010).

El EF resultó una terapia adecuada para recuperar las capacidades cognitivas, tanto en los grupos de ovariectomizadas como en las Tg S+SED. Estas cualidades del EF de actuar positivamente en la recuperación de las afectaciones cognitivas se corresponden a lo observado en los capítulos anteriores de este trabajo, y han sido observadas por diferentes autores (Adlard et al., 2005; Nichol et al., 2007; 2009).

## **DISCUSIÓN GENERAL**

---

---

## **DISCUSIÓN GENERAL**

---

Durante los últimos años un gran número de investigadores han dedicado sus esfuerzos a estudiar la capacidad del EF para contrarrestar cualquiera de los procesos neuropatológicos y progresivos de la EA, aplicando diferentes terapias de EF - voluntario o forzado, de corto o de largo período de duración-, en variadas etapas de la vida de los modelos animales de la enfermedad (ver refs. Addlar et al., 2005; Wolf et al., 2006; Parachikova et al., 2008; Richter et al., 2008; Nichol et al., 2007; 2008; 2009; Giménez-Llort et al., 2010). Por otra parte, varios autores han mostrado que el EF tiene un efecto sistémico en el organismo (Shing et al., 2007; Radak et al., 2008a), incluyendo el sistema nervioso central, y que por el contrario la inactividad física es uno de los factores de riesgo más importante para padecer algún tipo de demencia (ver refs. Middleton et al., 2008; Erickson et al., 2009), incluyendo la EA (ver refs. Cotman and Berchtold, 2007; Kivipelto and Solomon, 2008; Larson, 2008; Purnell et al., 2009). Sin embargo, aun no se ha llegado a un consenso en cuanto a si el valor del EF sobre la EA es preventivo o terapéutico o si radica en los dos.

Estudios realizados desde la década pasada han mostrado que en las personas de origen étnico similar que han cambiado su país de residencia, hay mayor prevalencia de esta enfermedad que en aquellas que permanecen viviendo en su país de origen (africanos y japoneses viviendo en USA) (ver refs. Hendrie et al., 1995; Graves et al., 1996; White et al., 1996). Datos que sugieren que la dieta y el estilo de vida pueden tener una importante influencia, inclusive tanto como los factores genéticos, para padecer la EA (ver refs. Panza et al., 2004; Arab and Sabbagh, 2010; Sofi et al., 2010) y que el EF podría tener un gran valor preventivo sobre la EA. En correspondencia con estas investigaciones, en el primer capítulo del presente trabajo pudimos comprobar que una terapia preventiva, de largo período de exposición a una rueda de actividad, fue más efectiva que las exposiciones cortas aplicadas, con un sentido preventivo o terapéutico. No obstante, las terapias de EF de largo período, que empleamos en los demás experimentos, también mostraron el efecto beneficioso del EF. Sin embargo, el ejercicio de 3 meses de duración, aplicado en las hembras desde los 12 a los 15 meses de edad, produjo un menor efecto sobre la función cognitiva. Estos resultados sugieren que el EF tiene un gran valor preventivo, y que su valor terapéutico es más claro en etapas menos avanzadas de la enfermedad.



En un trabajo realizado por Richter et al. (2008), con un modelo de ratón transgénico para la EA (TgCRND8), sugieren que el EF en rueda de actividad, aplicado cuando la placa ya está presente, puede resultar más patológico que protector. Estos autores sugieren que el efecto beneficioso del ejercicio para contrarrestar el avance de la EA, puede depender del momento exacto en que se aplique el tratamiento durante el proceso de la enfermedad (Richter et al., 2008). En etapas donde la patología se hace más evidente, con presencia de placas seniles y ONF, el efecto de la terapia de EF debe ser más estudiado. No obstante, en nuestro trabajo el ejercicio aplicado en esta etapa de la patología, 12 a 15 meses de edad, produjo un efecto beneficioso y no patológico.

El EF forzado y el voluntario han sido mostrados por beneficiar el aprendizaje y/o la memoria, aunque se ha sugerido que el que se realiza de forma voluntaria puede producir más beneficios, inclusive siendo de corta duración (1 semana) (Vaynman et al., 2004a,b; 2007). Sin embargo, la mayoría de los efectos beneficiosos se han asociado al ejercicio de un largo período de duración (considerando como largo más de 3 semanas) (van Praag et al., 2005; Schweitzer et al., 2006; Radak et al., 2006; O'Callaghan et al., 2007). Nuestros resultados, en general, han estado en correspondencia con lo encontrado en otros modelos animales. Los efectos del EF se han apreciado tanto a nivel conductual como cognitivo, pudiéndose comprobar estas mejoras en el sistema inmuno-endocrino y en cuanto a los niveles de estrés oxidativo cerebral y de las proteínas cerebrales relacionadas con la disfunción sináptica y con las afectaciones cognitivas.

Ha sido publicado por diferentes autores que el ejercicio puede aumentar la expresión de una gran cantidad de proteínas cerebrales como el CREB (Vaynman et al., 2003; 2004a), el GDNF (Kleim et al., 2003; Tajiri et al., 2010), la subunidad NR2B del receptor NMDA (Farmer et al., 2004), el BDNF (ver refs. Vaynman et al., 2004a,b; 2007; Gomez-Pinilla et al., 2007; Macías et al., 2007; Goekint et al., 2008; Griesbach et al., 2009), la sinaptofisina (Vaynman et al., 2006; Hescham et al., 2009; Macías et al., 2009), la sinapsina (Gómez-Pinilla et al., 2001; Vaynman et al., 2004b; 2006), la IGF-1 (ver ref. Llorens-Martín et al., 2008), entre otras. En la mayoría de los casos en los que se muestra el aumento de estas proteínas los animales han sido sacrificados inmediatamente después de realizar el entrenamiento de EF. Sin embargo, en el presente trabajo los animales fueron sacrificados dos días después de haber realizado la prueba de MWM y 12 días después de haber terminado el tratamiento de EF. Es posible que

estos factores pudieran influir en que no encontráramos afectados los niveles de algunas de estas proteínas en los Tg SED, y de que no observáramos un claro efecto sobre ellas con el ejercicio. No obstante, como pocos estudios han mostrado el efecto del ejercicio sobre el contenido de GDNF (Kleim et al., 2003; Tajiri et al., 2010), damos cierta importancia a que en nuestro trabajo observemos un aumento de este en el hipocampo, con los tratamientos en los ratones machos de 7 meses de edad. El GDNF es un factor neurotrófico, que juega un importante papel en la supervivencia celular y en el aumento de las propiedades de la plasticidad sináptica con un adecuado crecimiento axonal (Arenas et al., 1995; Holm et al., 2002), factores que juegan un papel principal en el progreso de la EA.

En este sentido, también damos gran importancia al hecho de haber encontrado disminuidos el subtipo R2B del receptor NMDA y la sinaptofisina en el BO, ya que muy probablemente la pérdida de las funciones sensoriales comentadas en el capítulo 2, podrían estar relacionadas con la disminución de estas proteínas en el BO. Por otra parte, recientemente se ha publicado un estudio realizado con un modelo de ratón transgénico para la EA (Tg2576), donde se han encontrado disfunciones olfatorias asociadas a la presencia y aumento de A $\beta$  en el BO, detectado desde los 3 meses de edad, y en otras áreas del cerebro, como el córtex orbitofrontal, córtice piriforme anterior y posterior, el córtex entorrinal y el hipocampo (Wesson et al., 2010). En esta publicación se sugiere que las afectaciones conductuales de respuesta al olor en los ratones Tg2576, podría ser un indicador de la evolución de la patología de A $\beta$  y que podría servir para la monitorización de terapias encaminadas a su reducción (Wesson et al., 2010). En el presente trabajo, la disminución de la subunidad R2B y de la sinaptofisina en el BO, aportan nuevos datos a los posibles eventos que se producen en él durante la EA. Nuevas investigaciones en este sentido, con los ratones 3xTg-AD y/o con otros modelos de la enfermedad deben ser realizadas.

Como se ha comentado anteriormente, la actividad neuroprotectora del EF contra la EA se ha mostrado en una variedad de modelos animales. Esta actividad en los últimos años también ha comenzado a estudiarse en humanos (ver ref. Kramer et al., 2003). Por ejemplo, en un estudio reciente en New York, USA, con cerca de 2000 personas, se pudo comprobar que tanto la dieta mediterránea como el EF se pueden asociar a la disminución del riesgo de padecer la EA (Scarmeas et al., 2009). En otro estudio

realizado en Finlandia, con cerca de 1500 personas, se muestra que aquellos que realizaron ejercicio redujeron en un 60% el riesgo de padecer la enfermedad respecto a los sedentarios (Kivipelto and Solomon, 2008). En otro trabajo realizado en Canadá, con alrededor de 4600 adultos mayores, también pudieron comprobar el efecto protector del EF frente al riesgo de padecer la EA (ver ref. Laurin et al., 2001). Por último, en un estudio longitudinal realizado en Seattle, USA, se evaluaron 2000 personas mayores no dementes durante el transcurso de 6 años. Durante este tiempo 158 de los participantes desarrollaron demencia, 107 de las cuales se consideraron como EA. Aquí comprobaron que las personas que realizaban ejercicio tres veces o más a la semana presentaron una reducción del 40% del riesgo de desarrollar este tipo de enfermedad (Larson et al., 2006b). En algunos de estos estudios además, se han correlacionado positivamente los efectos neuroprotectores a la cantidad de EF, como una posible dosis-respuesta (Laurin et al., 2001; Scarmeas et al., 2009).

Más recientemente se han incrementado los estudios que se realizan en humanos relacionando el EF y las mejoras cognitivas. Por ejemplo, se muestra el valor del ejercicio físico para mejorar los procesos de control ejecutivo en mujeres adultas, con deterioro cognitivo leve (Baker et al., 2010b) y para mejorar la cognición de los adultos mayores con intolerancia a la glucosa, que se considera un factor de riesgo para la EA (Baker et al., 2010a). En otro trabajo, realizado en Minesota con 1324 sujetos, encontraron el EF moderado, en la mediana o avanzada edad, asociado a una menor probabilidad de tener problemas cognitivos leves (Geda et al., 2010).

También en España se han comenzado a realizar investigaciones en este sentido. En 2008 se publicó un estudio, con pacientes de la enfermedad, donde se muestra que después del entrenamiento, que fue de 12 semanas de duración, los pacientes aumentaron la fuerza muscular y la flexibilidad de las extremidades inferiores y superiores, mejoraron la agilidad, la dinámica, el equilibrio, la resistencia física y en especial la capacidad de realizar actividades de forma independiente (Santana-Sosa et al., 2008).

En otro sentido queremos destacar el efecto regulador del ejercicio sobre las afectaciones inmuno-endocrinas que se observaron en el modelo animal 3xTg-AD, mediante la estimación del peso de diferentes órganos y tejidos de este sistema. Durante

la discusión de cada capítulo particular se ha mostrado que los efectos del EF parece que pueden abarcar el sistema inmunológico y que varios autores han sugerido que estos efectos pueden ser beneficiosos. Aunque en el presente trabajo no se determinaron marcadores de inflamación cerebral, queremos argumentar que en algunos trabajos realizados con el modelo de ratón Tg2576, transgénico para la EA, se ha comprobado el efecto beneficioso de tratamientos de EF sobre la respuesta inmune en el cerebro (Nichol et al., 2008; Parachikova et al., 2008). En uno de los trabajos el EF produjo cambios de la respuesta inmune coincidiendo con la disminución de los niveles de A $\beta$  cerebrales en estados avanzados de la patología (Nichol et al., 2008). En el otro trabajo el EF produjo mejoras del aprendizaje coincidiendo con el aumento de varios marcadores de la respuesta inmune, incluyendo dos citoquinas, la CXCL1 y la CXCL12, que la relacionan con los procesos de mejoras cognitivas (Parachikova et al., 2008).

Algunos estudios muestran que en los ratones 3xTg-AD y en otros modelos de ratones transgénicos para la EA se produce la hiperactividad del eje HPA de una manera edad- y sexo-dependiente (Touma et al., 2004; Clinton et al., 2007), en correspondencia a otros autores que anteriormente habían mostrado cambios en la función de este eje en pacientes de la enfermedad (Davis et al., 1986; Hatzinger et al., 1995; Peskind et al., 1996). Se ha publicado que los pacientes de la EA son especialmente sensibles a los cambios en los niveles de cortisol, por ejemplo los enfermos con niveles altos de cortisol tienen un peor rendimiento en las tareas de memoria que los que tienen un bajo nivel (Carlson et al., 1999). Se ha visto que son incapaces de responder adecuadamente a las situaciones de estrés, lo que conduce a una hiperactividad crónica del eje HPA y a producir efectos perjudiciales sobre el envejecimiento cerebral (Deshmukh and Deshmukh, 1990).

Los trastornos psicológicos y de estado de ánimo que preceden y/o acompañan las alteraciones cognitivas en la EA tienen un efecto invalidante, que agrava la situación de los enfermos. Depresión, apatía, cambios de ritmo circadiano, agresividad, etc. son síntomas patológicos a considerar en una terapia integral anti-EA. En este sentido se han descrito efectos clínicos beneficiosos del EF. En el 2003 se publicó un trabajo realizado en USA entre 1994 y 1999, con 153 pacientes de la EA, donde observaron que los pacientes que realizaron ejercicio mejoraron las condiciones físicas, disminuyeron la

depresión y presentaron menor índice de institucionalización (Teri et al., 2003). Otro estudio realizado con 90 pacientes de la EA mostró que el ejercicio físico fue adecuado para mejorar las afectaciones relacionadas con el estado de ánimo (Williams and Tappen, 2007). Más recientemente se ha publicado un estudio, realizado en Brasil, con pacientes diagnosticados de trastorno depresivo mayor y con una edad superior a los 60 años, donde se muestra que el EF facilitó el tratamiento depresivo mayor, dando lugar a una mejoría clínica y física y a la protección contra una disminución de la actividad cortical (Deslandes et al., 2010). Otro estudio, empleando como muestra jóvenes entre 18 y 20 años con síntomas leves de depresión o sin ellos, también ha podido comprobar el efecto beneficioso del ejercicio físico sobre el sistema neuroendocrino (Nabkasorn et al., 2006). Trabajos anteriores también habían mostrado la efectividad del ejercicio físico en humanos para disminuir los niveles de estrés (Jin, 1992; Harte et al., 1995). El efecto regulador del EF sobre la ansiedad, la emotividad, la apatía y el miedo también han sido comprobados, mediante el presente trabajo, en el ratón 3xTg-AD.

Otro de los factores muy considerados en la literatura para disminuir el riesgo de padecer la EA o para su tratamiento, han sido los antioxidantes, naturales y/o sintéticos (ver ref. Arab and Sabbagh, 2010). Como se ha comentado con anterioridad, varios estudios muestran evidencias de la presencia de estrés oxidativo cerebral en los pacientes de la EA (Balazs and Leon, 1994; Lovell et al., 1995; Markesbery, 1997; Sayre et al., 1997; Ramassamy et al., 1999), asociándolo inclusive a las placas seniles y a los ONF (Vitek et al., 1994; Smith et al., 1996). Estas evidencias también han sido encontradas en diferentes modelos experimentales de la enfermedad (Li et al., 2004a; Schuessel et al., 2005; Esposito et al., 2006; Dumont et al., 2009a; Herring et al., 2010) y en correspondencia con ellos, hemos observado un aumento de los marcadores de estrés oxidativo en este estudio y en otro trabajo anterior con el modelo animal 3xTg-AD (Giménez-Llort et al., 2010).

En humanos, algunos estudios han mostrado la influencia de los antioxidantes sobre las funciones cognitivas (ver Praticò, 2008). Por ejemplo, un trabajo realizado con más de 4000 pacientes de avanzada edad muestra que la disminución de los niveles circulantes de vitamina E, pero no de vitamina A, C,  $\beta$ -caroteno y selenio, son consistentemente asociados a la disminución de la memoria (Perkins et al., 1999). Otro estudio relacionado con el envejecimiento, en Honolulu, asoció la toma suplementaria de

vitamina E o C a un mejor rendimiento cognitivo (Masaki et al., 2000). En un proyecto de envejecimiento y salud, realizado en Chicago, también se muestra que la toma suplementaria o mediante alimentos de estas vitaminas se correlacionan inversamente con el deterioro cognitivo (Morris et al., 2002). En Canadá, en un trabajo realizado con personas mayores de 65 años, concluyen que la suplementación con vitaminas antioxidantes proporciona cierto efecto protector para el deterioro cognitivo (Maxwell et al., 2005). En otro de los estudios, realizado con cerca de 1500 mujeres entre 70 y 79 años de edad, se muestra que la suplementación a largo plazo con vitamina C y E da como resultado un mejor estado cognitivo (Grodstein et al., 2003).

En esta misma dirección también se han realizado trabajos para determinar la importancia de los antioxidantes en la EA. En uno de ellos, realizado con más de 500 individuos, se estudia la ingesta dietética de vitamina E durante una media de 6 años y se asocia a un menor riesgo de padecer Alzheimer (Engelhart et al., 2002). No obstante, hay autores que no han encontrado asociación entre la toma de vitaminas antioxidantes y el menor riesgo de padecer la EA (Luchsinger et al., 2003; Zandi et al., 2004; Fillenbaum et al., 2005; Gray et al., 2008). En un estudio realizado en Valencia, España, se estudió el efecto de la vitamina E durante 6 meses en 57 pacientes de la EA, de los cuales terminaron el estudio 33 (Lloret et al., 2009). En ese trabajo observaron que, según los resultados obtenidos, se podían definir dos grupos de pacientes. Un primer grupo formado por pacientes que respondieron a la vitamina E bajando los niveles de estrés oxidativo, midiendo en sangre el GSSG, y que mantenían los niveles cognitivos, y un segundo grupo en los que la vitamina E no fue efectiva en prevenir el estrés oxidativo. En el segundo grupo los niveles cognitivos bajaron incluso más que en los que habían tomado placebo. Estos autores concluyen que no se debe recomendar la toma de vitamina E sin determinar su efecto antioxidante en cada paciente (Lloret et al., 2009).

Teniendo en cuenta estos trabajos citados, pensamos que el valor de los antioxidantes para prevenir o tratar la EA debe ser más estudiado. En nuestro trabajo medimos el efecto terapéutico de la melatonina, que como se ha comentado anteriormente, se valora en la literatura como un potente antioxidante. La melatonina es un antioxidante que ha tomado peso en las investigaciones de los últimos años. A estas propiedades antioxidantes recientemente se le han sumado la de que juega un papel neuroprotector

contra los péptidos de A $\beta$  (Pappolla et al., 1998; Chyan et al., 1999; Olivieri et al., 2001) y la de actuar evitando la hiperfosforilación de tau (Liu and Wang, 2002; Li et al., 2004b; Wang et al., 2004a,b; 2005b; Deng et al., 2005; Li et al., 2005). Es por ésto que ya se ha estado utilizando en los pacientes de la EA, para mejorar la ritmicidad circadiana, disminuir la conducta agitada, la confusión y para producir mejoras en la memoria (Brusco et al., 1998; 2000; Cohen-Mansfield et al., 2000; Cardinali et al., 2002a,b). Más recientemente también ha sido utilizada como tratamiento efectivo en pacientes con deterioro cognitivo leve (Furio et al., 2007).

En este estudio mostramos el efecto beneficioso, antioxidante y neuroprotector en general, de esta hormona. El tratamiento con melatonina de los ratones 3xTg-AD, con dosis de 10 mg/kg/día, indujo una mejora de la función sensorial, de la función inmuno-endocrina y de los patrones cognitivos. El menor efecto de esta indoleamina lo observamos sobre los patrones conductuales, no obstante en la discusión del capítulo 2 mostramos que en varios estudios han observado efectos beneficiosos de la melatonina sobre los patrones conductuales. Por otra parte, este tratamiento produjo un aumento de las enzimas antioxidantes cerebrales, lo cual se ha discutido que es de gran importancia para la EA. En general, los resultados obtenidos debido a la ingesta oral de melatonina han estado en total correspondencia con las propiedades que se le asocian en la literatura (ver refs. Reiter, 1998; 2001; Mantovani et al., 2003; Matsubara et al., 2003; Leon et al., 2004; Macchi and Bruce, 2004; Manda et al., 2007). En este estudio la melatonina se revela como una muy buena alternativa de tratamiento para la EA.

Además, mostramos que la combinación de este potente antioxidante con el ejercicio también podría ser una terapia efectiva para retardar y/o mejorar las afectaciones conductuales, sensoriales, motoras y cognitivas que se producen durante el avance de esta enfermedad. En este sentido deben ser realizadas nuevas investigaciones, para comprender la actuación conjunta de esta combinación. Sin embargo, el efecto reductor del EF sobre el estrés oxidativo ha sido comprobado por un gran número de investigadores (Radak et al., 2001a,b; Ogonovszky et al., 2005; Giménez-Llort et al., 2010; Radak et al., 2010). También ha sido demostrado que la práctica de ejercicio físico puede regular la actividad de las enzimas antioxidantes cerebrales (Somani et al., 1996a; 1995; Radak et al., 2001a,b; Devi and Kiran, 2004). En correspondencia con estos resultados, aquí mostramos que el EF, en general, produjo un efecto antioxidante

cerebral en el ratón 3xTg-AD. Además, se pudo comprobar una vez más su papel como regulador enzimático. El efecto beneficioso del EF voluntario también se pudo apreciar en recuperar las afectaciones producidas por la sustracción ovárica y la consecuente disminución de hormonas femeninas. Los grupos de ovariectomizadas mostraron afectaciones sensoriales, endocrinas, mayores niveles de ansiedad, disminución de la conducta exploratoria y afectaciones cognitivas. En este trabajo hemos mostrado que el EF podría ser una terapia adecuada para mejorar la calidad de vida de las mujeres adultas, con alteraciones derivadas de la disminución de las hormonas femeninas.

Actualmente la búsqueda de estrategias adecuadas para prevenir o tratar la EA ha sido la prioridad de muchos investigadores. Entendemos que este trabajo ha sido significativo en evaluar la intervención del ejercicio físico voluntario en puntos de tiempo que se han dirigido, tanto a la prevención como al comienzo y al aumento de la disminución cognitiva y de las demás afectaciones neuropatológicas vinculadas a la EA, utilizando el modelo de ratón 3xTg-AD. Además, mostramos la eficacia de la combinación de un potente antioxidante, como se considera a la melatonina, con el ejercicio físico para tratar tempranamente la enfermedad. Por otra parte, este estudio ha servido para realizar, en machos y hembras, una extensa caracterización conductual en etapas concretas de la vida de este modelo animal, mostrando que con el avance de la edad se hacen evidentes las afectaciones conductuales, cognitivas y de estrés oxidativo cerebral, en correspondencia a lo que ocurre en pacientes de la EA.



## **CONCLUSIONES**

---

---

## CONCLUSIONES

---

- 1- Confirmamos que en los ratones 3xTg-AD se producen afectaciones conductuales y cognitivas desde etapas tempranas del desarrollo del animal, que se acrecientan con el avance de la enfermedad.
- 2- La evaluación del estado de estrés oxidativo cerebral del ratón 3xTg-AD mostró elevados niveles de los LPO y del GSSG desde los 7 meses de edad, con una marcada desregulación de las enzimas antioxidantes.
- 3- Se ha demostrado que el ejercicio físico voluntario, en general, tiene un papel antioxidante dado que disminuyó los niveles de LPO y reguló el metabolismo del glutatión, así como la actividad de las enzimas antioxidantes.
- 4- La melatonina demostró tener un gran valor terapéutico ya que mejoró la función sensorial-motora, la función inmuno-endocrina, los niveles cognitivos y actuó como un potente antioxidante.
- 5- La combinación del ejercicio físico voluntario con la toma de melatonina resultó ser un tratamiento adecuado para la mejora de las afectaciones sensoriales motoras, conductuales y cognitivas de los ratones machos 3xTg-AD.
- 6- En los ratones 3xTg-AD se ha demostrado que con el avance de la edad se produce una disminución de proteínas cerebrales relacionadas con la EA, siendo más acentuada en machos que en hembras.
- 7- La carencia de hormonas sexuales en los ratones hembra NTg ovariectomizadas indujo afectaciones sensoriales, endocrinas, conductuales y cognitivas. En los ratones hembra 3xTg-AD, la ovariectomía produjo un aumento de las afectaciones relacionadas con la EA. El ejercicio físico voluntario fue eficiente en recuperar la mayor parte de las afectaciones relacionadas con la ovariectomía.
- 8- Se demuestra que el ejercicio físico voluntario, en rueda de actividad, en el modelo 3xTg-AD para la EA produce cambios en los patrones relacionados con

el estrés oxidativo cerebral, que se traducen en no sólo mejoras a nivel cognitivo sino también en patrones conductuales como la ansiedad o la exploración.

- 9- Confirmamos que el ejercicio físico voluntario puede ser una terapia adecuada en humanos aplicada en diferentes etapas de la enfermedad; aunque parece evidente que un tratamiento preventivo sería más adecuado para obtener los mejores resultados.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Abramov A.Y., Canevari L. and Duchon M.R. (2004). Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J Neurosci*, 24(2): 565-75.
- Acuña-Castroviejo D., Reiter R.J., Menendez-Pelaez A., Pablos M.I. and Burgos A. (1994). Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res*, 16: 100-12.
- Adlard P., Perreau V., Pop V. and Cotman C. (2005). Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 25: 4217-4221.
- Adlard P.A. & Cotman C.W. (2004). Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neurosci*, 124: 985-992.
- Akagi S., Mizoguchi A., Sobue K., Nakamura H. & Ide, C. (1996). Localization of synapsin I in normal fibers and regenerating axonal sprouts of the rat sciatic nerve. *Histochem. Cell Biol*, 105: 365-73.
- Aksu I., Topcu A., Mehmet Camsari U. and Acikgoz O. (2009). Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett*, 452: 281-285.
- Albenis B.C. (2001). Models of brain injury and alterations in synaptic plasticity. *J Neurosci Res*, 65(4): 279-83.
- Alexander J.L. (2007). Quest for timely detection and treatment of women with depression. *J Manag Care Pharm*, 13(9 Suppl A): S3-11.
- Allegra M., Reiter R.J., Tan D.X., et al. (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res*, 34: 1-10.
- Almeida C.G., Tampellini D., Takahashi R.H., Greengard P., Lin M.T., Snyder E.M. and Gouras G.K. (2005). Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis*, 20(2): 187-98.
- Aloia J.F., Vaswani A., Yeh J.K., McGowan D.M. and Ross P. (1991). Biochemical short-term changes produced by hormonal replacement therapy. *J Endocrinol Invest*, 14: 927-934.
- András E., Páli N., Molnár Z. and Kösel S. (2005). Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients. *J Alzheimer's Dis*, 7: 273-84.
- Antón-Tay F., Martínez I., Tovar R., Benítez-King G. (1998). Modulation of the subcellular distribution of calmodulin by melatonin in MDCK cells. *J Pineal Res*, 24: 35-42.
- Arab L. and Sabbagh M.N. (2010). Are Certain Lifestyle Habits Associated with Lower Alzheimer's Disease Risk? *J Alzheimer's Dis*, 20: 785-94.

- Araujo J.A., Studzinski C.M. and Milgram N.W. (2005). Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29: 411-22.
- Arendash G.W., King D.L., Gordon M.N., Morgan D., Hatcher J.M., Hope C.E., Diamond D.M. (2001). Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Research*, 891: 42–53.
- Arenas E., Trupp M., Akerud P. and Ibanez C.F. (1995). GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron*, 15: 1465-73.
- Arendt J. (2000). Melatonin, circadian rhythms and sleep. *New Engl J Med*, 343: 1114-16.
- Arendt T., Hanisch F., Holzer M. and Bruckner M.K. (1994). In vivo phosphorylation in the rat basal nucleus induces PHF-like and APP immunoreactivity. *Neuro Report*, 5(11): 1397–1400.
- Arendt T., Holzer M., Furth R., Bruckner M.K. and Gartner U. (1995). Paired helical filament-like phosphorylation of tau, deposition of beta/A4-amyloid and memory impairment in rat induced by chronic inhibition of phosphatase 1 and 2A. *Neuroscience*, 69(3): 691–98.
- Avis N.E., Stellato R., Crawford S., Bromberger J., Ganz P., Cain V., et al. (2001). Is there a menopausal syndrome? Menopausal status and symptoms across racial/ethnic groups. *Soc Sci Med*, 2: 345–56.
- Axelrod J. (1974). The pineal gland: a neurochemical transducer. *Scienc*, 184: 1341-44.
- Baeza I., Alvarado C., Alvarez P., Salazar V., Castillo C., Ariznavarreta C., Fdez-Tresguerres J.A. and De la Fuente M. (2009). Improvement of leucocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens. *J Reprod Immunol*, 80: 70–79.
- Baeza I., De Castro N.M., Alvarado C., Alvarez P., Arranz L., Bayón J. and De la Fuente M. (2007). Improvement of immune cell functions in aged mice treated for five weeks with soybean isoflavones. *Ann NY Acad Sci*, 1100: 497–504.
- Baeza I., De Castro N.M., Giménez-Llort L. and De la Fuente M. (2010). Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *J Neuroimmunology*, 219: 90–99.
- Baker L.D., Frank L.L., Foster-Schubert K., Green P.S., Wilkinson C.W., et al. (2010a). Aerobic Exercise Improves Cognition for Older Adults with Glucose Intolerance: A Risk Factor for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, Aug 30, [Epub ahead of print].
- Baker L.D., Frank L.L., Foster-Schubert K., Green P.S., Wilkinson C.W., et al. (2010b). Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial. *Arch Neurol*, 67: 71-79.
- Balazs L. and Leon M. (1994). Evidence of anoxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem Res*, 19: 1131-37.

- Bartness T.J., Demas G.E. and Song C.K. (2002). Seasonal Changes in Adiposity: the Roles of the Photoperiod, Melatonin and Other Hormones, and Sympathetic Nervous System. *Exp Biol Med*, 227(6): 363–376.
- Barnes D., Yaffee K., Satariano W. & Tage, I. (2003). A longitudinal study of cardiorespiratory fitness and cognitive function in healthy older adults. *J Amer Geront Soc*, 51: 459–465.
- Bartlett T.E., Bannister N.J., Collett V.J., Dargan S.L., Massey P.V., Bortolotto Z.A., et al. (2007). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology* 52: 60-70.
- Basu S.K., Ho Y.K., Brown M.S., Bilheimer D.W., Anderson R.G. and Goldstein J.L. (1982). Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem*, 257: 9788-95.
- Baydas G., Ozveren F., Akdemir I., et al. (2005). Learning and memory deficits in rats induced by chronic thinner exposure are reversed by melatonin. *J Pineal Res*, 39: 50-56.
- Benot S., Goberna R., Reiter R.J., García-Maurino S., Osuna C. and Guerrero J.M. (1999). Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *J Pineal Res*, 27: 59–64.
- Benot S., Molinero P., Soutto M., Goberna R., and Guerrero J.M. (1998). Circadian variations in the rat serum total antioxidant status: correlation with melatonin levels. *J Pineal Res*, 25: 1–4.
- Berberich S., Punnakkal P., Jensen V., Pawlak V., Seeburg P. H., Hvalby O., et al. (2005). Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, 25: 6907-10.
- Bertoni-Freddari C., Fattoretti P., Casoli T., Caselli U. and Meier-Ruge W. (1996). Deterioration threshold of synaptic morphology in aging and senile dementia of Alzheimer's type. *Anal Quant Cytol Histol*, 18: 209-13.
- Bethea C.L., Brown N.A. and Kohama S.G. (1996). Steroid regulation of estrogen and progestin receptor messenger ribonucleic acid in monkey hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, 137: 4372-83.
- Beyreuther K. and Masters C.L. (1991). Amyloid precursor protein (APP) and beta A4 amyloid in the etiology of Alzheimer's disease: precursor-product relationships in the derangement of neuronal function. *Brain Pathol*, 1: 241-51.
- Bianchini F., Faaks R. and Vainio H. (2002). Weight control and physical activity in cancer prevention. *Obes Rev*, 3(1): 5-8. Review..
- Billings L.M., Oddo S., Green K.N., McLaugh J.L. and LaFerla F.M. (2005). Intraneuronal Ab causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neurone*, 45: 675–688.

- Billings L.M., Green K.N., McGaugh J.L. and LaFerla F.M. (2007). Learning Decreases A $\beta$ \*56 and Tau Pathology and Ameliorates Behavioral Decline in 3xTg-AD Mice. *J Neurosci*, 27(4): 751-61.
- Bimonte-Nelson H.A., Singleton R.S., Hunter C.L., Price K.L., Moore A.B. and Granholm A.C. (2003). Ovarian hormones and cognition in the aged female rat: I. Long-term, but not short-term, ovariectomy enhances spatial performance. *Behav Neurosci*, 117 (6): 1395–406.
- Bird T.D. (2008). Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med*, 10(4): 231-9. Review.
- Bito H., Deisseroth K., Tsien R.W. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, 87: 1203-14.
- Björntorp P. (1991). Adipose tissue distribution and function. *Int J Obesity*, 15: 67–81.
- Blais A., Malet A., Mikogami T., Martin-Rouas C. and Tomé D. (2009). Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296: 1281-88.
- Bob P., Freybergh P.F., Jasova D., Susta M., Pavlat J., Zima T., et al. (2008). Depression, cortisol and somatoform dissociative symptoms. *Neuro Endocrinol Lett*, 29(2): 235-9.
- Boerwinkle E., Visvikis S., Welsh D., Steinmetz J., Hanash S.M. and Sing C.F. (1987). The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. II. The role of the apolipoprotein E polymorphism in determining levels, variability, and covariability of cholesterol, betalipoprotein, and triglycerides in a sample of unrelated individuals. *Am J Med Genet*, 27: 567-82.
- Borchelt D.R., Ratovitski T., Van Lare J., Lee M.K., Gonzales V., et al. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 19: 939-45.
- Boteva K., Vitek M., Mitsuda H., De Silva H., Xu P.T., Small G. and Gilbert J.R. (1996). Mutation analysis of presenilin 1 gene in Alzheimer's disease. *Lancet*, 347: 130-1.
- Bourin M., Mocaer E. and Porsolt R. (2004). Antidepressant-like activity of S20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *J Psychiatry Neurosci*, 29: 126-33.
- Bray G.A. and Bellanger T. (2006). Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine*, 29: 109–117
- Brookmeyer R., Gray S. and Kawas C. (1998). Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health*, 88: 1337-42.
- Brummelte S., Pawluski J.L. and Galea L.A. (2006). High post-partum levels of corticosterone given to dams influence postnatal hippocampal cell proliferation and



- behavior of offspring: a model of post-partum stress and possible depression. *Horm Behav*, 50: 370-82.
- Brusco L.I., Marquez M. and Cardinali D.P. (1998). Monozygotic twins with Alzheimer's disease treated with melatonin: case report. *J Pineal Res*, 25: 260–63.
  - Brusco L.I., Marquez M. and Cardinali D.P. (2000). Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinol Lett*, 21: 39–42.
  - Bubenik G.A., Ball R.O. and Pang S.F. (1992). The effect of food deprivation on brain and gastrointestinal tissue levels of tryptophan, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, and melatonin. *J Pineal Res*, 12: 7–16.
  - Bubenik G.A., Brown G.M. and Grota L.J. (1977). Immunohistological localization of melatonin in the rat digestive system. *Experientia*, 33: 662–3.
  - Bubenik G.A. and Dhanvantari S. (1989). Influence of serotonin and melatonin on some parameters of gastrointestinal activity. *J Pineal Res*, 7: 333–44.
  - Buxbaum J.D., Lilliehook C., Chan J.Y., Go R.C., Bassett S.S., et al. (2000). Genomic structure, expression pattern, and chromosomal localization of the human calsenilin gene: no association between an exonic polymorphism and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 294(3): 135-8.
  - Cacabelos R. (1993). Etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer. En J.C. Caballero García (ED.) Demencia: un reto para la asistencia de los ancianos. Barcelona Repto Disseny, (pp.43-60).
  - Caccamo A., Oddo S., Billings L.M., Green K.N., Martinez-Coria H., et al. (2006). M1 Receptors Play a Central Role in Modulating AD-like Pathology in Transgenic Mice. *Neuron*, 49: 671-82.
  - Cadenas E. (1995). Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species. In: *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. S. Ahmad, Ed.: 1–61. Chapman and Hall. London.
  - Campbell J.E., Király M.A., Atkinson D.J., D'souza A.M., Vranic M. and Riddell M.C. (2010). Regular exercise prevents the development of hyperglucocorticoidemia via adaptations in the brain and adrenal glands in male Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299(1): R168-76.
  - Campbell J.E., Rakhshani N., Fediuc S., Bruni S. and Riddell M.C. (2009). Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training. *J Appl Physiol*, 106(1): 66-72.
  - Champion D., Flaman J.M., Brice A., Hannequin D., Dubois B., et al. (1995). Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 4: 2373-7.
  - Cannon B. and Nedergaard J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84: 277–359

- Canny B.J., O'Farrell K.A., Clarke I.J. and Tilbrook A.J. (1999). The influence of sex and gonadectomy on the hypothalamo–pituitary–adrenal axis of the sheep. *J Endocrinol*, 162: 215-25.
- Cardin A.D., Bowlin T.L. and Krstenansky J.L. (1988). Inhibition of lymphocyte proliferation by synthetic peptides homologous to human plasma apolipoprotein B and E. *Biochem Biophys Res Commun*, 154: 741-5.
- Cardinali D.P., Brusco L.I., Liberczuk C. and Furio A.M. (2002a). The use of melatonin in Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinol Lett*, 23 Suppl 1: 20–2.
- Cardinali D.P., Brusco L.I., Lloret S.P. and Furio A.M. (2002b). Melatonin in sleep disorders and jet-lag. *Neuro Endocrinol Lett*, 23 Suppl 1: 9–13.
- Cardinali D.P. & Pévet P. (1998). Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*, 2: 175-90.
- Cardinali D.P., Golombek D.A., Rosenstein R.E., Cutrera R.A. and Esquifino A.I. (1997). Melatonin site and mechanism of action: single or multiple? *J Pineal Res*, 23: 32–39.
- Carey M.P., Deterd C.H., de Koning J., Helmerhorst F. and de Kloet E.R. (1995). The influence of ovarian steroids on hypothalamic–pituitary–adrenal regulation in the female rat. *J Endocrinol*, 144: 311-21.
- Carlson L.E., Sherwin B.B. and Chertkow H.M. (1999). Relationships between dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and cortisol (CRT) plasma levels and everyday memory in Alzheimer's disease patients compared to healthy controls. *Horm Behav*, 35: 254-63.
- Castillo C., Cruzado M., Ariznavarreta C., Lahera V., Cachofeiro V., Gil-Loyzaga P. and Tresguerres J.A.F. (2005). Effects of ovariectomy and GH administration on body composition and vascular structure and function in old female rats. *Exp Biogerontol*, 6: 49–60.
- Castillo C., Salazar V., Ariznavarreta C., Vara E. and Tresguerres J.A.F. (2006). Effect of isoflavone administration on age-related hepatocyte changes in old ovariectomized female Wistar rats. *Phytomedicine*, 13: 468–476.
- Cauley J.A., Petrini A.M., LaPorte R.E., Sandler R.B., Bayles C.M., Robertson R.J. and Slemenda C.W. (1987). The decline of grip strength in the menopause: relationship to physical activity, estrogen use and anthropometric factors. *J Chronic Dis*, 40: 115–120.
- Celsi F., Ferri A., Casciati A., D'Ambrosi N., Rotilio G., Costa A., et al. (2004). Overexpression of superoxide dismutase 1 protects against beta-amyloid peptide toxicity: effect of estrogen and copper chelators. *Neurochem Int*, 44: 25–33.
- Chartier-Harlin M.C., Crawford F., Houlden H., Warren A., Hughes D., et al. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*, 353: 844-6.
- Chartier-Harlin M.C., Parfitt M., Legrain S., Perez-Tur J., Brousseau T., et al. (1994). Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset

- forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet*, 3: 569-74.
- Chauhan V. and Chauhan A. (2006). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 13: 195–208.
  - Christie B.R., Swann S.E., Fox C.J., Froc D., Lieblisch S.E., Redila V. and Webber A. (2005). Voluntary exercise rescues deficits in spatial memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. *Eur J Neurosci*, 21: 1719-26.
  - Chui D.H., Tanahashi H., Ozawa K., Ikeda S., Checler F., et al. (1999). Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med*, 5(5): 560–564.
  - Chyan Y.J., Poeggler B., Omar R.A., Chain D.G., Frangione B., Ghiso J. and Pappolla M.A. (1999). Potent neuroprotective properties against the Alzheimer b-amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. *J Biol Chem*, 274: 21937-42.
  - Chytrova G., Yinga Z and Gomez-Pinilla F. (2010). Exercise contributes to the effects of DHA dietary supplementation by acting on membrane-related synaptic systems. *Brain Res*, 1341: 32-40.
  - Clark R.G. and Tarttelin M.F. (1982). Some effects of ovariectomy and estrogen replacement on body composition in the rat. *Physiol Behav*, 28: 963-69.
  - Clayton D.A., Mesches M.H., Alvarez E., Bickford P.C. and Browning, M.D. (2002). A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J Neurosci*, 22: 3628-37.
  - Cleary J.P., Walsh D.M., Hofmeister J.J., Shankar G.M., Kuskowski M.A., Selkoe D.J. and Ashe K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci*, 8(1): 79-84.
  - Clinton L.K., Billings L.M., Green K.N., Caccamo A., Ngo J., et al. (2007). Age-dependent sexual dimorphisms in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis*, 28(1): 76–82.
  - Cohen-Mansfield J., Garfinkel D. and Lipson S. (2000). Melatonin for treatment of sundowning in elderly persons with dementia: a preliminary study. *Arch Gerontol Geriatr*, 31: 65–76.
  - Colcombe S. and Kramer A.F. (2003). Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychol Sci*, 14(2): 125-30.
  - Colcombe S.J., Kramer A.F., McAuley E., Erickson K.I. and Scalf P. (2004). Neurocognitive aging and cardiovascular fitness: recent findings and future directions. *J Mol Neurosci*, 24: 9–14.
  - Corder E.H., Saunders A.M., Risch N.J., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., et al. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 7: 180-4.

- Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., et al. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261: 921-3.
- Cork L.C., Masters C., Beyreuther K. and Price D.L. (1990). Development of senile plaques. Relationships of neuronal abnormalities and amyloid deposits. *Am J Pathol*, 137: 1383-92.
- Cotman C.W. and Berchtold N.C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*, 25: 295–301.
- Cotman C.W. and Berchtold N.C. (2007). Physical activity and the maintenance of cognition: Learning from animal models. *Alzheimers Dement*, 3: S30-S37.
- Coyle J.T., Pice D.L. and DeLong M.R. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219: 1184-90.
- Cracchiolo J.R., Mori T., Nazian S.J., Tan J., Potter H. and Arendash G.W. (2007). Enhanced cognitive activity – over and above social or physical activity – is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Abeta deposition, and increase synaptic immunoreactivity. *Neurobiol Learn Mem*, 88: 277–294.
- Crawley J.N. (1981). Neurolpharmacologic specificity of a symple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, 15 (5): 695-9.
- Crook R., Ellis R., Shanks M., Thall L.J., Perez-Tur J., et al. (1997). Early-onset Alzheimer's disease with presenilin-1 mutation at the site corresponding to the Volga German presenilin-2 mutation. *Ann Neurol*, 42: 124-8.
- Cruts M., Van Duijn C.M., Backhovens H., Van Den Broeck M., Wehnert A., et al. (1998). Stimulation of the genetic contribution of presenilin-1 and –2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 7: 43-51.
- Csaba G. and Barath P. (1975). Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol Exper*, 959-67.
- Csaba G., Reti I. and Fischer J. (1970). Effect of pineal body on thyroid-thymus correlations. *Acta Med Acad Sci Hung*, 27: 183-189.
- Cui L., Hofer T., Rani A., Leeuwenburgh C. and Foster T.C. (2007). Comparison of lifelong and late life exercise on oxidative stress in the cerebellum. *Neurobiol Aging*, 30(6): 903-9.
- Cummings B.J., Head E., Afagh A.J., Milgram N.W. and Cotman C.W. (1996a). Beta-amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. *Neurobiol Learn Mem*, 66: 11-23.
- Cummings B.J., Head E., Ruehl W., Milgram N.W. and Cotman C.W. (1996b). The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol Aging*, 17: 259-68.
- Cuyckens F., Balcaen L.I., De Wolf K., De Samber B., Van Looveren C., et al. (2008). Use of the bromine isotope ratio in HPLCICP-MS and HPLC-ESI-MS analysis of a new drug in development. *Anal Bioanal Chem*, 390: 1717-29.

- Daffner K.R., Scinto L.F., Weintraub S., Guinessey J.E., Mesulam M.M. (1992). Diminished curiosity in patients with probable Alzheimer's disease as measured by exploratory eye movements. *Neurology*, 42: 320–328.
- Dagnino-Subiabre A., Orellana J.A., Carmona-Fontaine C. et al. (2006). Chronic stress decreases the expression of sympathetic markers in the pineal gland and increases plasma melatonin concentration in rats. *J Neurochem*, 97:1279–1287.
- Daniel J.M., Hulst J.L. and Berbling J.L. (2006). Estradiol replacement enhances workingmemory in middle-aged rats when initiated immediately after ovariectomy but not after a longterm period of ovarian hormone deprivation. *Endocrinology*, 147(1): 607–14.
- Darnaudéry M., Perez-Martin M., Bélizaire G., Maccari S. and Garcia-Segura L.M. (2006). Insulin-like growth factor 1 reduces age-related disorders induced by prenatal stress in female rats. *Neurobiol Aging*, 27: 119-27.
- Dumas S., Sandin J., Chen K.S., Kobayashi D., Tulloch J., Martin S.J., Games D. and Morris R.G. (2008). Faster forgetting contributes to impaired spatial memory in the PDAPP mouse: deficit in memory retrieval associated with increased sensitivity to interference? *Learn Mem*, 15: 625–632.
- Davis K.L., Davis B.M., Greenwald B.S., Mohs R.C., Mathe A.A., Johns C.A. and Horvath T.B. (1986). Cortisol and Alzheimer's disease, I: Basal studies. *Am J Psychiatry*, 143: 300-05.
- de Chaves G., Moretti M., Castro A.A., Dagostin W., da Silva G.G., et al. (2009). Effects of long-term ovariectomy on anxiety and behavioral despair in rats. *Physiology & Behavior*, 97: 420-25.
- De Kloet E.R. (2003). Hormones, brain and stress. *Endocr Regul*, 37: 51–68.
- DeKosky S.T. and Scheff S.W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*, 27:457–464.
- Dekosky S.T., Scheff S.W. and Styren S.D. (1996). Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration*, 5: 417-21.
- De la Fuente M., Baeza I., Guayerbas N., Puerto M., Castillo C., Salazar V., Ariznavarreta C. and Fdez-Tresguerres J.A. (2004). Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontol*, 5: 389–400.
- De Lacoste M.C. and White C.L. (1993). The role of cortical connectivity in Alzheimer disease pathogenesis: a review and model system. *Neurobiol Aging*, 14: 1-16.
- Demuro A., Mina E., Kayed R., Milton S.C., Parker I. and Glab C.G. (2005). Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem*, 280: 17294-300.
- Deng Y.Q., Xu G.G., Duan P., Zhang Q. and Wang J.Z. (2005). Effects of melatonin on wortmannin-induced tau hyperphosphorylation. *Acta Pharmacol Sin*, 26: 519–26.

- Desagher S., Glowinski J., and Premont J. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci*, 16: 2553-62.
- Deshmukh V.D. and Deshmukh S.V. (1990). Stress-adaptation failure hypothesis of Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*, 32: 293-95.
- Deslandes A.C., Moraes H., Alves H., Pompeu F.A., Silveira H., et al. (2010). Effect of aerobic training on EEG alpha asymmetry and depressive symptoms in the elderly: a 1-year follow-up study. *Braz J Med Biol Res*, 43(6): 585-92.
- De Strooper B., Beullens M., Contreras B., Levesque L., Craessaerts K., et al. (1997). Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem*, 272: 3590-8.
- De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K., Vanderstichele H., Guhde G., et al. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391: 387-90.
- Devi S. and Kiran T. (2004). Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary vitamin E in aging rat brain. *Neurobiol Aging*, 25: 501-508.
- Devi L., Prabhu B.M., Galati D.F., Avadhani N.G. and Anandatheerthavarada H.K. (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*, 26(35): 9057-68.
- Dietrich M.O., Mantese C.E., Porciuncula L.O., Ghisleni G, et al. (2005). Exercise affects glutamate receptors in postsynaptic densities from cortical mice brain. *Brain Research*, 1065: 20-25.
- Dilek M., Nazirođlu M., Baha Oral H., Suat Ovey I., Kūçūkayaz M., et al. (2010). Melatonin modulates hippocampus NMDA receptors, blood and brain oxidative stress levels in ovariectomized rats. *J Membr Biol*, 233(1-3): 135-42.
- Dubocovich M.L., Masana M.I. and Benloucif S. (2000). Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. In: Olcese J, editor. Melatonin after four decades. New York: Plenum Publishers/Kluwer Academic. p181–190.
- Dubocovich M.L., Rivera-Bermudez M.A., Gerdin M.J. and Masana M.I. (2003). Molecular pharmacology, regulation, and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci*, 8: 1093–1108.
- Duff K., Eckman C., Zehr C., Yu X., Prada C.M., et al. (1996). Increased amyloid-beta 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383: 710-13.
- Dumont M., Wille E., Stack C., Calingasan N.Y., Flint Beal M., and Lin M.T. (2009a). Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*, 23(8): 2459-66.
- Dumont M., Wille E., Calingasan N.Y., Tampellini D., Williams C., et al. (2009b). Triterpenoid CDDO-methylamide improves memory and decreases amyloid plaques in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 109: 502-12.

- During M.J., Young D., Baer K., Lawlor P. and Klugmann M. (2003). Development and optimization of adeno-associated virus vector transfer into the central nervous system. *Methods Mol Med*, 76: 221-36.
- Duyckaerts C., Potier M.C. and Delatour B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*, 115: 5–38.
- Eadie B.D., Redila V.A. and Christie B.R. (2005). Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *J Comp Neurol*, 486: 39–47.
- Eckert A., Keil U., Marques C.A., Bonert A., Frey C., Schussel K., et al. (2003). Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*, 66: 1627–34.
- Eckert A., Hauptmann S., Scherping I., Meinhardt J., Rhein V., et al. (2008). Oligomeric and fibrillar species of beta-amyloid (A beta 42) both impair mitochondrial function in P301L tau transgenic mice. *J Mol Med*, 86(11): 1255-67.
- Edelman L., Hanson P.I., Chapman E.R., Jahn R. (1995). Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J*, 14(2): 224-31.
- Elsayy B. and Higgins KE. (2010). Physical activity guidelines for older adults. *Am Fam Physician*, 81(1): 55-9.
- Engelhart M.J., Geerlings M.I., Ruitenberg A., van Swieten J.C., Hofman A., Witteman J.C. and Breteler M.M. (2002). Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA*, 287: 3223-29.
- Erickson K., Prakash R., Voss M., Chaddock L., Hu L., et al. (2009). Aerobic fitness is associated with hippocampal volume in elderly humans. *Hippocampus*, 19: 1030-39.
- Essman W.B. (1967). Differences in locomotor activity and brain-serotonin metabolism in differentially housed mice. *J Comp Physiol Psychol*, 66: 244-6
- Esposito L., Raber J., Kekoni L., Yan F., Yu G Q., Bien-Ly N., et al. (2006). Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer's disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*, 26: 5167-79.
- Esteban S., Garau C., Aparicio S., et al. (2010). Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *J Pineal Res*, 48:170–177.
- Esterbauer H. (1985). Lipid peroxidation production: formation, chemical properties and biological activities. In: *Free Radicals and Liver Injury*. G. Poli, K.H. Cheeseman, M.V. Diangani & T.F. Slater, Eds.: 29–47. IRL Press. Arlington.
- Estrada-Camarena E., Fernández-Guasti A. and López-Rubalcava C. (2003). Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, 28: 830–838.

- Evans P., Klinowski J., Yano E. and Urano N. (1989). Alzheimer's disease: a pathogenic role for aluminosilicate-induced phagocytic free radicals. *Free Radic Res Commun*, 6: 317-21.
- Faber P.W., Voisine C., King D.C., Bates E.A. and Hart A.C. (2002). Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 17131-36.
- Fadel J., Sarter M. and Bruno J.P. (1999). Age-related attenuation of stimulated cortical acetylcholine release in basal forebrain-lesioned rats. *Neuroscience*, 90: 793–802.
- Fainman J., Eid M.D., Ervin F.R. and Palmour R.M. (2007). A Primate Model for Alzheimer's Disease: Investigation of the ApolipoproteinE Profile of the Vervet Monkey of St. Kitts. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B(6): 818–9.
- Falconer E.M. and Galea L.A. (2003). Sex differences in cell proliferation, cell death and defensive behavior following acute predator odor stress in adult rats. *Brain Res*, 975: 22–36.
- Farmer J., Zhao X., van Praag H., Wodtke K., Gage F.H. and Christie B.R. (2004). Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neurosci*, 124: 71–79.
- Fillenbaum G.G., Kuchibhatla M.N., Hanlon J.T., Artz M.B., Pieper C.F., et al. (2005). Dementia and Alzheimer's disease in community-dwelling elders taking vitamin C and/or vitamin E. *Ann Pharmacother*, 39: 2009-14.
- Finckh U., Muller-Thomsen T., Mann U., Eggers C., Marksteiner J., et al. (2000). High prevalence of pathogenic mutations in patients with early-onset dementia detected by sequence analyses of four different genes. *Am J Hum Genet*, 67: 1033-5.
- Finkbeiner S. (2000). CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron*, 25: 11–14.
- Finkbeiner S., Tavazoie S.F., Maloratsky A., Jacobs K.M., Harris K.M. and Greenberg M.E. (1997). CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 19: 1031-47.
- Fisher J.S., Hasser E.M. and Brown M. (1998). Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 85: 1316–1321.
- Flicker C., Ferris S.H. and Reisberg B. (1991). Mild Cognitive Impairment In The Elderly. Predictors of Dementia. *Neurology*, 41(7): 1006-09.
- Fox C.J., Russell K.I., Wang Y.T. and Christie B.R. (2006). Contribution of NR2A and NR2B NMDA subunits to bidirectional synaptic plasticity in the hippocampus in vivo. *Hippocampus*, 16(11): 907-15.
- Frasor J., Barnett D.H., Danes J.M., Hess R., Parlow A.F. and Katzenellenbogen B.S. (2003). Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinol*, 144: 3159-66.
- Fridovich I. (1978). Oxygen free radicals and tissue damage: chairman's introduction. *Ciba Found Symp*, (65): 1-4.



- Frye C.A. and Wawrzycki J. (2003). Effect of prenatal stress and gonadal hormone condition on depressive behaviors of female and male rats. *Horm Behav*, 44: 319-26.
- Frye C.A. and Walf A.A. (2004). Estrogen and/or progesterone administered systemically or to the amygdala can have anxiety-, fear-, and pain-reducing effects in ovariectomized rats. *Behav Neurosci*, 118: 306-13.
- Frye C.A., Walf A.A., Rhodes M.E. and Harney J.P. (2004). Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5 alpha-reductase. *Brain Res*, 1004, 116-24.
- Fuchs E., Czéh B., Kole M.H., Michaelis T. and Lucassen P.J. (2004). Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur Neuropsychopharmacol*, 14: 481-90.
- Fujii N., Hayashi T., Hirshman M.F., Smith J.T., Habinowski S.A., et al. (2000). Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(3): 1150-5.
- Furio A.M., Brusco L.I. and Cardinali D.P. (2007). Possible therapeutic value of melatonin in mild cognitive impairment: a retrospective study. *J Pineal Res*, 43(4): 404-409.
- Galletti F. and Klopper A. (1964). The effect of progesterone on the quantity and distribution of body fat in the female rat. *Acta Endocrinol*, 46: 379-86.
- Gandy S. and Petanceska S. (2001). Regulation of alzheimer beta-amyloid precursor trafficking and metabolism. *Adv Exp Med Biol*, 487: 85-100.
- García Y., Cristòfol R., Giménez-Llort L., Sanfeliu C. (2009a). Effects of voluntary exercise on behaviour and brain oxidative status in 3xTgAD. *Acta Physiologica*, 195 (Sppl. 667): 91.
- García Y., Revilla S., Cristòfol R., Suñol C., LaFerla F., Giménez-Llort L. and Sanfeliu C. (2009b). Voluntary exercise ameliorates both cognitive and noncognitive symptoms in the 3xTgAD mouse. *Alzh Dementia*, 5(4), (Sppl.1), P443.
- García-López M.J., Martínez-Martos J.M., Mayas M.D., Carrera M.P. and Ramírez-Expósito M.J. (2005). Influence of hormonal status on enkephalin-degrading aminopeptidase activity in the HPA axis of female mice. *Gen Comp Endocrinol*, 141: 135-40.
- García-Matas S., de Vera N., Aznar A.O., Marimon J.M., Adell A., Planas A.M., Cristòfol R. and Sanfeliu C. (2010). In vitro and in vivo activation of astrocytes by amyloid-beta is potentiated by pro-oxidant agents. *J Alzheimers Dis*, 20(1): 229-45.
- García-Pérez M.A., Del Val R., Noguera I., Hermenegildo C., Pineda B., Martínez-Romero A. and Cano A. (2006). Estrogen receptor agonists and immune system in ovariectomized mice. *Int J Immunopath Pharmacol*, 19: 807-19.
- Gearing M., Rebeck G.W., Hyman B.T., Tigges J. and Mirra S.S. (1995). Neuropathology and apolipoprotein E profile of aged chimpanzees: Implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:9382-86.

- Geda Y.E., Roberts R.O., Knopman D.S., Christianson T.J., Pankratz V.S., et al. (2010). Physical Exercise, Aging, and Mild Cognitive Impairment A Population-Based Study. *Arch Neurol*, 67(1): 80-86.
- Ghribi O., Larsen B., Schrag M. and Herman M.M. (2006). High cholesterol content in neurons increases BACE,  $\beta$ -amyloid, phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Exp Neurol*, 200: 460-67.
- Gibbs R.B. and Aggarwal P. (1998). Estrogen and basal forebrain cholinergic neurons: implications for brain aging and Alzheimer's disease-related cognitive decline. *Horm Behav*, 34: 98-111.
- Gibson G.E., Sheu K.F. and Blass J.P. (1998). Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm*, 105(8-9): 855-70. Review.
- Gillardon F., Rist W., Kussmaul L., Vogel J., Berg M., et al. (2007). Proteomic and functional alterations in brain mitochondria from Tg2576 mice occur before amyloid plaque deposition. *Proteomics*, 7(4): 605-16.
- Giménez-Llort L., Arranz L., Maté I., De la Fuente M. (2008). Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunomodulation*, 15: 331-343.
- Giménez-Llort L., Blázquez G, Cañete T., Johansson B., Oddo S., Tobeña A., LaFerla F.M., Fernández-Teruel A. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev*, 31(1): 125-47.
- Giménez-Llort L., García Y., Buccieri K., Revilla S., Suñol C., Cristòfol R., Sanfeliu C. (2010) Gender-specific neuroimmunoendocrine response to treadmill exercise in 3xTg-AD mice. *Int J Alz Dis*, vol. 2010, doi:10.4061/2010/128354.
- Glenner G.G. and Wong C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 120: 885-90.
- Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349: 704-6.
- Goedert M., Sisodia S.S. and Price D.L. (1991). Neurofibrillary tangles and betaamyloid deposits in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 1: 441-47.
- Goekint M., Heyman E., Roelands B., Njemini R., Bautmans I., Mets T. and Meeusen R. (2008). No influence of noradrenaline manipulation on acute exercise-induced increase of brain-derived neurotrophic factor. *Med Sci Sports Exerc*, 40: 1990-96.
- Golombek D.A., Pévet P. and Cardinali D.P. (1996). Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci Biobehav Rev Autumn*, 20(3): 403-12. Review.

- Gomez C., Saldivar-Gonzalez A., Delgado G. and Rodriguez R. (2002). Rapid anxiolytic activity of progesterone and pregnanolone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 72: 543–50.
- Gómez-Cabrera M.C., Domenech E. and Viña J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*, 44: 126-31.
- Gómez-Pinilla F. (2008). The influences of diet and exercise on mental health through hormesis. *Ageing Res Rev*, 7(1): 49-62.
- Gómez-Pinilla F., Soa V. and Kesslak J.P. (2001). Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Res*, 904: 13–19.
- Gómez-Pinilla F., Huie J., Ying Z., Ferguson A., Crown E., et al. (2007). BDNF and learning: Evidence that instrumental training promotes learning within the spinal cord by up-regulating BDNF expression. *Neuroscience*, 148: 893-906.
- Gomori A., Ishihara A., Ito M., Matsushita H., Ito M., Mashiko S., et al. (2007). Blockade of MCH1 receptor signalling ameliorates obesity and related hepatic steatosis in ovariectomized mice. *Br J Pharmacol*, 151: 900-08.
- Gordon M.N., King D.L., Diamond D.M., Jantzen P.T., Boyett K.V., Hope C.E., et al. (2001). Correlation between cognitive deficits and Abeta deposits in transgenic APP+PS1 mice. *Neurobiol Aging*, 22: 377–385.
- Gorfine T. and Zisapel N. (2007). Melatonin and the human hippocampus, a time dependent interplay. *J Pineal Res*, 43: 80–86.
- Götz J., Chen F., van Dorpe J. and Nitsch R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science*, 293(5534): 1491-5.
- Götz J., Deters N., Doldissen A., Bokhari L., Ke Y., et al. (2007). A decade of tau transgenic animal models and beyond. *Brain Pathol*, 17(1): 91-103.
- Gouras G.K., Tsai J., Naslund J., Vincent B., Edgar M., et al. (2000). Intraneuronal A $\beta$ 42 accumulation in human brain. *Am J Pathol*, 156(1): 15–20.
- Graves A.B., Larson E.B., Edland S.D., Bowen J.D., McCormick W.C., et al. (1996). Prevalence of dementia and its subtypes in the Japanese American population of King County, Washington State. The Kame Project. *Am J Epidemiol*, 144: 760-71.
- Gray S.L., Anderson M.L., Crane P.K., Breitner J.C., McCormick W., et al. (2008). Antioxidant vitamin supplement use and risk of dementia or Alzheimer's disease in older adults. *J Am Geriatr Soc*, 56: 291-95.
- Green K.N., Martinez-Coria H., Khashwji H., Hall EB, Yurko-Mauro KA, Ellis L, LaFerla FM. (2007). Dietary Docosahexaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid Ameliorate Amyloid- $\beta$  and Tau Pathology via a Mechanism Involving Presenilin 1 Levels. *J Neurosci*, 27(16): 4385-95.

- Griesbach G., Hovda D. and Gomez-Pinilla F. (2009). Exercise induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. *Brain Res*, 1288: 105-15.
- Grodstein F., Chen J. and Willett W.C. (2003). High-dose antioxidant supplements and cognitive function in community-dwelling elderly women. *Am J Clin Nutr*, 77: 975-84.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y.C., Zaidi M.S. and Wisniewski H.M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*, 261: 6084-9.
- Gussekloo J., Heeren T.J., Izaks G.J., Ligthart G.J. and Rooijmans H.G. (1995). A community study of incidence of dementia in subjects aged 85 years and over. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 59: 507-10.
- Gyllys K.H., Fein J.A., Yang F., Wiley D.J., Miller C.A. and Cole G.M. (2004). Synaptic changes in Alzheimer's disease: increased amyloid-beta and gliosis in surviving terminals is accompanied by decreased PSD-95 fluorescence. *Am J Pathol*, 165(5): 1809-17.
- Handelman G.E., Boyles J.K., Weisgraber K.H., Mahley R.W. and Pitas R.E. (1992). Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neuritis by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res*, 33: 1677-88.
- Hao L., Wang Y., Duan Y. and Bu S. (2010). Effects of treadmill exercise training on liver fat accumulation and estrogen receptor alpha expression in intact and ovariectomized rats with or without estrogen replacement treatment. *Eur J Appl Physiol*, 109(5): 879-86.
- Harte J.L., Eifert G.H. and Smith R. (1995). The effects of running and meditation on beta-endorphin, corticotropin-releasing hormone and cortisol in plasma, and on mood. *Biol Psychol*, 40: 251-65.
- Hatzinger M., Z'Brun A., Hemmeter U., Seifritz E., Baumann F., Holsboer-Trachsler E. and Heuser I.J. (1995). Hypothalamic-pituitary-adrenal system function in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 16: 205-09.
- Hauptmann S., Keil U., Scherping I., Bonert A., Eckert A. and Müller W.E. (2006). Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 41(7): 668-73.
- Head E. (2007). Combining an antioxidant-fortified diet with behavioral enrichment leads to cognitive improvement and reduced brain pathology in aging canines: strategies for healthy aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1114: 398-406.
- Head E., Liu J., Hagen T.M., Muggenburg B.A., Milgram N.W., et al. (2002). Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *J Neurochem*, 82: 375-81.
- Head E., Callahan H., Muggenburg B.A., Cotman C.W. and Milgram N.W. (1998). Visual-discrimination learning ability and beta-amyloid accumulation in the dog. *Neurobiol Aging*, 19: 415-25.

- Head E., McCleary R., Hahn F.F., Milgram N.W. and Cotman C.W. (2000). Region-specific age at onset of beta-amyloid in dogs. *Neurobiol Aging*, 21: 89-96.
- Head E., Barrett E.G., Murphy M.P., Das P., Nistor M., et al. (2006). Immunization with fibrillar A $\beta$ (1-42) in young and aged canines: Antibody generation and characteristics, and effects on CSF and brain A $\beta$ . *Vaccine*, 24: 2824-34.
- Hedberg M.M., Clos M.V., Ratia M., Gonzalez D., Unger Lithner C., Camps P., et al. (2010). Effect of Huprine X on beta-Amyloid, Synaptophysin and alpha7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain of 3xTg-AD and APP<sup>sw</sup>e Transgenic Mice. *Neurodegener Dis*, 2010 Aug 4. [Epub ahead of print]
- Heidary G. and Fortini M.E. (2001). Identification and characterization of the Drosophila tau homolog. *Mech Dev*, 108: 171-78.
- Henderson V. W., Paganini-Hill A., Emanuel C. K., Dunn M. E. and Buckwalter J. G. (1994). Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects. *Arch Neurol*, 51: 896-900.
- Henderson V.W. and Sherwin B.B. (2007). Surgical versus natural menopause: cognitive issues. *Menopause*, 14(3 Pt 2): 572-9.
- Hendrie H.C., Osuntokun B.O., Hall K.S., Ogunniyi A.O., Hui S.L., et al. (1995). Prevalence of Alzheimer's disease and dementia in two communities: Nigerian Africans and African Americans. *Am J Psychiatry*, 152: 1485-92.
- Herbison A.E. (1995). Neurochemical identity of neurones expressing oestrogen and androgen receptors in sheep hypothalamus. *J Reprod Fertil Suppl*, 49: 271-83.
- Heyn P., Abreu B.C. and Ottenbacher K.J. (2004). The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil*, 85(10): 1694-704.
- Herring A., Blome M., Ambrée O., Sachser N., Paulus W. and Keyvani K. (2010). Reduction of Cerebral Oxidative Stress Following Environmental Enrichment in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *Brain Pathol*, 20(1): 166-75.
- Heschem S., Grace L., Kellaway L.A., Bugarith K. and Russell V.A. (2009). Effect of exercise on synaptophysin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase levels in prefrontal cortex and hippocampus of a rat model of developmental stress. *Metab Brain Dis*, 24(4): 701-9.
- Hibaoui Y., Roulet E. and Rugg U.T. (2009). Melatonin prevents oxidative stress-mediated mitochondrial permeability transition and death in skeletal muscle cells. *J Pineal Res*, 47: 238-52.
- Hicks L.H. and Birren J.E. (1970). Aging, brain damage, and psychomotor slowing. *Psychol Bull*, 74: 377-96.
- Higuchi M., Ishihara T., Zhang B., Hong M., Andreadis A., et al. (2002). Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration. *Neuron*, 35(3): 433-46.

- Hilman C.H., Pontifex M.B., Raine L.B., Castelli D.M., Hall E.E. and Kramer A.F. (2009). The effect of acute treadmill walking on cognitive control and academic achievement in preadolescent children. *Neurosci*, 159: 1044-54.
- Himms-Hagen J. (1985). Brown adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Annu Rev Nutr*, 5: 69-94.
- Hirai K., Aliev G., Nunomura A., Fujioka H., Russell R.L., et al. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 21(9): 3017-23.
- Hirst J.J., West N.B., Brenner R.M. and Novy M.J. (1992). Steroid hormone receptors in the adrenal glands of fetal and adult rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*, 75: 308-14.
- Hof P.R., Cox K. and Morrison J.H. (1990). Quantitative análisis of vulnerable subset of piramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J Comp Neurol*, 301: 44-54.
- Hof P.R. and Morrison J.H. (1996). Hippocampal and neocortical involvement in normal brain aging and dementia: morphological and neurochemical of the vulnerable circuits. *J Am Geriatr Soc*, 44: 857-64.
- Hof P.R., Nimchinky E.A., Celio M.R., Bouras C. and Morrison J.H. (1993). Calretinin-immunoreactive neocortical interneurons are unaffected in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 152: 145-8.
- Hoffman-Goetz L. (1998). Influence of physical activity and exercise on innate immunity. *Nutr Rev*, 56(1 Pt 2): S126-30.
- Hofman A., Rocca W.A., Brayne C., Breteler M.M., Clarke M., Cooper B., et al. (1991). The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group. *Int J Epidemiol*, 20: 736-48.
- Hoijman E., Rocha Viegas L., Keller Sarmiento M.I., Rosenstein R.E. and Pecci A. (2004). Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology*, 145: 418-25.
- Holcomb L.A., Gordon M.N., McGowan E., Yu X., Benkovic S., et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med*, 4: 97-100.
- Holcomb L.A., Gordon M.N., Jantzen P., Hsiao K., Duff K., Morgan D. (1999). Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behavior Genetics* 29, 177-185.
- Holliman B.J. and Chyka P.A. (1997). Problems in assessment of acute melatonin overdose. *South Med J*, 90: 451-453.
- Holm P.C., Akerud P., Wagner J. and Arenas E. (2002). Neurturin is a neurotogenic but not a survival factor for developing and adult central noradrenergic neurons. *J Neurochem*, 81: 1318-27.

- Holmes C. (2002). Genotype and phenotype in Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry*, 180: 131-4.
- Holt H., Keeton R.W. and Vennesland B. (1936). The effect of gonadectomy on body structure and body weight in rats. *Am J Physiol*, 114: 515-25.
- Hou Y., White R.G., Bobik M., Marks J.S. and Russell M.J. (1997). Distribution of beta-amyloid in the canine brain. *Neuroreport*, 8: 1009-12 .
- Houlden H., Crook R., Backhovens H., Prihar G., Baker M., et al. (1998). ApoE genotype is a risk factor in non presenilin early-onset Alzheimer's disease families. *Am J Med Genet*, 81: 117-21.
- Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C., Harigaya Y., Younkin S., Yang F. and Cole G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274: 99-102.
- Hu J., Chen H. and Li Y. (2008). Development of a gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry method for the determination of buagafuran, a promising antianxiety drug in dog blood. *J Pharm Biomed Anal*, 47: 383-7.
- Hu S., Ying Z., Gomez-Pinilla F. and Frautschy S.A. (2009). Exercise can increase small heat shock proteins (sHSP) and pre- and postsynaptic proteins in the hippocampus. *Brain Res*, 1249: 191-201.
- Hua X., Lei M., Zhang Y., Ding J., Han Q., Hu G. and Xiao M. (2007). Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. *Life Sciences*, 80: 1897-1905.
- Hua X., Nohturfft A., Goldstein J.L. and Brown M.S. (1996). Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell*, 87: 415-26.
- Hubal M.J., Ingalls C.P., Allen M.R., Wenke J.C., Hogan H.A. and Bloomfield S.A. (2005). Effects of eccentric exercise training on cortical bone and muscle strength in the estrogen-deficient mouse. *J Appl Physiol*, 98:1674-1681,.
- Hutton M., Lewis J., Dickson D., Yen S.H. and McGowan E. (2001). Analysis of tauopathies with transgenic mice. *Trends Mol Med*, 7: 467-69.
- Impey S., Obrietan K., Wong S.T., Poser S., Yano S., et al. (1998). Cross talk between Erk and Pka is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and Erk nuclear translocation. *Neuron*, 21: 869-83.
- Janelsins M., Mastrangelo M.A., Oddo S., LaFerla F.M., Federoff H.J. and Bowers W.J. (2005). Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor- $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation*, 2: 23.
- Janus C., Phinney A.L., Chishti M.A. and Westaway D. (2001a). New developments in animal models of Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 1(5): 451-57.
- Janus C., Westaway D. (2001b). Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol Behav*, 73: 873-86.

- Jawhar S., Trawicka A., Jenneckens C., Bayer T.A. and Wirths O. (2010). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Abeta aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, Jul 8. [Epub ahead of print].
- Jaworski T., Kügler S. and Van Leuven F. (2010). Modeling of Tau-Mediated Synaptic and Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease. *Int J Alz Dis*, vol. 2010, Article ID 573138, 10 pages. doi:10.4061/2010/573138
- Jin P. (1992). Efficacy of Tai Chi, brisk walking, meditation, and reading in reducing mental and emotional stress. *J Psychosom Res*, 36: 361–70.
- Johnstone E.M., Chaney M.O., Norris F.H., Pascual R. and Little S.P. (1991). Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain Res Mol Brain Res*, 10: 299-305.
- Jorm A.F., Korten A.E. and Henderson A.S. (1987). The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature. *Acta Psychiatrica Scand*, 76: 465-79.
- Jovanovic J.N., Czernik A.J., Fienberg A.A., Greengard P. and Sihra T.S. (2000). Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci*, 3: 323–9.
- Kaewsuk S., Sae-ung K., Phansuwan-Pujito P. and Govitrapong P. (2009). Melatonin attenuates methamphetamine-induced reduction of tyrosine hydroxylase, synaptophysin and growth-associated protein-43 levels in the neonatal rat brain. *Neurochem Int*, 55(6): 397-405.
- Kakulas B.A., Wilton S.D., Fabian V.A. and Jones T.M. (1996). Apolipoprotein-E genotyping in diagnosis of Alzheimer's disease. *Lancet*, 348(9025): 483.
- Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., et al. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325: 733-6
- Kawas C., Resnick S., Morrison A., Brookmeyer R., Corrada M., Zonderman A., et al. (1997). A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology*, 48: 1517-21.
- Keil U., Hauptmann S., Bonert A., Scherping I., Eckert A. and Müller W.E. (2006). Mitochondrial dysfunction induced by disease relevant AbetaPP and tau protein mutations. *J Alzheimers Dis*, 9(2): 139-46. Review.
- Kidd P.M. (2008). Alzheimer's Disease, Amnesic Mild Cognitive Impairment, and Age-Associated Memory Impairment: Current Understanding and Progress Toward Integrative Prevention. *Altern Med Rev*, 13(2): 85-115.
- Kiessling S., Eichele G. and Oster H. (2010). Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. *J Clin Invest*, 120(7): 2600-9.



- King, D.L. and Arendash, G.W. (2002). Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: correlations with cognitive impairment. *Brain Research*, 926: 58–68.
- King D.L., Arendash G.W., Crawford F., Sterk T., Menendez J., Mullan M.J. (1999). Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APPsw transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Research*, 103: 145–162.
- Kitazawa M., Oddo S., Yamasaki T.R., Green K.N. and LaFerla F.M. (2005). Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Exacerbates Tau Pathology by a Cyclin-Dependent Kinase 5-Mediated Pathway in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci*, 25(39): 8843-53.
- Kivipelto M. and Solomon A. (2008). Alzheimer's disease – the ways of prevention. *J Nutr Health Aging*, 12: 89S-94S.
- Kleim J.A., Jones T.A. and Schallert T. (2003). Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury. *Neurochem Res Nov*, 28(11): 1757-69.
- König G., Monning U., Czech C., Prior R., Banati R., et al. (1992). Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of beta A4 precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J Biol Chem*, 267: 10804-9.
- Kopp C., Vogel E., Rettori M.C., Delagrangé P. and Misslin R. (1999a). The effects of melatonin on the behavioural disturbances induced by chronic mild stress in C3H/He mice. *Behav Pharmacol*, 10(1): 73-83.
- Kopp C., Vogel E., Rettori M.C., Delagrangé P. and Misslin R. (2000a). Anxiolytic-like properties of melatonin receptor agonists in mice: involvement of mt1 and/or MT2 receptors in the regulation of emotional responsiveness. *Neuropharmacology*, 39(10): 1865-71.
- Kopp C., Vogel E., Rettori M.C., Delagrangé P. and Misslin R. (2000b). Reentrainment of the spontaneous locomotor activity rhythm to a daylight reversal in C57BL/6 and C3H/He mice: implication of melatonin. *Physiol Behav*, 70(1-2): 171-6.
- Kopp C., Vogel E., Rettori M.C., Delagrangé P., Renard P., Lesieur D., Misslin R. (1999b). Regulation of emotional behaviour by day length in mice: implication of melatonin. *Behav Pharmacol*, 10(8): 747-52.
- Kosik K.S., Joachim C.L. and Selkoe D.J. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 4044-48.
- Koss W.A., Gehlert D.R. and Shekhar A. (2004). Different effects of subchronic doses of 17-beta estradiol in two ethologically based models of anxiety utilizing female rats. *Horm Behav*, 46: 158-64.
- Kotilinek L.A., Bacskai B., Westerman M., Kawarabayashi T., Younkin L., Hyman B.T., Younkin S. and Ashe K.H. (2002). Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 22: 6331–6335.

- Kramer A.F., Colcombe S.J., McAuley E., Eriksen K.I., Scalf P., et al. (2003). Enhancing brain and cognitive function of older adults through fitness training. *J Mol Neurosci*, 20: 213-21.
- Kramer A.F., Hahn S., Cohen N.J., Banich M.T., McAuley E., et al. (1999). Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature*, 400:418-419.
- Krüger K. and Mooren F.C. (2007). T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 13: 37-54.
- Kumar V., Halagappa M., Guo Z., Pearson M., Matsuoka Y., et al. (2007). Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 26: 212-20.
- Kurtuncu M., Arslan A.D., Akhisaroglu M., Manev H. and Uz T. (2004). Involvement of the pineal gland in diurnal cocaine reward in mice. *Eur J Pharmacol*, 489: 203–205. M.L.
- Kuwahara T., Koyama A., Gengyo-Ando K., Masuda M., Kowa H., et al. (2006). Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, 281: 334-40.
- LaFerla F.M. and Oddo S. 2005. Alzheimer's disease: Ab, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med*, 11(4): 170-6. Review.
- LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 8(7):499-509. Review.
- Lagunas N., Calmarza-Font I., Diz-Chaves Y., Garcia-Segura L.M. (2010). Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice 2 submitted to chronic unpredictable stress. *Horm Behav*, Aug 5. [Epub ahead of print]
- Lahiri D.K. and Maloney B. (2010). The “LEARn” (Latent Early-life Associated Regulation) model integrates environmental risk factors and the developmental basis of Alzheimer's disease, and proposes remedial steps. *Exp Gerontol*, 45: 291–296.
- Lakin M.L., Miller C.H., Stott M.L. and Winters W.D. (1981). Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life Sci*, 29: 2543-51.
- Lakso M., Vartiainen S., Moilanen A.M., Sirvio J., Thomas J.H., et al. (2003). Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem*, 86: 165-72.
- Lalonde R., Qian S. and Strazielle C. (2003). Transgenic mice expressing the PS1-A246E mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety and motor coordination. *Behav Brain Research*, 138: 71–79.
- Landsberg G. (2005). Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29: 471-9.
- Lao J.I., Beyer K., Fernandez-Novoa L. and Cacabelos R. (1998). A novel mutation in the predicted TM2 domain of the presenilin 2 gene Spanish patient with late-onset Alzheimer's disease. *Neurogenetics*, 1: 293-6.

- Larson E. (2008). Physical activity for older adults at risk for Alzheimer disease. *JAMA*, 300: 1077-79.
- Larson J., Jessen R.E., Uz T., Arslan A.D, Kurtuncu M., Imbesi M. And Manev H. (2006a). Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice. *Neurosci Lett*, 393: 23–26.
- Larson E.B., Wang L., Bowen J.D., McCormick W.C., Teri L., Crane P. and Kukull W. (2006b). Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med*, 144: 73-81.
- Laurin D., Verreault R., Lindsay J., MacPherson K. and Rockwood K. (2001). Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol*, 58: 498-504.
- Lavie P. (2001). Sleep-wake as a biological rhythm. *Annu Rev Psychol*, 52: 277-303.
- Lawlor P.A., Bland R.J., Das P., Price R. W., Holloway V., et al. (2007). Novel rat Alzheimer's disease models based on AAV-mediated gene transfer to selectively increase hippocampal A $\beta$  levels. *Mol Neurodegen*, 2:11.
- Lee V.M., Balin B.J., Otvos L.Jr. and Trojanowski J.Q. (1991). A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*, 251: 675–8.
- Lemere C.A., Beierschmitt A., Iglesias M., Spooner E.T., Bloom J.K., et al. (2004). Alzheimer's disease abeta vaccine reduces central nervous system abeta levels in a non-human primate, the Caribbean vervet. *Am J Pathol*, 165: 283-97.
- Leon J., Acuña-Castroviejo D., Sainz R.M., Mayo J.C., Tan D.X. and Reiter R.J. (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci*, 75: 765-90.
- Levis-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., et al. (1995). Candidate gene for chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, 269: 973-7.
- Levis-Lahad E., Poorkaj P., Wang K., Fu Y.H., Oshima J., et al. (1996). Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer's disease gene. *Genomics*, 34: 198-204.
- Lewis D.A., Campbell M.J., Terry R.D. and Morrison J.H. (1987). Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J Neurosci*, 7: 1799-808
- Lewis J., McGowan E., Rockwood J., Melrose H., Nacharaju P., et al. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*, 25(4): 402-5.
- Lewis J., Dickson D.W., Lin W.L., Chisholm L., Corral A., et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*, 293: 1487-91.
- Li F., Calingasan N.Y., Yu F., Mauck W.M., Toidze M., Almeida C.G., et al. (2004a). Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. *J Neurochem*, 89: 1308-12.

- Li J. and McMurray R.W. (2006). Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on immune functions in ovariectomized mice. *Int Immunopharmacol*, 6: 1413-23.
- Li S.P., Deng Y.Q., Wang X.C., Wang Y.P. and Wang J.Z. (2004b). Melatonin protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from calyculin A-induced neurofilament impairment and neurotoxicity. *J Pineal Res*, 36: 186-91.
- Li X.C., Wang Z.F., Zhang J.X., Wang Q. and Wang J.Z. (2005). Effect of melatonin on calyculin A-induced tau hyperphosphorylation. *Eur J Pharmacol*, 510: 25–30.
- Liang Y.Q., Akishita M., Kim S., Ako J., Hashimoto M., et al. (2002). Estrogen receptor beta is involved in the anorectic action of estrogen. *Int J Obes*, 26: 1103-09.
- Lindvall O., Kokaia Z., Bengzon J., Elmér E., Kokaia M. (1994). Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci*, 17: 490-96.
- Link C.D. (1995). Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 9368-72.
- Link C.D., Johnson C.J., Fonte V., Paupard M., Hall D.H., et al. (2001). Visualization of fibrillar amyloid deposits in living, transgenic *Caenorhabditis elegans* animals using the sensitive amyloid dye, X-34. *Neurobiol Aging*, 22(2): 217-26.
- Link C.D., Taft A., Kapulkin V., Duke K., Kim S., et al. (2003). Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiol Aging*, 24: 397-13.
- Liu R., Liu I.Y., Bi X., Thompson R.F., Doctrow S.R., Malfroy B. and Baudry M. (2003). Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100: 8526-31.
- Liu H., Wang H., Shenvi S., Hagen T.M. and Liu R.M. (2004). Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1019: 346–349.
- Liu S.J. and Wang J.Z. (2002). Alzheimer-like tau phosphorylation induced by wortmannin in vivo and its attenuation by melatonin. *Acta Pharmacol Sin*, 23: 183–7.
- Liu R.Y., Zhou J.N., van Heerikhuizen J., Hofman M.A. and Swaab D.F. (1999). Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease and apolipoprotein E-e4/4 genotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 323-27.
- Llorens-Martín M., Torres-Alemán I. and Trejo J.L. (2008). Growth Factors as Mediators of Exercise Actions on the Brain. *Neuromol Med*, 10: 99–107
- Lloret A., Badía M.C., Mora N.J., Pallardó F.V., Alonso M.D. and Viña J. (2009). Vitamin E paradox in Alzheimer's disease: it does not prevent loss of cognition and may even be detrimental. *J Alzheimers Dis*, 17(1): 143-9.
- López-Pousa S. (1999). Epidemiología de las demencias. En R Alberca y S López-Pousa. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. (pp. 137-148) Madrid: Ed. Médica Panamericana.

- Lovell M.A., Ehmann W.D., Butler S.M. and Markesbery W.R. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*, 45: 1594-1601.
- Luchsinger J.A., Tang M.X, Shea S. And Mayeux R. (2003). Antioxidant vitamin intake and risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 60: 203-08.
- Maas J. (1990). Selenium deficiency in cattle. En: Proceeding XVI World Buiatrics Congress, Salvador, Brasil, pp. 3-13.
- Macchi M.M. and Bruce J.N. (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*, 25: 177–195.
- Macias M., Dwornik A., Ziemińska E., Fehr S., Schachner M., Czarkowska-Bauch J. and Skup M. (2007). Locomotor exercise alters expression of pro-brain-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB in the spinal cord of adult rats. *Eur J Neurosci*, 25: 2425-44.
- Macías M., Nowicka D., Czupryn A., Sulejczak D., Skup M., Skangiel-Kramska J. and Czarkowska-Bauch J. (2009). Exercise-induced motor improvement after complete spinal cord transection and its relation to expression of brain-derived neurotrophic factor and presynaptic markers. *BMC Neurosci*, 4,10:144.
- Madigou T., TiVoche C., Lazanec G., Pelletier J. and Thieulant M.L. (1996). The sheep estrogen receptor: cloning and regulation of expression in the hypothalamo–pituitary axis. *Mol Cell Endocrinol*, 121: 153-63.
- Mahley R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240: 622-30.
- Manczak M., Park B.S., Jung Y. and Reddy P.H. (2004). Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Neuromolecular Med*, 5(2): 147-62.
- Manczak M., Anekonda T.S., Henson E., Park B.S., Quinn J. and Reddy P.H. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet*, 15(9): 1437-49.
- Manda K., Anzai K., Kumari S. and Bhatia A.L. (2007). Melatonin attenuates radiation-induced learning deficit and brain oxidative stress in mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 67(1): 63-70.
- Manly J. J., Merchant C. A., Jacobs D. M., Small S. A., Bell K., Ferin M. and Mayeux R. (2000). Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women. *Neurology*, 54: 833–37.
- Mantovani M., Pertile R., Calixto J.B., Santos A.R. and Rodrigues A.L. (2003). Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-d-aspartate receptors and the l-arginine–nitric oxide pathway. *Neurosci Lett*, 343: 1–4.

- Marcondes F.K., Miguel K.J., Melo L.L. and Spadari-Bratfisch R.C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*, 74:435–40.
- Markesbery W.R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 23: 134–147.
- Markowska A.L., Olton D.S., Givens B.A. (1995). Cholinergic manipulations in the medial septal area: age-related effects on working memory and hippocampal electrophysiology. *J Neurosci*, 15: 2063-73.
- Martínez Lage J.M., Oliveros Cid A. and Martínez-Lage P. (2000). Estrógenos y enfermedad de Alzheimer: bases, promesas y realidades. *Med Clin (Barc)*, 114: 747-55.
- Masaki K.H., Losonczy K.G., Izmirlian G., Foley D.J., Ross G.W., et al. (2000). Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology*, 54: 1265-72.
- Masliah E., Mallory M., Alford M., DeTeresa R., Hansen L.A., et al. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, 56: 127-29.
- Mason J.B., Cargill S.L., Anderson G.B., Carey J.R. (2010). Ovarian status influenced the rate of body-weight change but not the total amount of body-weight gained or lost in female CBA/J mice. *Exp Gerontol*, 45: 435-41.
- Mastrangelo, M.A., Bowers, W.J. (2008). Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neurosci*. 9, 81.
- Matsubara E., Bryant-Thomas T., Pacheco Quinto J., et al. (2003). Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 85: 1101-08.
- Mattson M.P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430: 631-39.
- Mattson M. P. and Magnus T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci*, 7: 278–294.
- Mattson M. P., Maudsley S. and Martin B. (2004). A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing Res Rev*, 3: 445–464.
- Maxwell C.J., Hicks M.S., Hogan D.B., Basran J. and Ebly E.M. (2005). Supplemental use of antioxidant vitamins and subsequent risk of cognitive decline and dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 20: 45–51.
- Mayeux R., Saunders A.M., Shea S., Mirra S., Evans D., et al. (1998). Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 338: 506–11. Erratum in: *N Engl J Med*, 338(18): 1325.

- Mazzardo-Martins L., Martins D.F., Marcon R., Dos Santos U.D., Speckhann B., et al. (2010). High-Intensity Extended Swimming Exercise Reduces Pain-Related Behavior in Mice: Involvement of Endogenous Opioids and the Serotonergic System. *J Pain*, May 19. [Epub ahead of print]
- McCord J.M. (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 185(150): 529-31.
- McCurry S.M., Reynolds C.F., Ancoli-Israel S., Teri L. and Vitiello M.V. (2000). Treatment of sleep disturbance in Alzheimer's disease. *Sleep Med Rev*, 4: 603-28.
- McEwen B.S. (2001). Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol*, 91: 2785–2801.
- Meli R., Pacilio M., Raso G.M., Esposito E., Coppola A., et al. (2004). Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology*, 145, 3115-21.
- Merle A., Delagrang P., Renard P., Lesieur D., Cuber J.C., et al. (2000). Effect of melatonin on motility pattern of small intestine in rats and its inhibition by melatonin receptor antagonist S 22153. *J Pineal Res*, 29: 116–24.
- Mershin A., Pavlopoulos E., Fitch O., Braden B.C., Nanopoulos D.V. and Skoulakis E.M. (2004). Learning and memory deficits upon TAU accumulation in Drosophila mushroom body neurons. *Learn Mem*, 11: 277-87.
- Meyer M.R., Tschanz J.T., Norton M.C., Welsh-Bohmer K.A., Steffens D.C., Wyse B.W. and Breitner J.C. (1998). APOE genotype predicts when—not whether—one is predisposed to develop Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 19:321-2.
- Middleton L., Mitnitski A., Fallah N., Kirkland S. and Rockwood K. (2008). Changes in cognition and mortality in relation to exercise in late life: a population based study. *PLoS ONE*, 3: e3124.
- Milgram N.W., Zicker S.C., Head E., Muggenburg B.A., Murphey H., et al. (2002). Dietary enrichment counteracts age-associated cognitive dysfunction in canines. *Neurobiol Aging*, 23: 737-45.
- Minami T., Oomura Y., Nabekura J. and Fukuda A. (1990). 17 Beta-estradiol depolarization of hypothalamic neurons is mediated by cyclic AMP. *Brain Res*, 519: 301-07.
- Mishima K., Okawa M., Hishikawa Y., Hozumi S., Hori H. and Takahashi K. (1994). Morning bright light therapy for sleep and behavior disorders in elderly patients with dementia. *Acta Psychiatr Scand*, 89: 1–7.
- Mishsima K., Tozawa T., Satoh K., Matsumoto Y., Hishikawa Y., Okawa M. (1999). Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biol Psych*, 45: 417-21.
- Molsa P.K., Marttila R.J. and Rinne U.K. (1982). Epidemiology of dementia in a Finnish population. *Acta Neurol Scand*, 65: 541-52.

- Moreira P.I., Honda K., Liu Q., Santos M.S., Oliveira C.R., et al. (2005). Oxidative stress: the old enemy in Alzheimer's disease pathophysiology. *Curr Alz Res*, 2: 403-08.
- Morgan D., Diamond D.M., Gottschall P.E., Ugen K.E., Dickey C., et al. (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, 408: 982–985.
- Morris M.C., Evans D.A., Bienias J.L., Tangney C.C., Bennett D.A., et al. (2002). Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA*, 287: 3230-37.
- Mudher A., Shepherd D., Newman T.A., Mildren P., Jukes J.P., et al. (2004). GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol Psychiatry*, 9: 522-30.
- Muir J.L. (1997). Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*, 56: 687-96.
- Muller M.B., Zimmermann S., Sillaber I., Hagemeyer T.P., Deussing J.M., Timpl P., et al. (2003). Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat Neurosci*, 6: 1100–7.
- Mungarro-Menchaca X., Ferrera P., Morán J. and Arias C. (2002). beta-Amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J Neurosci Res*, 68(1): 89-96.
- Murrell J., Farlow M., Ghetti B. and Benson M.D. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*, 254: 97-9.
- Mystkowski P., Seeley R.J., Hahn T.M., Baskin D.G., Havel P.J., Matsumoto A.M., et al. (2000). Hypothalamic melanin-concentrating hormone and estrogen-induced weight loss. *J Neurosci*, 20: 8637–8642.
- Nabkasorn C., Miyai N., Sootmongkol A., Junprasert S., Yamamoto H., Arita M. and Miyashita K. (2006). Effects of physical exercise on depression, neuroendocrine stress hormones and physiological fitness in adolescent females with depressive symptoms. *Eur J Public Health*, 16(2): 179-84.
- Naruse S., Thinakaran G., Luo J.J., Kusiak J.W., Tomita T., et al. (1998). Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron*, 21: 1213-21.
- Navarro A., Gomez C., Lopez-Cepero J. M. and Boveris A. (2004). Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286: 505-11.
- Neeper S.A., Gómez-Pinilla F., Choi J. and Cotman C. (1995). Exercise and brain neurotrophins. *Nature*, 373(6510): 109.
- Nelson R.L., Guo Z., Halagappa V.M., Pearson M., Gray A.J., Matsuoka Y., et al. (2007). Prophylactic treatment with paroxetine ameliorates behavioral deficits and retards the development of amyloid and tau pathologies in 3xTgAD mice. *Expl Neurol*, 205: 166–176.



- Nichol K., Deeny S.P., Seif J., Camaclang K., Cotman C.W. (2009). Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice. *Alzheimers Dement*, Jul, 5(4): 287-94.
- Nichol K.E., Parachikova A.I. and Cotman C.W. (2007). Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. *Behav Brain Res*, 184(2): 124-32.
- Nichol K.E., Poon W.W., Parachikova A.I., Cribbs D.H., Glabe C.G. and Cotman C.W. (2008). Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. *J Neuroinflammation*, 5: 13.
- Nishimura I., Yang Y. and Lu B. (2004). PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in Drosophila. *Cell*, 116: 671-82.
- Nyda M.J., Demajo S.F. and Lewis R.A. (1948). The effect of ovariectomy and physiologic doses of estradiol upon body weight, linear growth and fat content of female albino rat. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 83: 279-87.
- Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., et al. (2006). Intraneuronal  $\beta$ -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci*, 26(40): 10129-40.
- O'Callaghan R.M., Ohle R. and Kelly A.M. (2007). The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: a comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res*, 176: 362-66
- Oddo S., Caccamo A., Shepherd J.D., Murphy M.P., Golde T.E., Kaye R., Metherate R., Mattson M.P., Akbari Y., LaFerla F.M., (2003a). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Ab and synaptic dysfunction. *Neurone*, 39: 409-421.
- Oddo S., Caccamo A., Kitazawa M., Tseng B.P. and LaFerla F.M. (2003b). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 24: 1063-70.
- Oddo S., Billings L., Kesslak J.P., Cribbs D.H. and LaFerla F.M. (2004). Immunotherapy Leads to Clearance of Early, but Not Late, Hyperphosphorylated Tau Aggregates via the Proteasome. *Neuron*, 43: 321-32.
- Oddo S., Caccamo A., Green K.N., Liang K., Tran L., et al. (2005). Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *PNAS*, 102(8): 3046-51.
- Oeda T., Shimohama S., Kitagawa N., Kohno R., Imura T., et al. (2001). Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet*, 10: 2013-23.
- Ogonovszky H., Berkes I., Kumagai S., Kaneko T., Tahara S., Goto S. and Radak Z. (2005). The effects of moderate-, strenuous and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem Int*, 46: 635-40.

- Ohno M., Cole S.L., Yasvoina M., Zhao J., Citron M., et al. (2007). BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 26(1): 134-45.
- Olanow C.W. (1993). A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 16: 439-44.
- Olcese J.M., Cao C., Mori T., Mamcarz M.B., Maxwell A., et al. (2009). Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res*, 47(1): 82–96.
- Olivieri G., Hess C., Savaskan E., Ly C., Meier F., et al. (2001). Melatonin protects SHSY5Y neuroblastoma cells from cobalt-induced oxidative stress, neurotoxicity and increased b-amyloid secretion. *J Pineal Res*, 31: 320-25.
- Opii W.O., Joshi G., Head E., Milgram N.W., Muggenburg B.A., Klein J.B., et al. (2008). Proteomic identification of brain proteins in the canine model of human aging following a long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment: relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 29: 51–70.
- Ott A., Breteler M.M., Van Harskamp F., Claus J.J., Van der Cammen T.J., Grobbee D.E. and Hofman A. (1995). Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ*, 310(6985): 70-73.
- Ozkaya Y.G., Agar A., Yargicoglu P., Hacıoglu G., Bilmen-Sarikcioglu S., Ozen I. and Aliciguzel Y. (2002). The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab*, 28: 377–384.
- Panza F., Panza V., Solfrizzi A.M., Colacicco A., D'Introno C., et al. (2004). Mediterranean diet and cognitive decline. *Public Health Nutr*, 7: 959-63.
- Paoletti A.M., Floris S., Mannias M., Orru M., Crippa D., Orlandi R., et al. (2001). Evidence that cyproterone acetate improves psychological symptoms and enhances the activity of the dopaminergic system in postmenopause. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 608–12.
- Papaioannou N., Tooten P.C., van Ederen A.M., Bohl J.R., Rofina J., et al. (2001). Immunohistochemical investigation of the brain of aged dogs. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxynonenal protein, an oxidative damage product, in senile plaques. *Amyloid*, 8: 11-21.
- Pappolla M., Bozner P., Soto C., Shao H., Robakis N.K., et al. (1998). Inhibition of Alzheimer beta-fibrillogenesis by melatonin. *J Biol Chem*, 273: 7185-88.
- Parachikova A., Nichol K.E. and Cotman C.W. (2008). Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *Neurobiol Dis*, 30 (1): 121-9.
- Park K., Lee Y., Park S., Lee S., Hong Y., Kil Lee S. and Hong Y. (2010). Synergistic effect of melatonin on exercise-induced neuronal reconstruction and functional recovery in a spinal cord injury animal model. *J Pineal Res*, 48(3): 270-81.

- Park J.H., Widi G.A., Gimbel D.A., Harel N.Y., Lee D.H. and Strittmatter S.M. (2006). Subcutaneous Nogo receptor removes brain amyloid-beta and improves spatial memory in Alzheimer's transgenic mice. *J Neurosci*, 26(51): 13279-86.
- Pedersen W.A., Wan R. and Mattson M.P. (2001). Impact of aging on stressresponsive neuroendocrine systems. *Mech Ageing Dev*, 122: 963-83.
- Perez-Martin M., Salazar V., Castillo C., Ariznavarreta C., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M. and Tresguerres J.A.F. (2005). Estradiol and soy extract increase the production of newcells in the dentate gyrus of old rats. *Exp Gerontol*, 40: 450-53.
- Perkins A.J., Hendrie H.C, Callahan C.M., Gao S., Unverzagt F.W., et al. (1999). Association of antioxidants with memory in a multiethnic elderly sample using the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol*, 150: 37-44.
- Pertsov S.S. (2006). Effect of melatonin on the thymus, adrenal glands, and spleen in rats during acute stress. *Bull Exp Biol Med*, 141(3): 292-5.
- Peskind E.R., Raskind M.A., Wingerson D., Pascualy M., Thal L.J., Dobie D.J. and Wilkinson C.W. (1996). Hypothalamicpituitary-adrenocortical axis responses to physostigmine: effects of Alzheimer's disease and gender. *Biol Psychiatry*, 40: 61-68.
- Phillips S.K., Rook K.M., Siddle N.C., Bruce S.A. and Woledge R.C. (1993). Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clin Sci (Lond)*, 84: 95-98.
- Picazo O., Estrada-Camarena E. and Hernandez-Aragon A. (2006). Influence of the postovariectomy time frame on the experimental anxiety and the behavioural actions of some anxiolytic agents. *Eur J Pharmacol*, 530: 88-94.
- Pietropaolo S., Sun Y., Li R., Brana C., Feldon J., Yee B.K., (2008b). The impact of voluntary exercise on mental health in rodents: A neuroplasticity perspective. *Behav Brain Res*, 192(1): 42-60.
- Pisani G., Facioni L., Fiorani F. and Pisani G. (1998). Psychosexual problems in menopause. *Min Ginecol*, 50: 77-81.
- Plattner F., Angelo M. and Giese K.P. (2006). The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem*, 281: 25457-65.
- Ponte P., Gonzalez-Dewhitt P., Shilling J., Miller J., Hsu D., et al. (1988). A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature*, 331: 525-7.
- Pope S.K., Shue V.M. and Beck C. (2003). Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? *Annu Rev Public Health*, 24: 111-32.
- Praticò D. (2008). Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci*, 1147: 70-8. Review.
- Pratico D., Uryu K., Leight S., Trojanowski Lee V.M.-Y. (2001). Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci*, 21: 4183-87.

- Prelli F., Castano E., Glenner G.G. and Frangione B. (1988). Differences between vascular and plaque core amyloid in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 51: 648-51.
- Price D.L., Wong P.C., Markowska A.L., Lee M.K., Thinakaran G., et al. (2000). The value of transgenic models for the study of neurodegenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 920: 179-91.
- Podura A., Gearing M., Rebeck G.W., Mirra S.S., Tigges J. and Hyman B.T. (1994). Apolipoprotein E4 and Beta Amyloid in Senile Plaques and Cerebral Blood Vessels of Aged Rhesus Monkeys. *Am J Pathol*, 144(6): 1183-7.
- Poirier J. (2000). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 924: 81-90.
- Presman D.M., Hoijman E., Ceballos N.R., Galigniana M.D. and Pecci A. (2006). Melatonin Inhibits Glucocorticoid Receptor Nuclear Translocation in Mouse Thymocytes. *Endocrinology*, 147(11): 5452-59.
- Pugliese M., Carrasco J.L., Gomez-Anson B., Andrade C., Zamora A., et al. (2009). Magnetic resonance imaging of cerebral involucional changes in dogs as markers of aging: An innovative tool adapted from a human visual rating scale. *Vet J*, Sep 11. [Epub ahead of print].
- Pugliese M., Mascort J., Mahy N. and Ferrer I. (2006). Diffuse beta-amyloid plaques and hyperphosphorylated tau are unrelated processes in aged dogs with behavioral deficits. *Acta Neuropathol (Berl)*, 112: 175-83.
- Rachman I.M., Unnerstall J.R., Pfaff D.W. and Cohen R.S. (1998). Estrogen alters behavior and forebrain c-fos expression in ovariectomized rats subjected to the forced swim test. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 13941-46.
- Radak Z., Chung H. and Goto S. (2008a). Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*, 44: 153-159.
- Radak Z., Chung H.Y., Koltai E., Taylor A.W. and Goto S. (2008b). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*, 7(1): 34-42.
- Radak Z., Kaneko T., Tahara S., Nakamoto H., Pucsok J., Sasvari M., Nyakas C. and Goto S. (2001a). Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int*, 38: 17-23.
- Radak Z., Taylor A., Ohno H. and Goto S. (2001b). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*, 7: 90-107.
- Radak Z., Toldy A., Szabo Z., Siamilis S., Nyakas C., et al. (2006). The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int*, 49: 387-92.
- Radak Z., Hart N., Sarga L., Koltai E., Atalay M., Ohno H. and Boldogh I. (2010). Exercise Plays a Preventive Role Against Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*, 20 (3): 777-83.

- Rall S.C. and Mahley R.W. (1992). The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *J Intern Med*, 231: 653-9.
- Ramassamy C., Averill D., Beffert U., Bastianetto S., Theroux L., et al. (1999). Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic Biol Med*, 27(5-6): 544-53.
- Reddy P.H. (2006). Mitochondrial oxidative damage in aging and Alzheimer's disease: implications for mitochondrially targeted antioxidant therapeutics. *J Biomed Biotechnol*, (3): 31372.
- Reddy D.S. (2003). Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol*, 15: 197-234.
- Reddy P.H. and Beal M.F. (2005). Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Rev*, 49: 618-32.
- Reddy P.H. and Beal M.F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*, 14(2): 45-53.
- Reddy P.H. and McWeeney S. (2006). Mapping cellular transcriptomes in autopsied Alzheimer's disease subjects and relevant animal models. *Neurobiol Aging*, 27(8): 1060-77.
- Reddy P.H., McWeeney S., Park B.S., Manczak M., Gutala R.V., et al. (2004). Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 13(12): 1225-40.
- Reiter R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions. *Endocr Rev*, 12: 151-80.
- Reiter R.J. (1992). The aging pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays*, 14: 169-75.
- Reiter R.J., Carneiro R.C. & Oh C.S.. (1997a). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*, 29: 363-72.
- Reiter R.J., Tang L., García J.J. & Muñoz-Hoyos A. (1997b). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci*, 60: 2255-71.
- Reiter R.J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*, 9: 526-33.
- Reiter R.J. (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol*, 56: 359-84.
- Reiter R.J., Acuna-Castroviejo D., Tan D.X. and Burkhardt S. (2001). Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*, 939: 200-15.

- Reppert SM. (1997). Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms*, 12: 528–31.
- Reppert S.M., Godson C., Mahle C.D., Weaver D.R., Slaugenhaupt S.A. and Gusella J.F. 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 8734-38.
- Resende R., Moreira P.I., Proença T., Deshpande P., Busciglio J., Pereira C. and Resende Oliveira C. (2008). Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 44: 2051-57.
- Ressmeyer A.R., Mayo J.C., Zelosko V., Sáinz R.M., Tan D.X., et al. (2003). Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep*, 8: 205-13.
- Richter H., Ambrée O., Lewejohann L., Herring A., Keyvani K., Paulus W., et al. (2008). Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Protection or symptom? *Behav Brain Res*, 190(1):74-84.
- Rissman R.A., Poon W.W., Blurton-Jones M., Oddo S., Torp R., et al. (2004). Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Inv*, 114(1): 121-30.
- Rocca W.A., Bonaiuto S., Lippi A., Luciani P., Turtu F., Cavarzeran F. and Amaducci L. (1990). Prevalence of clinically diagnosed Alzheimer's disease and other dementing disorders: a door-to-door survey in Appignano, Macerata Province, Italy. *Neurology*, 40: 626-31.
- Rodríguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., et al. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 36: 1–9.
- Rogaev E.I., Sherrington R., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., et al. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376: 775-8.
- Rogaev E.I., Sherrington R., Wu C., Levesque G., Liang Y., et al. (1997). Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease. *Genomics*, 40: 415-24.
- Rogers CJ, Berrigan D, Zaharoff DA, Hance KW, Patel AC, et al. (2008). Energy Restriction and Exercise Differentially Enhance Components of Systemic and Mucosal Immunity in Mice. *J Nut*, 138(1): 115-22.
- Rubin E.H., Morris J.C., Grant E.A. and Venderna T. (1989). Very mild senile dementia of the Alzheimer type I. Clinical Assessment. *Aech Neurol*, 46: 379-82.
- Rusu P., Jansen A., Soba P., Kirsch J., Löwer A., et al. (2007). Axonal accumulation of synaptic markers in APP transgenic Drosophila depends on the NPTY motif and is paralleled by defects in synaptic plasticity. *Eur J of Neurosci*, 25: 1079-86.
- Sakurai T., Endo S, Hatano D., Ogasawara J., Kizaki T., Oh-Ishi S., Izawa T., Ishida H., Ohno H. (2010). Effects of exercise training on adipogenesis of stromal-vascular

- fraction cells in rat epididymal white adipose tissue. *Acta Physiol (Oxf)*, Jun 28. [Epub ahead of print]
- Sampson V.L., Morrison J.H. and Vickers J.C. (1997). The cellular basis for the relative resistance of parvalbumin and calretinin immunoreactive neocortical neurons to the pathology of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 145: 295-302.
  - Santana-Sosa E., Barriopedro M.I., López-Mojares L.M., Pérez M. and Lucia A. (2008). Exercise Training is Beneficial for Alzheimer's Patients. *Int J Sports Med*, 29(10): 845-50.
  - Sasse S.K., Greenwood B.N., Masini C.V., Nyhuis T.J., Fleshner M., Day H.E. and Campeau S. (2008). Chronic voluntary wheel running facilitates corticosterone response habituation to repeated audiogenic stress exposure in male rats. *Stress*, 11(6): 425-37.
  - Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., George-Hyslop P.H., Pericak-Vance M.A., et al. (1993). Association of apolipoprotein E allele  $\epsilon$ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43: 1467-72.
  - Savaskan E., Ayoub M.A., Ravid R., Angeloni D., Fraschini F., et al. (2005). Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. *J Pineal Res*, 38: 10-16.
  - Savonenko A.V. and Markowska A.L. (2003). The cognitive effects of ovariectomy and estrogen replacement are modulated by aging. *Neuroscience*, 119: 821-30
  - Sayre L.M., Zelasko D.A., Harris P.L.R., Perry G., Salomon R.G. and Smith M.A. (1997). 4-HNE-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 68: 2092-97.
  - Scarmeas N., Luchsinger J.A., Schupf N., Brickman A.M., Cosentino S., Tang M.X. and Stern Y. (2009). Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA*, 302: 627-37.
  - Scheff S.W., Scott S.A., DeKosky S.T. (1991). Quantification of synaptic density in the septal nuclei of young and aged Fischer 344 rats. *Neurobiology Aging*, 12: 3-12.
  - Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., et al. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med*, 2(8): 864-70.
  - Schmidt P.J. (2005). Mood, depression, and reproductive hormones in the menopausal transition. *Am J Med*, 118: 54-8.
  - Schmitz C., Rhodes M.E., Bludau M., Kaplan S., Ong P., et al. (2002). Depression: reduced number of granule cells in the hippocampus of female, but not male, rats due to prenatal restraint stress. *Mol Psychiatry*, 7: 810-13.
  - Schonberger S.J., Edgar P.F., Kydd R., Faull R.L. and Cooper G. J. (2001). Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: molecular phenotype of a complex disease process. *Proteomics*, 1(12): 1519-28.

- Schuessel K., Schafer S., Bayer T.A., Czech C., Pradier L., Muller-Spahn F., et al. (2005). Impaired Cu/Zn-SOD activity contributes to increased oxidative damage in APP transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 18: 89–99.
- Schweitzer N.B., Alessio H.M, Berry S.D., Roeske K. and Hagerman A.E. (2006). Exercise-induced changes in cardiac gene expression and its relation to spatial maze performance. *Neurochem Int*, 48: 9–16.
- Seale P. (2010). Transcriptional control of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond)*, 34(S1): S17-S22.
- Selkoe D.J. (1997). Alzheimer's disease: Genotypes, Phenotype, and treatments. *Science*, 275: 630-31.
- Selkoe D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiology Review*, 81: 741–766.
- Selkoe D.J., Bell D.S., Podlisny M.B., Price D.L. and Cork L.C. (1987). Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science*, 235:873–877.
- Selkoe D.J. and Schenk D. (2003). Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43: 545-84.
- Sene-Fioresel M., Duarte F.O., Scarmagnani F.R.R., Cheik N.C., Manzoni M.S.J., Nonaka K.O., et al. (2008). Efficiency of Intermittent Exercise on Adiposity and Fatty Liver in Rats Fed With High-fat Diet. *Obesity*, 16(10).
- Shen Y., Li R., Mc Geer E.G. and Mc Geer P.L. (1997). Neuronal expression of mRNA for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain. *Brain Res*, 769: 391-5.
- Sherif F., Orelund L. (1995). Effect of the GABA-transaminase inhibitor vigabatrin on exploratory behaviour in socially isolated rats. *Behav Brain Res*, 72: 135-40.
- Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., et al., (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375: 754-60.
- Shimizu H., Ohtani K., Kato Y., Tanaka Y. and Mori M. (1996). Withdrawal of [corrected] estrogen increases hypothalamic neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in ovariectomized obese rat. *Neurosci Lett*, 204: 81–84.
- Shing C., Peake J., Ahern S., Strobel N., Wilson G., Jenkins D. and Coombes J. (2007). The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32: 677-85.
- Sies H. and Stahl W. (1995). Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*, 62: 1315S-21S.
- Sies H., Sharov V.S., Klotz L.O. & Briviba K. (1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. *J Biol Chem*, 272: 27812-817.



- Siest G., Pillot T., Regis-Bailly A., Leininger-Muller B., Steinmetz J., Galteau M.M. and Visvikis S. (1995). Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem*, 41: 1068-86.
- Silva A.J., Kogan J.H., Frankland P.W. and Kida S. (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci*, 21: 127-48.
- Simard A.R., Soulet D., Gowing G., Julien J.P. and Rivest S.A. (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*, 49(4): 489-502.
- Simpkins J.W., Green P.S., Gridley K.E., Singh M., de Fiebre N.C. and Rajakumar G. (1997). Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *Am J Med*, 103: 19S-25S.
- Siwak C.T., Gruet P., Woehrle F., Muggenburg B.A., Murphey H.L. and Milgram N.W. (2000). Comparison of the effects of adrafinil, propentofylline, and nicergoline on behavior in aged dogs. *Am J Vet Res*, 61: 1410-4.
- Siwak C.T., Tapp P.D., Head E., Zicker S.C., Murphey H.L., et al. (2005). Chronic antioxidant and mitochondrial cofactor administration improves discrimination learning in aged but not young dogs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29: 461- 9.
- Siwak-Tapp C.T., Head E., Muggenburg B.A., Milgram N.W. and Cotman C.W. (2008). Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment. *Neurobiol Aging*, 29: 39-50.
- Sjöblom M. and Flemström G. (2004). Central nervous alpha1-adrenoceptor stimulation induces duodenal luminal release of melatonin. *J Pineal Res*, 36(2): 103-8.
- Smith I.F., Green K.N. and LaFerla F.M. (2005a). Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: Recent advances gained from genetically modified animals. *Cell Calcium*, 38: 427-437.
- Smith I.F., Hitt B., Green K.N., Oddo S. and LaFerla F.M. (2005b). Enhanced caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> release in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 94: 1711-18.
- Smith M.A., Sayre L.M., Anderson V.E., Beal M.F., Kowall N., Richey P.L. and Perry G. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's disease. *Nature*, 382: 120-21.
- Sofi F., Macchi C., Abbate R., Gensini G.F. and Casini A. (2010). Effectiveness of the Mediterranean Diet: Can It Help Delay or Prevent Alzheimer's Disease? *J Alzheimer's Dis*, 20: 795-801.
- Somani S. and Husain K. (1996a). Exercise training alters kinetics of antioxidant enzymes in rat tissues. *Biochem Mol Biol Int*, 38: 587-595.
- Somani S. and Husain K. (1997). Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on antioxidant system of rat brain regions. *J Appl Toxicol*, 17: 329-36.
- Somani S., Ravi R. and Rybak L. (1995). Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 50: 635-639.

- Soto C. (1999). Desentrañando los misterios del mal de Alzheimer: una enfermedad relacionada a alteraciones en la conformación de proteínas. *Ciencia al Día*, 2(1).
- Spalletta G., Baldinetti F., Buccione I., Fadda L., Perri R., Scalmana S., Serra L., Caltagirone C. (2004). Cognition and behaviour are independent and heterogeneous dimensions in Alzheimer's disease. *J Neurology*, 251: 688–695.
- Sparks D.L. (1996). Intraneuronal  $\beta$ -amyloid immunoreactivity in the CNS. *Neurobiol Aging*, 17: 291-99.
- Sparks D.L., Scheff S.W., Hunsaker J.C., Liu H., Landers T. and Gross D.R. (1994). Induction of Alzheimer-like  $\beta$ -amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol*, 126: 88–94.
- Sparks D.L., Kou Y-M., Roher A., Martin T.A. and Lukas R.J. (2000). Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. *Ann NY Acad Sci*, 903: 335-44.
- Sparks D.L. (2004). Cholesterol, copper, and accumulation of thioflavine S-reactive Alzheimer's-like amyloid  $\beta$  in rabbit brain. *J Mol Neurosci*, 24: 97–104.
- Sparrow J.T. Sparrow D.A. Fernando G., Culcuwell A.R., Kovar M. and Gotto A.M. (1992). Apolipoprotein E: phospholipid binding studies with synthetic peptides from the carboxyl terminus. *Biochemistry*, 31: 1065-8.
- Speakman J.R. (2005). Body size, energy metabolism and lifespan. *J Exp Biol*, 208: 1717-30.
- Speakman J.R., van Acker A. and Harper E.J. (2003). Age-related changes in the metabolism and body composition of three dog breeds and their relationship to life expectancy. *Aging cell*, 2: 265-75.
- St George-Hyslop P.H. (2000). Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 924: 1-7.
- Stebelová K., Anttila K., Mänttari S., Saarela S. and Zemana M. (2010). Immunohistochemical definition of MT2 receptors and melatonin in the gastrointestinal tissues of rat. *Acta Histochem*, 112(1): 26-33.
- Sterniczuka R., Antle M.C., LaFerla F.M. and Dyck R.H. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Res*, 1348: 149-55.
- Stranahan M., Zhou Y., Martin B. and Maudsley S. (2009). Pharmacomimetics of exercise: novel approaches for hippocampally-targeted neuroprotective agents. *Curr Med Chem*, 16(35): 4668.
- Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D.E., Pericak-Vance M. A., Enghild J., Salvesen G.S. and Roses A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 1977-81.

- Subbarao K.V., Richardson J.S. and Ang L.C. (1990). Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem*, 55: 342-45.
- Sutter N.B., Bustamante C.D., Chase K., Gray M.M, Zhao K., et al. (2007). A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs. *Science*, 316: 112-5.
- Swaab D.F., Bao A.M. and Lucassen P.J. (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*, 4: 141-94.
- Szabo Z., Ying Z., Radak Z. and Gomez-Pinilla F. (2010). Voluntary exercise may engage proteasome function to benefit the brain after trauma. *Brain Res*, 1341: 25-31.
- Tajiri N., Yasuhara T., Shingo T., Kondo A., Yuan W., Kadota T., et al. (2010). Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain Res*, 1310: 200-7.
- Takei Y., Harada A., Takeda S., Kobayashi K., Terada S., Noda, T. & Taka Hirokawa N. (1995). Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system. *J Cell Biol*, 131: 1789–1800.
- Tan D.X., Poeggeler B., Reiter R.J., Chen L.D., Chen S., et al. (1993). The pineal hormone melatonin inhibits DNA adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett*, 70: 65–71.
- Tan D.X., Manchester L.C., Fuentes-Broto L., Paredes S.D. and Reiter R.J. (2010). Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev*, Jun 16. [Epub ahead of print]
- Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Qi W.B., Zhang M., et al. (1999). Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta*, 1472: 206–214.
- Tan D.X., Manchester L.C., Terron M.P., Flores L.J. and Reiter R.J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*, 42(1): 28-42. Review.
- Tanapat P., Hastings N.B., Reeves A.J. and Gould E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, 19: 5792–5801.
- Tanapat P., Hastings N.B. and Gould E. (2005). Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *J Comp Neurol*, 481: 252-65.
- Tang M. X., Jacobs D., Stern Y., Marder K., Schofield P., Gurland B., Andrews H. and Mayeux R. (1996). Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet*, 348: 429–432.
- Tang Y.P., Shimizu E., Dube G.R., Rampon C., Kerchner G.A., et al. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401: 63-69.

- Tanzi R.E., McClatchey A.I., Lamperti E.D., Villa-Komaroff L., Gusella J.F. and Neve R.L. (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*, 331: 528-30.
- Tayebati S.K. (2006). Animal models of cognitive dysfunction. *Mech Ageing Dev*, 127(2): 100-08.
- Tenenbaum L., Chtarto A., Lehtonen E., Velu T., Brotchi J. and Levivier M. (2004). Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J Gene Med*, 6(Suppl 1): 212-22.
- Teri L., Gibbons L.E., McCurry S.M., Logsdon R.G., Buchner D.M., et al. (2003). Exercise plus behavioral management in patients with Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, 290: 2015-22.
- Terry R.D., Masliah E., Salmon D.P., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen L.A. and Katzman R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30: 572-80.
- Terwel D., Lasrado R., Snauwaert J., Vandeweert E., Van Haesendonck C., et al. (2005). Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice. *J Biol Chem*, 280: 3963-73.
- Thomas P. and Fenech M. (2007). A review of genome mutation and Alzheimer's disease. *Mutagenesis*, 22(1): 15-33.
- Thuren T., Sisson P. and Waite M. (1991). Activation of hepatic lipase catalyzed phosphatidylcholine hydrolysis by apolipoprotein E. *Biochim Biophys Acta*, 1083: 217-20.
- Thuren T., Weisgraber K.H., Sisson P. and Waite M. (1992). Role of apolipoprotein E in hepatic lipase catalyzed hydrolysis of phospholipid in high-density lipoproteins. *Biochemistry* 31: 2332-8.
- Tilley L., Morgan K. and Kalsheker N. (1998). Genetic risk factors in Alzheimer's disease. *Mol Pathol*, 51(6): 293-304. Review.
- Tomás-Zapico C. and Coto-Montes A. (2005). A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res*, 39: 99-104.
- Touma C., Ambree O., Gortz N., Keyvani K., Lewejohann L., et al. (2004). Age- and sex-dependent development of adrenocortical hyperactivity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 25: 893-904.
- Townsend M., Cleary J.P., Mehta T., Hofmeister J., Lesne S., et al. (2006). Orally available compound prevents deficits in memory caused by the Alzheimer amyloid-beta oligomers. *Ann Neurol*, 60(6): 668-76.
- Tresguerres J.A.F., Kireev R., Tresguerres A.F., Borrás C., Vara, E. and Ariznavarreta C. (2008). Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. *J. Steroid. Biochem. Mol Biol*, 108: 318-26.
- Tricoire H., Locatelli A., Chemineau P. and Malpoux B. (2002). Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, 143: 84-90.

- Ubhi K.K., Shaibah H., Newman T.A., Shepherd D. and Mudher A. (2007). A comparison of the neuronal dysfunction caused by Drosophila tau and human tau in a Drosophila model of tauopathies. *Invert Neurosci*, 7: 165-71.
- Ursini F. and Bindoli A. (1987). The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids*, 44 (2-4): 255-76.
- Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. (2004). Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays*, 26(4): 445-53. Review.
- Van Duijn C.M., De Knijff P., Cruts M., Wehnert A., Havekes L.M., Hofman A. and Van Broeckhoven C. (1994). Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 7: 74-8.
- Van Groen T. and Kadish I. (2005). Transgenic AD model mice, effects of potential anti-AD treatments on inflammation and pathology. *Brain Res Rev*, 48 (2): 370–378.
- van Praag H., Kempermann G. and Gage F.H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2(3): 266-70.
- van Praag H., Kempermann G., & Gage F., (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Reviews Neurosc*, 1, 191–198.
- van Praag, H., Shubert T., Zhao C. and Gage F.H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*, 25: 8680-85.
- Vasuta C., Caunt C., James R., Samadi S., Schibuk E., et al. (2007). Effects of exercise on NMDA receptor subunit contributions to bidirectional synaptic plasticity in the mouse dentate gyrus. *Hippocampus*, 17(12):1201-8.
- Vaughanm K., Reiter R.J. (1971). Transient hypertrophy of the ventral prostate and coagulating glands and accelerated thymic involution following pinealectomy in the mouse. *Texas Rep Biol Med*, 29:579-586.
- Vaynman S., Ying Z. and Gomez-Pinilla F. (2004a). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*, 20: 2580-90.
- Vaynman S., Ying Z., Yin D. and Gomez-Pinilla F. (2006). Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res*, 1070: 124-130.
- Vaynman S., Ying Z. and and Gómez-Pinilla F. (2004b). Exercise Induces BDNF and Synapsin I to Specific Hippocampal Subfields. *J Neurosc Res*, 76: 356-62
- Vaynman S., Ying Z. and and Gómez-Pinilla F. (2003). Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neurosci*, 122: 647-57.
- Vaynman S., Ying Z. and Gomez-Pinilla F. (2007). The select action of hippocampal calcium calmodulin protein kinase II in mediating exercise-enhanced cognitive function. *Neuroscience*, 144: 825–833

- Ved R., Saha S., Westlund B., Perier C., Burnam L., et al. (2005). Similar patterns of mitochondrial vulnerability and rescue induced by genetic modification of alphasynuclein, parkin, and DJ-1 in *C. elegans*. *J Biol Chem*, 280: 42655-68.
- Verdile G., Fuller S., Atwood C.S., Laws S.M., Gandy S.E. and Martins R.N. (2004). The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacol Res*, 50:397-409.
- Verdile G., Gandy S.E. and Martins R.N. (2007). The role of presenilin and its interacting proteins in the biogenesis of Alzheimer's beta amyloid. *Neurochem Res*, 32(4-5): 609-23.
- Vernarelli J.A., Roberts J.S., Hiraki S., Chen C.A., Cupples L.A. and Green R.C. (2010). Effect of Alzheimer disease genetic risk disclosure on dietary supplement use. *Am J Clin Nutr*, 91: 1402-7.
- Viau V. (2002). Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J Neuroendocrinol*, 14: 506-13.
- Viau V. and Meaney M.J. (1991). Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*, 129: 2503-11.
- Viña J., Gimeno A., Sastre J., Desco C., Asensi M., et al. (2000). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life*, 49(6): 539-44.
- Vitek M.P., Bhattacharya K., Glendening J.M., Stopa E., Vlassara H., et al. (1994). Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 4766-70.
- Walf A.A., Rhodes M.E. and Frye C.A. (2004). Anti-depressant effects of ER $\beta$  selective estrogen receptor modulators in the forced swimtest. *Pharm Biochem Behav*, 78:523-9.
- Walf A.A. and Frye C.A., 2005a. ER[beta]-selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. *Neuropsychopharmacology*, 30: 1598-1609.
- Walf A.A. and Frye C.A., 2005b. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Neuropsychopharmacology*, 30: 1288-1301.
- Walf A.A. and Frye C.A., 2006. A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology*, 31: 1097-1111.
- Walker L.C., Kitt C.A., Schwam E., Buckwald B., Garcia F., Sepinwall J. & Price D.L. (1987). Senile plaques in aged squirrel monkeys. *Neurobiol Aging*, 8(4): 291-6.
- Walker L. C., Masters C., Beyreuther K. & Price D.L. (1990). Amyloid in the brains of aged squirrel monkeys. *Acta Neuropathol*, 80(4): 381-87.
- Walton J.R. (2006). Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 27: 385-94.

- Walton J.R. (2007). An aluminum-based rat model for Alzheimer's disease exhibits oxidative damage, inhibition of PP2A activity, hyperphosphorylated tau, and granulovacuolar degeneration. *J Inorganic Biochem*, 101: 1275-84.
- Wang C., Wang C.M., Clark K.R. and Sferra T.J. (2003). Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther*, 10(17): 1528-34.
- Wang D.L., Ling Z.Q., Cao F.Y., Zhu L.Q. and Wang J.Z. (2004a). Melatonin attenuates isoproterenol-induced protein kinase A overactivation and tau hyperphosphorylation in rat brain. *J Pineal Res*, 37: 11–16.
- Wang Y.P., Li X.T., Liu S.J., Zhou X.W., Wang X.C. and Wang J.Z. (2004b). Melatonin ameliorated okadaic-acid induced Alzheimer-like lesions. *Acta Pharmacol Sin*, 25: 276–80.
- Wang X.C., Zhang J., Yu X., Han L., Zhou Z.T., Zhang Y., et al. (2005). Prevention of isoproterenol-induced tau hyperphosphorylation by melatonin in the rat. *Acta Physiol Sin*, 57: 7–12.
- Warren G.L., Lowe D.A., Inman C.L., Orr O.M., Hogan H.A., Bloomfield S.A. and Armstrong R.B. (1996). Estradiol effect on anterior crural muscles-tibial bone relationship and susceptibility to injury. *J Appl Physiol*, 80: 1660-65.
- Wegiel J., Wisniewski H.M. and Soltysiak Z. (1998). Region- and cell-typespecific pattern of tau phosphorylation in dog brain. *Brain Res*, 802: 259-66.
- Weil Z.M., Hotchkiss A.K., Gatién M.L., Pieke-Dahl S. and Nelson R.J. (2005). Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like behaviors and deficits in sensorimotor gating. *Brain Research Bulletin*, 68: 425-29
- Weisgraber K.H. (1994). Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem*, 45: 249-302.
- Weisgraber K.H., Rall S.C., Mahley R.W., Milne R.W., Marcel Y.L., Sparrow J.T. (1986). Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem*, 261: 2068-76
- Weissman M.M. and Olfson M. (1995). Depression in women: implications for health care research. *Science*, 269: 799–801.
- Welsh-Bohmer K.A., Gearing M., Saunders A.M., Roses A.D. and Mirra S. (1997). Apolipoprotein E genotypes in a neuropathological series from the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease. *Ann Neurol*, 42(3): 319-25.
- Wesson D.W., Levy E., Nixon R.A., and Wilson D.A. (2010). Olfactory Dysfunction Correlates with Amyloid- $\beta$  Burden in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *J Neurosci*, 30(2): 505-14.
- White L., Petrovitch H., Ross G.W., Masaki K.H., Abbott R.D., et al. (1996). Prevalence of dementia in older Japanese-American men in Hawaii: The Honolulu – Asia Aging Study. *JAMA*, 276: 955-60.

- Wiesenberg I., Missbach M. and Carlberg C. (1998). The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci*, 12: 143-50.
- Williams C.L. and Tappen R.M. (2007). Effect of exercise on mood in nursing home residents with Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 22: 389-97.
- Wisniewski T., Lalowski M., Bobik M., Russell M., Strosznajder J. and Frangione B. (1996). Amyloid beta 1-42 deposits do not lead to Alzheimer's neuritic plaques in aged dogs. *Biochem J*, 313(2): 575-80.
- Witte M.M., Resuehr D., Chandler A.R., Mehle A.K. and Overton J.M. (2010). Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. *Gen Comp Endocrinol*, 166: 520-28
- Wolf S., Kronenberg G., Lehmann K., Blankenship A., Overall R., Staufenbiel M., et al. (2006). Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*, 60: 1314-1323.
- Wong P.C., Zheng H., Chen H., Becher M.W., Sirinathsinghji D.J., et al. (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and DII1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature*, 387: 288-92.
- Wong-Riley M.T. (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci*, 12(3): 94-101. Review.
- Woodruff-Pak D.S., Agelan A. and Del Valle L. (2007). A Rabbit Model of Alzheimer's Disease: Valid at Neuropathological, Cognitive, and Therapeutic Levels. *J Alzheimer's Dis*, 11: 371-83.
- Xu N., Majidi V., Markesbery W.R. and Ehmann W.D. (1992). Brain aluminum in Alzheimer's disease using an improved GFAAS method. *Neurotoxicology*, 13: 735-43.
- Xu S.J., Chen Z., Zhu L.J., Shen H.Q. and Luo J.H. (2005). Visual recognition memory is related to basic expression level of NMDA receptor NR1/NR2B subtype in hippocampus and striatum of rats. *Acta Pharmacol Sin*, 26(2): 177-80.
- Yang X., Yang Y., Fu Z., Li Y., Feng J., Luo J., et al. (2010). Melatonin ameliorates alzheimer-like pathological changes and spatial memory retention impairment induced by calyculin A. *J Psychopharmacol*, Jun 11. [Epub ahead of print].
- Yao J., Taylor M., Davey F., Ren Y., Aiton J., et al. (2007). Interaction of amyloid binding alcohol dehydrogenase Abeta mediates up-regulation of peroxiredoxin II in the brains of Alzheimer's disease patients and a transgenic Alzheimer's disease mouse model. *Mol Cell Neurosci*, 35(2): 377-82.
- Yao Y., Chinnici C., Tang H., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y. and Pratico D. (2004). Brain inflammation and oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer-like brain amyloidosis. *J Neuroinflammation*, 1: 21-29.
- Yasuda M., Maeda K., Hashimoto M., Yamashita H., Ikejiri Y., et al. (1999). A pedigree with a novel presenilin 1 mutation at a residue that is not conserved in presenilin 2. *Arch Neurol*, 56: 65-9.



- Yatin S.M., Varadarajan S., Link C.D. and Butterfield D.A. (1999). In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide(1–42). *Neurobiol Aging*, 20(3): 325-42.
- Yoshino T., Uchida K., Tateyama S., Yamaguchi I., Nakayama H. and Goto N. (1996). A retrospective study of canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Vet Pathol*, 33: 230-4.
- Yuede C.M., Zimmerman S.D., Dong H., Kling M.J., Bero A.W., Holtzman D.M., Timson B.F. and Csernansky J.G. (2009). Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 5: 426-432.
- Zaman V., Li Z., Middaugh L., Ramamoorthy S., Rohrer B., Nelson M.E., Tomac A.C., et al. (2003). The noradrenergic system of aged GDNF heterozygous mice. *Cell Transplant*, 12(3): 291-303.
- Zandi P.P., Anthony J.C., Khachaturian A.S., Stone S.V., Gustafson D., et al. (2004). Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidants vitamin supplements: The Cache County Study. *Arch Neurol*, 61: 82–88.
- Zhang M.Y., Katzman R., Salmon D., Jin H., Cai G.J., et al. (1990). The prevalence of dementia and Alzheimer's disease in Shanghai, China: impact of age, gender, and education. *Ann Neurol*, 27: 428-37.
- Zhou J., Zhang S., Zhao X. and Wei T. (2008). Melatonin impairs NADPH oxidase assembly and decreases superoxide anion production in microglia exposed to amyloid-b1–42. *J Pineal Res*, 45: 157-65.
- Zhou J.N., Liu R.Y., Kamphorst W., Hofman M.A. and Swaab D.F. (2003). Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. *J Pineal Res*, 35: 125–30.
- Zuluaga M.J., Agrati D., Pereira M., Uriarte N., Fernández-Guasti A. and Ferreira A. (2005). Experimental anxiety in the black and white model in cycling, pregnant and lactating rats. *Physiol Behav*, 84(2): 279–86.