

ORIGINAL/SECCIÓN BIOLÓGICA

## Efecto del ejercicio físico sobre las alteraciones cognitivas y el estrés oxidativo en un modelo transgénico APP/PSN1 para la enfermedad de Alzheimer

Helios Pareja-Galeano<sup>a,1</sup>, Thomas Brioche<sup>b,1</sup>, Fabián Sanchís-Gomar<sup>a</sup>, Consuelo Escrivá<sup>a</sup>, Mar Dromant<sup>a</sup>, Mari Carmen Gómez-Cabrera<sup>a</sup> y José Viña<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

<sup>b</sup> Laboratorio Movement Sport and Health Sciences, Universidad de Rennes, Rennes, Francia

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 1 de febrero de 2012

Aceptado el 4 de mayo de 2012

On-line el 9 de agosto de 2012

#### Palabras clave:

Entrenamiento  
Transgénico  
Antioxidante  
Memoria  
Ansiedad

### R E S U M E N

**Introducción:** Los efectos beneficiosos del ejercicio físico, tanto en el tratamiento como en la prevención de distintas enfermedades, han sido ampliamente establecidos. La demencia más frecuente, la enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno donde el ejercicio ha demostrado causar notables mejoras fisiopatológicas y cognitivas. En el presente trabajo estudiamos el efecto del ejercicio físico sobre el estrés oxidativo y la cognición en el modelo murino doble transgénico (2×Tg) para la EA, APP/PSN1, basado fundamentalmente en la deposición cerebral de placas de β-amiloide.

**Material y métodos:** Dieciocho ratones de 10 meses de edad fueron divididos en 4 grupos experimentales: 2×Tg entrenado (2×Tg-E) (n=5), 2×Tg reposo (2×Tg-R) (n=5), control entrenado (Control-E) (n=4) y control reposo (Control-R) (n=4). El entrenamiento de 12 semanas, fue forzado en tapiz rodante (3 días a la semana) combinado con carrera espontánea. Los animales fueron evaluados mediante test físicos y cognitivos antes y después del entrenamiento. Se analizaron los parámetros del daño oxidativo y las enzimas antioxidantes a nivel cortical y sistémico.

**Resultados:** Los ratones 2×Tg-R mostraron una disminución con el tiempo en la fuerza de agarre y el VO<sub>2máx</sub>, que se previno con el entrenamiento. El grupo 2×Tg-E demostró mejor memoria que el 2×Tg-R. Los grupos entrenados evidenciaron mayor capacidad exploratoria y menor ansiedad que los que mantuvieron reposo. El daño oxidativo sistémico se mostró ligeramente disminuido en los 2×Tg, aunque no encontramos diferencias en cuanto a lipoperoxidación, ni en la defensa antioxidante, a nivel cerebral entre los distintos grupos.

**Conclusiones:** El ejercicio físico produce mejoras en la fuerza de agarre, VO<sub>2máx</sub>, cognición y memoria de los ratones 2×Tg. Estas mejoras no están relacionadas con modificaciones significativas en la defensa antioxidante o un menor daño oxidativo causado por el ejercicio.

© 2012 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Effects of physical exercise on cognitive alterations and oxidative stress in an APP/PSN1 transgenic model of Alzheimer's disease

### A B S T R A C T

**Introduction:** The beneficial effects of physical exercise, in both the treatment and the prevention of several diseases, have been extensively demonstrated. The most common dementia, Alzheimer's disease (AD), is a disorder in which exercise induces significant improvement at pathophysiological and cognitive levels. In the present work, we studied the relationship between physical exercise, oxidative stress, and cognition in the double transgenic mice model (2×Tg) for AD, APP/PSN1. This model is mainly based on the cerebral deposition of amyloid β plaques.

**Material and methods:** Eighteen ten-month-old mice were divided into four experimental groups: exercised 2×Tg (2×Tg-E) (n=5), rested 2×Tg (2×Tg-R) (n=5), exercised controls (control-E) (n=4) and rested controls (control-R) (n=4). We trained the animals for twelve weeks with a combination of forced exercise (treadmill running three days/week) and spontaneous wheel running. The animals were evaluated

#### Keywords:

Training  
Transgenic  
Antioxidant  
Memory  
Anxiety

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jose.vina@uv.es (J. Viña).

<sup>1</sup> Estos autores han contribuido de manera ecuaníme en este trabajo.

with physical and cognitive tests before and after the training period. We analyzed systemic and cortical oxidative damage and the induction of antioxidant enzymes.

**Results:** The 2×Tg-R mice showed a decrease in their grip strength and VO<sub>2max</sub> as they grew older which was prevented by training. The 2×Tg-E group showed better memory than the 2×Tg-R animals. All the trained groups demonstrated greater exploratory capacity and less anxiety than the sedentary animals. Systemic oxidative damage was slightly decreased in the 2×Tg, although we found no difference in the lipoperoxidation and in the induction of the antioxidant defense in cortex between groups.

**Conclusions:** Physical exercise leads to improvements in the grip strength, VO<sub>2max</sub>, cognition, and memory in 2×Tg mice. These improvements are not significantly related to changes in the antioxidant defenses or a reduction in the oxidative damage brought about by exercise.

© 2012 SEGG. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia en la edad adulta y cuyas bases moleculares y etiología no están completamente establecidas<sup>1</sup>. Está clínicamente caracterizada por una progresiva pérdida de memoria y un marcado deterioro de la función cognitiva<sup>1</sup>. Entre las características neuropatológicas de la EA destaca la presencia de ovillos fibrilares intracelulares y la deposición de placas seniles, constituidas en gran parte por β-amiloide (βA)<sup>1</sup>. Esto provoca una consecuente pérdida sináptica y neuronal especialmente acentuada en ventrículos e hipocampo<sup>1</sup>.

Actualmente no existe un tratamiento farmacológico exitoso para la EA, por lo que la investigación sobre posibles terapias paliativas y preventivas derivadas de estilos de vida saludables ha cobrado especial relevancia<sup>2</sup>. El ejercicio aeróbico es una de las intervenciones más estudiadas debido a sus evidentes y significativos beneficios a nivel cerebral<sup>3</sup>. Entre estos beneficios destaca: el incremento en la síntesis de factores neurotróficos como el *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *insulin like growth factor* (IGF-I); la inducción de la defensa antioxidante y la consecuente protección frente al estrés oxidativo; la estimulación en la degradación de la proteína precursora de βA (PPβA) a través del proteasoma; el aumento del flujo sanguíneo cerebral; el incremento del metabolismo cerebral a través de lactato y, finalmente, la inducción de la neurogénesis a nivel hipocampal<sup>4</sup>.

La importancia del estrés oxidativo en la etiología de la EA ha sido objeto de estudio desde hace décadas. El sistema nervioso central es especialmente vulnerable al estrés oxidativo por poseer una alta tasa de consumo de oxígeno, abundante contenido lipídico (rico en ácidos grasos poliinsaturados), alto contenido en hierro y ácido ascórbico y relativa escasez de enzimas antioxidantes comparado con otros tejidos<sup>5</sup>.

La producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en el cerebro afectado de Alzheimer ocurre por diversos mecanismos: la activación de la NADPH oxidasa (NOX) de la microglía tanto por el βA<sup>6</sup> como por la PPβA<sup>7</sup>, la hipoxia local de ciertas partes del cerebro<sup>8</sup>, así como el bloqueo de los grupos hemo de la cadena de transporte electrónico mitocondrial por el βA<sup>9</sup>.

Aunque existe un gran número de estudios en pacientes de EA en los que se ha demostrado que el ejercicio físico aeróbico mejora a nivel cognitivo<sup>10</sup>, es ineludible utilizar modelos animales con el fin de esclarecer los mecanismos moleculares activados por el ejercicio a nivel cerebral y que, en última instancia, darán lugar a beneficios clínicos y fisiopatológicos<sup>11</sup>.

En el presente estudio utilizamos ratones doble transgénicos para la EA<sup>12</sup> con el fin de analizar el efecto del ejercicio físico sobre el estrés oxidativo y la cognición, ambos alterados en este modelo como consecuencia de su particular neurofisiopatología. El animal 2×Tg para la EA presenta un aumento en la deposición de placas de βA producidas por la sobre-expresión de la proteína madre transmembrana, PPβA, y de la enzima que la escinde, la

presenilina1 (PSN1), dando lugar así al agregado de βA. Este agregado termina formando placas insolubles a nivel cortical e hipocampal alrededor de los 9 meses de edad. Por tanto, este ratón 2×Tg, APP/PSN1, resulta un modelo de estudio muy interesante en diferentes áreas terapéuticas, entre ellas el ejercicio. A través de test cognitivos y comportamentales se pueden estudiar las mejoras como consecuencia del ejercicio, en el aprendizaje y la memoria, en la potenciación a largo plazo<sup>13</sup>, así como en la actividad exploratoria y la ansiedad<sup>14</sup> en estos animales 2×Tg. Del mismo modo diversos investigadores se han interesado en el estudio de la neurogénesis hipocampal<sup>15</sup>, y en la disminución de la deposición de placas de βA inducidas por el ejercicio en este modelo<sup>16</sup>.

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar el efecto de un protocolo de ejercicio físico aeróbico combinado (espontáneo y forzado en tapiz rodante), sobre distintas habilidades cognitivas y comportamentales. Asimismo, evaluamos la posible implicación del estrés oxidativo en dichos efectos.

## Material y métodos

### Animales de experimentación

Diez ratones 2×Tg para el modelo B6C3-Tg (APP<sup>swe</sup>, PSEN1<sup>dE9</sup>) 85DBo/J de la EA y 8 ratones de la misma colonia sin transgenes modificados, de 10 meses de edad, fueron utilizados en este estudio. Los ratones fueron divididos de forma aleatoria en 4 grupos experimentales: control reposo (Control-R) (n=4); control sometido a ejercicio (Control-E) (n=4); 2×Tg reposo (2×Tg-R) (n=5) y 2×Tg sometido a ejercicio (2×Tg-E) (n=5).

Nuestro modelo 2×Tg muestra un fenotipo parcial de EA incluyendo la sobreproducción de βA-40 y βA-42, así como deposición de esta última isoforma en hipocampo y corteza cerebral a partir de los 7-9 meses, pérdida sináptica causada por neuritis distróficas a partir de los 9 meses y disfunciones cognitivas y comportamentales a partir de los 7 meses de edad (<http://www.jax.org>). Todos los animales fueron estabulados individualmente y mantenidos en el animalario del Servicio Central de soporte a la Investigación Experimental (SCIE) de la Facultad de Farmacia bajo condiciones de temperatura constante (23 ± 1 °C), humedad relativa del 60% y ciclos de luz/oscuridad de 12:12 h. Fueron alimentados con dieta estándar (PANLAB S.L.) y provistos de agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación de la Facultad de Medicina, Universidad de Valencia.

### Diseño experimental y protocolo de entrenamiento físico

Los animales fueron sometidos a tests de aptitud física y tests cognitivos/comportamentales al inicio del estudio. Posteriormente, los grupos ejercicio entrenaron durante 12 semanas. El protocolo de entrenamiento fue una combinación entre carrera espontánea y forzada. El ejercicio espontáneo se realizó mediante la

instalación de ruedas giratorias en las jaulas de los ratones que, a través de un sensor magnético, recogían la información de tiempos y distancias de carrera diaria. El ejercicio forzado se desarrolló en un tapiz rodante (Columbus Instruments, Excer-3r Treadmill Model). Los animales tuvieron una semana de familiarización al nuevo ambiente y adaptación al ejercicio tras la cual se implementó un protocolo incremental en intensidad y duración llegando hasta 60 min por día a  $20 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$ , 3 días a la semana. Al finalizar las 12 semanas de entrenamiento todos los ratones fueron nuevamente evaluados mediante los mismos tests y seguidamente fueron sacrificados.

#### Tests físicos y cognitivos/comportamentales

##### Test de potencia aeróbica máxima

Se desarrolló una modificación al protocolo original de Davidson et al.<sup>17,18</sup>. El test en tapiz rodante consistió en 6 min de calentamiento a una velocidad de  $6 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$ . Tras el calentamiento la velocidad del tapiz fue incrementándose en  $2 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$  cada 2 min, hasta que el animal fue incapaz de seguir corriendo (extenuación). La extenuación se estableció cuando el ratón, por 3 veces consecutivas, manifestó una incapacidad para continuar con su ritmo de carrera, manteniéndose en la rejilla de descarga durante más de 2 s. Se considera la máxima velocidad de carrera como la capacidad aeróbica máxima del animal<sup>19</sup>, definiéndose la velocidad aeróbica máxima como la velocidad de carrera a la que es alcanzado el consumo máximo de oxígeno ( $\text{VO}_{2\text{máx}}$ )<sup>20</sup>.

##### Test de fuerza de agarre

Se empleó un medidor de fuerza de agarre (modelo GS3®, Bioseb) para medir esta variable en las patas delanteras de los ratones. Los animales son sujetados por la cola, por el investigador disponiendo las patas delanteras sobre la barra de tracción conectada al sensor dinamométrico. Son lentamente separados de la barra hasta que su fuerza no es suficiente para permanecer agarrados. Esta fuerza de agarre máxima es registrada para cada animal y medida en Newtons.

##### Test de reconocimiento de objetos

Este test emplea la tendencia innata de los animales a escoger objetos nuevos frente a los ya conocidos<sup>21</sup>. Evalúa el comportamiento espontáneo y la memoria. El material fue desarrollado según describe Hammond<sup>22</sup>, instalándose en una habitación insonorizada y de luminosidad invariable. El reconocimiento de objetos fue evaluado de acuerdo a un protocolo adaptado, inicialmente establecido por Ennaceur<sup>23</sup>. El día del test, cada animal se sitúa en la caja y se le permite explorar durante 5 min. Cinco minutos después, en la primera fase (F1) se presentan 2 objetos idénticos dentro de la caja, centrados pero separados entre sí para que el animal los explore durante 5 min. Transcurridos 60 min de la anterior, en la segunda fase (F2), uno de los objetos presentados en la F1 fue sustituido por un nuevo objeto distinto para que el animal lo explore de nuevo durante 5 min. Finalmente, transcurridas 24 h de la F2, en la última fase del test (F3), el objeto que aún se mantenía de la F1 es sustituido por un objeto completamente nuevo para que el animal lo explore nuevamente durante 5 min. Cada fase del test es grabada para el análisis y cálculo del ratio entre el contacto o aproximación del ratón a cada nuevo objeto con respecto al ya conocido.

##### Test de las esquinas

Este test se emplea para evaluar la capacidad exploratoria de los roedores. Los ratones se mantuvieron en una caja conocida, similar a donde se estabulaban, que se introdujo en una caja blanca más grande. Durante 30 s se cuantifica el número de esquinas

exploradas, así como de exploraciones verticales y el tiempo al que hace la primera exploración.

##### Test de campo abierto

Este test permite evaluar parámetros comportamentales a través del estudio de la ansiedad, actividad exploratoria, tigmotaxia, defecaciones y agorafobia<sup>24</sup>. Se desarrolló en una caja blanca de  $50 \times 50 \times 25 \text{ cm}$  siguiendo el protocolo de PANLAB/HARVARD-APPARATUS. Cada ratón fue introducido en la caja donde se grabó durante 5 min para el posterior análisis y cuantificación de los siguientes parámetros: tiempo transcurrido en el cuadro central, tiempo en alcanzar la periferia, número de exploraciones verticales, duración de los lavados, así como el número de defecaciones.

##### Estudio del estrés oxidativo

##### Malondialdehído

La determinación de lipoperóxidos en forma de malondialdehído (MDA) fue realizada en plasma y corteza cerebral siguiendo el método descrito por Wong et al.<sup>25</sup>. Este método está basado en la hidrólisis de los lipoperóxidos y la subsiguiente formación del aducto ácido tiobarbitúrico (TBA) y MDA (TBA-MDA<sub>2</sub>). Este aducto es detectado por HPLC en fase reversa y cuantificado a 532 nm. El modelo instrumental utilizado fue «Ultimate 3000. DIONEK» y la técnica cromatográfica fue llevada a cabo en condiciones isocráticas siendo la fase móvil una mezcla de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM (pH: 6,8) y acetonitrilo (70:30).

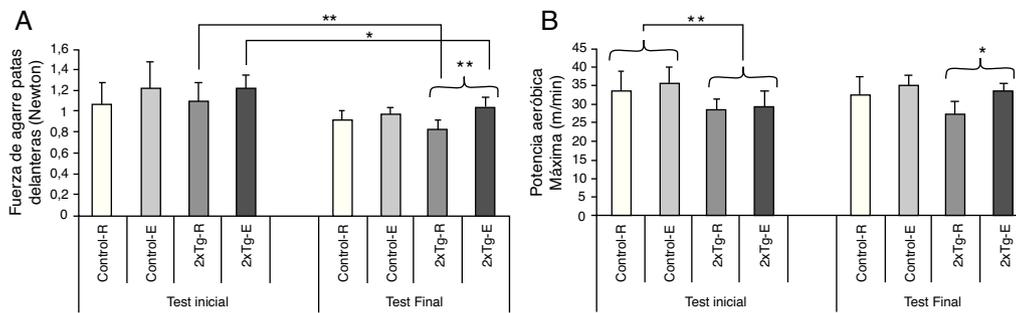
##### Cociente glutatión oxidado y reducido

El cociente glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH) fue analizado siguiendo el método previamente descrito por nuestro grupo de investigación<sup>26</sup>.

**SDS-PAGE y Western Blot.** Alícuotas de los lisados de corteza cerebral (50 µg) fueron separadas en geles para electroforesis de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida. Las proteínas fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilo que fueron bloqueadas durante 1 h con leche desnatada (5%) y se incubaron toda la noche a 4 °C con su respectivo anticuerpo primario diluido en el mismo medio de bloqueo: anti cobre/zinc superóxido dismutasa (anti-Cu/ZnSOD; 1:5.000. Assay Designs) y anti glutatión peroxidasa (anti-Gpx; 1:750. Abcam). Las membranas fueron después incubadas con el anticuerpo secundario (anti-rabbit IgG; 1:2.000. Cell Signaling) durante una hora a temperatura ambiente. Una de las muestras de cada membrana fue incubada solo con el anticuerpo secundario para garantizar la especificidad. Las proteínas específicas fueron visualizadas utilizando el procedimiento de quimioluminiscencia tal como especifica el fabricante (Amersham Biosciences). Las señales auto-radiográficas fueron cuantificadas utilizando un escáner densitométrico (BioRad, Hercules). Los niveles de  $\alpha$ -tubulina (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology) fueron determinados en todos los experimentos como marcador de control de carga.

##### Sacrificio y conservación de muestras

Los animales fueron sacrificados 24 h después de la última sesión de ejercicio siendo anestesiados por vía inhalatoria con sevoflurano (SEVOrane®). Por laparotomía amplia se accedió a la vena cava inferior para la extracción de sangre. Parte de esta sangre se dispuso en un tubo heparinizado y se centrifugó a  $1.500 \times \text{g}$ , 15 min a temperatura ambiente. Se recogió el plasma y se conservó a -20 °C para su posterior análisis. Se dispusieron 40 µl de sangre del tubo heparinizado a los que se les añadió el mismo volumen de ácido perclórico al 12%, ácido batofenantrolindisulfónico (BPDS) 2 mM. Tras agitar energicamente se centrifugó a  $15.000 \times \text{g}$ , 15 min a 4 °C. Se recogió



**Figura 1.** Adaptaciones físicas producidas por el entrenamiento. A) Test de fuerza de agarre de las patas delanteras. \* $p < 0,05$ ; 2xTg-E final vs 2xTg-E inicial; \*\* $p < 0,01$ ; 2xTg-R final vs 2xTg-R inicial y 2xTg-E vs 2xTg-R en test final. B) Test de potencia aeróbica máxima. \* $p < 0,05$ ; 2xTg-E vs 2xTg-R en test final; \*\* $p < 0,01$ ; 2xTg vs Control en test inicial. Valores expresados como media  $\pm$  DE (n = 5 grupos 2xTg; n = 4 grupos Control). Control-R y Control-E, grupo no transgénico en reposo y entrenado respectivamente; 2xTg-R y 2xTg-E, grupo doble transgénico en reposo y entrenado respectivamente.

el sobrenadante conservándolo a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior determinación de glutatión reducido (GSH). El mismo procedimiento se siguió para la determinación de glutatión oxidado (GSSG), sustituyendo los reactivos mezclados con la sangre por ácido perclórico al 12%, BPDS 2 mM, N-etilmaleimida 40 mM. El resto de la sangre se depositó en un tubo con EDTA para después centrifugarlo a  $1.500 \times g$ , 15 min a temperatura ambiente y conservar el plasma resultante a  $-20^{\circ}\text{C}$  para el posterior determinación de MDA.

También se extrajo y se conservó el cerebro de los animales, conservándose congelado tras *FreezeClamping* a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para las determinaciones mediante Western Blot, los tejidos fueron lisados en frío con tampón de lisis (Tris: 76,5 mM; pH: 6,8; SDS: 2%; Glicerol; 10%; suplementado con 2 mM de ortovanadato de sodio e inhibidor de proteasas [Sigma-Aldrich]). Los homogenados fueron sonicados en hielo durante 3 s e incubados 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y posteriormente centrifugados a  $1.500 \times g$ , 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , recogiendo finalmente el sobrenadante. La concentración de proteínas de los extractos fue cuantificada por duplicado utilizando el método de Lowry<sup>27</sup> y un estándar de BSA.

#### Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Para todos los parámetros bioquímicos, el análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza seguido por el *test post hoc* de dos factores de Bonferroni. Un análisis de varianza de medidas repetidas seguido por el *test post hoc* de Newman-Keuls fueron utilizadas para determinar los efectos del protocolo de ejercicio sobre las diferentes pruebas. Se estableció un valor de  $p < 0,05$  para considerar significativas las diferencias obtenidas.

#### Resultados

##### Efecto del entrenamiento físico sobre la potencia aeróbica máxima y la fuerza de agarre

Se estudió la carrera espontánea de los grupos ejercitados a través del tiempo y distancia recorrida, revelándose un mayor tiempo de carrera por parte de los 2xTg-E cuando los comparamos con los WT-E en la quinta semana de ejercicio. Esta diferencia se mantuvo hasta la undécima semana. El tiempo de carrera espontánea en el caso de los 2xTg-E, en la quinta semana de ejercicio, fue de  $4,78 \pm 1,19$  h diarias, frente a los animales WT-E que corrieron  $1,00 \pm 0,59$  h al día ( $p < 0,001$ ). En la undécima semana los valores de tiempo de carrera de los 2xTg-E fueron de  $2,11 \pm 1,02$  h diarias, mientras que los WT-E se mantuvieron corriendo de forma voluntaria  $0,58 \pm 0,49$  h ( $p < 0,05$ ). Similares resultados se evidencian analizando la distancia recorrida (datos no mostrados). En el test de fuerza de agarre de las patas delanteras se observa que los

2xTg pierden fuerza con el tiempo. No obstante, esta pérdida de fuerza fue significativamente menor en el grupo 2xTg-E frente a su homólogo en reposo (fig. 1A). El estudio del  $\text{VO}_{2\text{máx}}$  reveló que los ratones 2xTg comenzaron el protocolo de entrenamiento con una menor potencia aeróbica máxima que los controles. Tras las 12 semanas de estudio, el grupo 2xTg-R mostró menor potencia aeróbica máxima que el grupo 2xTg-E que se mantuvo al nivel de los controles (fig. 1B).

##### El ejercicio físico revierte las alteraciones cognitivo/comportamentales mostradas en los 2xTg

En el test de reconocimiento de objetos no se observaron cambios en la memoria a corto plazo (1 h), sin embargo en la memoria a largo plazo (24 h) los animales 2xTg-E mostraron una mejora significativa con respecto a los 2xTg-R (tabla 1A).

En el test de las esquinas, el número de exploraciones verticales incrementó tras el período de ejercicio en el grupo control-E. Asimismo, los ratones 2xTg mostraron menor número de exploraciones en comparación con los controles. La exploración de las esquinas aumentó en ambos grupos sometidos a ejercicio frente a los mantenidos en reposo (tabla 1B).

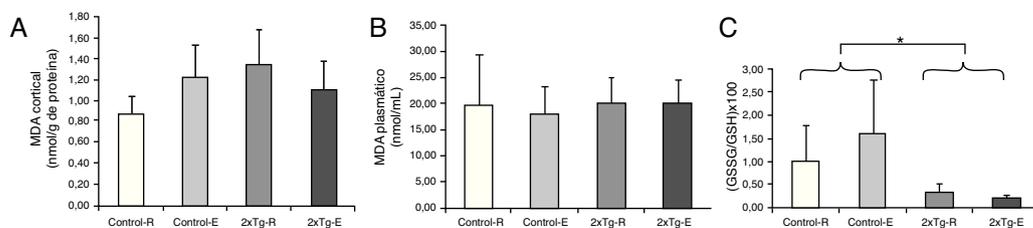
En el estudio del test de campo abierto se muestran diversas variables comportamentales. Contabilizando el tiempo que el ratón se mantuvo inmóvil en el centro de la caja no se encontraron diferencias entre los distintos grupos experimentales. El grupo 2xTg-R necesitó un mayor tiempo para alcanzar la periferia en comparación con su homólogo entrenado en el test final. Tras el período de entrenamiento, las exploraciones verticales aumentaron en todos los grupos, aunque de una forma más significativa en el grupo 2xTg-E. En el test final, el tiempo de lavado fue mayor en todos los grupos y el número de defecaciones incrementó en ambos grupos mantenidos en reposo (tabla 1C).

##### El daño oxidativo sistémico es menor en los ratones 2xTg

Los niveles de MDA medidos en corteza cerebral y en plasma no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (fig. 2A y B, respectivamente). Sin embargo, el cociente glutatión oxidado/reducido (GSSG/GSH) medido en sangre total fue mayor en los grupos controles que en los 2xTg (fig. 2C).

##### Estudio de los niveles de enzimas antioxidantes a nivel cerebral

Los niveles de la enzima antioxidante Cu/ZnSOD, implicada en la dismutación del radical superóxido, fueron mayores en el grupo Control-E cuando se compararon con el Control-R. No se observan diferencias entre los grupos 2xTg (fig. 3A). Los niveles de la enzima antioxidante GPx, implicada en la detoxificación de



**Figura 2.** Daño causado por estrés oxidativo. A) Niveles corticales de MDA. B) Niveles plasmáticos de MDA. C) Cociente (GSSG/GSH)×100. \* $p < 0,05$ ; 2×Tg vs Control. Valores expresados como media ± DE ( $n = 5$  grupos 2×Tg;  $n = 4$  grupos Control). Control-R y Control-E, grupo no transgénico en reposo y entrenado respectivamente; 2×Tg-R y 2×Tg-E, grupo doble transgénico en reposo y entrenado respectivamente.

peróxido de hidrógeno, no se modificaron en ninguno de los grupos experimentales (fig. 3B).

## Discusión

El  $VO_{2máx}$  ha demostrado ser uno de los más relevantes predictores de muerte tanto en sujetos sanos como en sujetos con enfermedades cardiovasculares. Un aumento de un 1 MET ( $3,5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ ) en el  $VO_{2máx}$  supone un 12% de mejora en la supervivencia en humanos, por lo que su determinación ha adquirido una importante relevancia en el ámbito de la medicina<sup>28</sup>. El ejercicio mantuvo la fuerza y el  $VO_{2máx}$  en los 2×Tg mientras los sedentarios sufrieron un declive en estas capacidades con el tiempo, sin demostrarse diferencias entre genotipo tal como describe Lalonde<sup>29</sup>. El hecho de que el  $VO_{2máx}$  no aumente en los animales Control-E, como consecuencia del entrenamiento, puede ser explicado por la alternancia en las sesiones de ejercicio físico forzado (3 veces por semana). Trabajos previos de nuestro grupo de investigación desarrollados en ratas, demuestran que es necesario mantener una frecuencia de entrenamiento de 5 días a la semana para inducir incrementos en el  $VO_{2máx}$  significativos<sup>18</sup>. El aumento en la fuerza de agarre demostrado por los animales 2×Tg tras el entrenamiento lo interpretamos como muy relevante por su implicación en la sarcopenia y en el riesgo de caídas cuya incidencia aumenta en el envejecimiento. De hecho, se considera que no existe una pérdida con la edad tan evidente como la pérdida de masa magra. Esta pérdida se asocia con una menor independencia del individuo y con la fragilidad, un síndrome geriátrico recientemente descrito. Buchman et al., en 2008, correlacionaron la fragilidad con la predisposición a EA<sup>30</sup>.

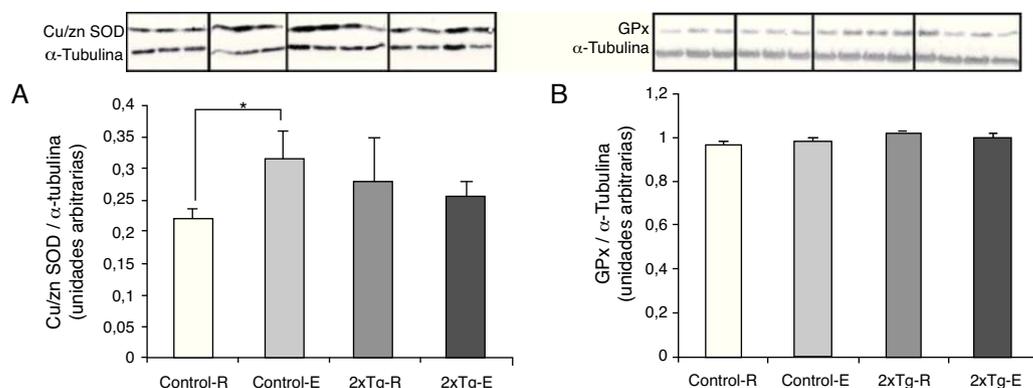
Los niveles de memoria han sido evaluados en distintos modelos murinos para la EA<sup>31</sup>, aunque sin alcanzar un consenso correlacional entre los modelos basados en la hipótesis del  $\beta A$  y la pérdida de memoria. La causa de esta indeterminación surge de las diferencias en las edades con las que se usa cada modelo y el momento de

inicio y progresión de la afección<sup>32</sup>. Basándonos en nuestro modelo APP/PSN1, encontramos que en las edades de 6, 7, 9 y 15 meses los niveles de retención de los transgénicos son normales cuando se comparan con los controles<sup>33</sup>. Otros trabajos describen normalidad en la memoria a los 11 meses seguido de una involución de esta capacidad a los 15<sup>34</sup>; o anormal retención a los 9 meses<sup>13</sup> e incluso desde los 4 meses de edad<sup>35</sup>. En nuestro estudio encontramos que los ratones 2×Tg (de 12 meses) muestran peor memoria a largo plazo que los controles. No obstante, los resultados sugieren que, gracias al ejercicio, se restituyeron estos déficits de memoria en los 2×Tg hasta alcanzar niveles similares a los controles. Resultados previos de otros grupos de investigación han mostrado efectos similares en 2×Tg de 9 meses<sup>13</sup> y 24 meses<sup>14</sup>.

El ejercicio desencadenó una mayor actividad exploratoria tanto en los ratones controles como 2×Tg siendo ligeramente superior en los primeros; se demostró una mayor neofobia en los 2×Tg-R, ya descrita por Lalonde<sup>36</sup>, que revirtió con el ejercicio; así como también se evidenció un incremento en la ansiedad en ambos grupos reposo, medida a través del control de esfínteres<sup>37</sup>.

La mayor actividad mostrada por los 2×Tg a través de la carrera espontánea responde al comportamiento estereotipado mostrado por distintos modelos de EA como el triple transgénico para PP $\beta A$ , PSN1 y Tau<sup>38</sup> o el transgénico simple para PP $\beta A$ <sup>39</sup>. Además, se describe una correlación inversa entre esta estereotipia manifestada a través de la carrera y los comportamientos estereotipados clásicos sugiriendo que el ejercicio espontáneo los sustituye a la vez que se correlaciona positivamente con la eliminación de placas de  $\beta A$ <sup>39</sup>.

La relación entre estrés oxidativo y EA ha sido ampliamente estudiada por nuestro grupo de investigación<sup>40</sup>. Sin embargo, no encontramos cambios en la peroxidación lipídica debidos a genotipo, tanto a nivel cerebral como en plasma. El daño oxidativo no se vio tampoco modificado por el ejercicio. A nivel sistémico la disminución en el cociente GSSG/GSH indica un menor estrés oxidativo en sangre en los 2×Tg frente a los controles. Estos resultados, sin duda paradójicos, en relación al estrés oxidativo podrían ser



**Figura 3.** Defensa antioxidante cortical. A) Niveles de Cu/Zn SOD. \* $p < 0,05$ ; Control-E vs Control-R. B) Niveles de GPx. Valores expresados como media ± DE ( $n = 5$  grupos 2×Tg;  $n = 4$  grupos Control). Control-R y Control-E, grupo no transgénico en reposo y entrenado respectivamente; 2×Tg-R y 2×Tg-E, grupo doble transgénico en reposo y entrenado respectivamente.

**Tabla 1**  
Test cognitivos

	Test cognitivos							
	Antes del entrenamiento (AE)			Después del entrenamiento (DE)				
	Control-R	Control-E	2×Tg-R	2×Tg-E	Control-R	Control-E	2×Tg-R	2×Tg-E
<b>A) Reconocimiento de objetos</b>								
Porcentaje de reconocimiento de objetos idénticos	49,20 ± 2,59	48,96 ± 7,59	48,58 ± 16,18	52,65 ± 5,60	46,51 ± 3,69	51,40 ± 3,44	51,64 ± 2,22	48,50 ± 3,07
Porcentaje de reconocimiento de nuevo objeto (1 h)	41,28 ± 3,13	41,35 ± 7,15	45,96 ± 7,63	47,18 ± 13,86	44,10 ± 5,46	45,53 ± 8,90	43,12 ± 5,28	49,18 ± 7,01
Porcentaje de reconocimiento de nuevo objeto (24 h)	41,97 ± 6,91	49,25 ± 14,34	49,83 ± 7,72	51,16 ± 7,48	50,45 ± 12,40	55,13 ± 1,35	40,03 ± 6,11	53,41 ± 5,51 <sup>a</sup>
<b>B) Test de las esquinas</b>								
N.º de exploraciones verticales	2,00 ± 2,16	0,75 ± 0,95	0,80 ± 0,83	1,8 ± 1,09	5,00 ± 11,63 <sup>d</sup>	5,00 ± 1,73 <sup>d</sup>	1,40 ± 1,14 <sup>d,f</sup>	3,00 ± 1,41 <sup>d,f</sup>
N.º de exploraciones de esquinas	2,25 ± 2,21	1,00 ± 0,81	2,00 ± 1,58	1,40 ± 1,14	2,50 ± 1,73 <sup>d</sup>	5,00 ± 1 <sup>d,g</sup>	3,80 ± 1,64 <sup>d</sup>	5,00 ± 1,41 <sup>d,g</sup>
<b>C) Test de campo abierto</b>								
N.º de exploraciones verticales	13,50 ± 8,81	10,00 ± 2,70	6,20 ± 3,19	6,80 ± 5,80	20,50 ± 12,01	27,33 ± 23,62	14,00 ± 8,45	21,60 ± 10,08 <sup>b</sup>
Tiempo total de lavado (s)	6,75 ± 4,34	8,00 ± 4,24	6,60 ± 1,14	3,80 ± 3,83	9,00 ± 4,09 <sup>b</sup>	14,00 ± 1,00 <sup>d</sup>	8,20 ± 3,96 <sup>b</sup>	9,60 ± 7,43 <sup>b</sup>
N.º de defecaciones	1,00 ± 0,81	1,25 ± 0,50	1,20 ± 0,83	1,20 ± 1,09	350 ± 1,73 <sup>c</sup>	2,66 ± 2,08 <sup>c</sup>	2,60 ± 1,14 <sup>c</sup>	3,00 ± 0,70 <sup>c</sup>
Tiempo en alcanzar la periferia (s)	23,75 ± 17,44	12,50 ± 9,88	17,60 ± 10,28	27,40 ± 20,88	7,25 ± 3,86 <sup>b</sup>	3,66 ± 3,05 <sup>b</sup>	19,20 ± 10,32 <sup>b,e</sup>	8,00 ± 6,63 <sup>a,b,e</sup>
Latencia en el centro (s)	4,50 ± 8,34	5,50 ± 11,00	8,60 ± 10,57	9,00 ± 17,46	2,50 ± 3,00	1,00 ± 1,00	8,60 ± 10,99	1,20 ± 2,16

AE: antes del entrenamiento; DE: después del entrenamiento; Control-R y Control-E, no transgénicos mantenidos en reposo y sometidos a ejercicio respectivamente; 2×Tg-R y 2×Tg-E, doble transgénicos mantenidos en reposo y sometidos a ejercicio respectivamente. Valores expresados como media ± DE (n=5 grupos 2×Tg; n=4 grupos control).

Estadística: <sup>a</sup>p < 0,05 con respecto a 2×Tg-R en test DE; <sup>b</sup>p < 0,01; <sup>c</sup>p < 0,001 con respecto a los valores de test AE; <sup>d</sup>p < 0,05; <sup>e</sup>p < 0,01 con respecto a Control en test DE; <sup>f</sup>p < 0,05 con respecto a grupos reposo en test DE.

explicados por un aumento en la inducción de la enzimas antioxidantes en los 2×Tg. Sin embargo, cuando estudiamos la defensa antioxidante no encontramos ninguna diferencia entre los 2 genotipos, ni como consecuencia del ejercicio espontáneo. Únicamente los ratones del grupo Control-E mostraron un aumento en los niveles de Cu-Zn SOD. Este resultado refuerza la idea de que el ejercicio físico induce la defensa antioxidante endógena no solo en el músculo esquelético<sup>41</sup> sino también en otros tejidos como el cerebro<sup>42</sup>. La hormesis es el fenómeno por el cual bajas dosis de tóxicos u otros estresores dañinos para el organismo, activan una respuesta adaptativa a estrés que lleva a una resistencia del organismo a dosis crónicas del mismo agente<sup>43</sup>. De esta forma, consideramos que el ejercicio supuso un estrés adicional que se vio contrarrestado por la inducción adaptativa de la enzima antioxidante Cu-ZnSOD<sup>44</sup>. Consideramos que la disminución en el estrés oxidativo sistémico en los ratones 2×Tg podría ser motivada por la edad de los animales, sin embargo necesitamos desarrollar nuevos estudios para explicar estos paradójicos resultados.

Concluimos que el ejercicio físico produce mejoras en la fuerza de agarre, VO<sub>2</sub>max, cognición y memoria de los ratones 2×Tg para APP/PSN1. Estas mejoras no están relacionadas con modificaciones en la defensa antioxidante o un menor daño oxidativo causadas por el ejercicio.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por las subvenciones SAF2009-08334; BFU2007-65803/BFI del Ministerio español de Educación y Ciencia (MEC); ISCIII2006-RED13-027 de la «Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y fragilidad (RETICEF)», PROMETEO2010 / 074, y por la UE COSTB35. Este estudio ha sido cofinanciado por fondos FEDER de la Unión Europea. El trabajo también fue apoyado por una beca FPU del Ministerio español de Educación y Ciencia (MEC) concedida a Helios Pareja Galeano (2010-2014).

### Bibliografía

- Jicha GA, Carr SA. Conceptual evolution in Alzheimer's disease: implications for understanding the clinical phenotype of progressive neurodegenerative disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;19:253-272.
- Pope SK, Shue VM, Beck C. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? *Annu Rev Public Health.* 2003;24:111-32.
- Radak Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, et al. Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;20:777-83.
- Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H. When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci.* 2010;33:569-79.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 1993;262:689-95.
- Shimohama S, Tanino H, Kawakami N, Okamura N, Kodama H, Yamaguchi T, et al. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273:5-9.
- Qin B, Cartier L, Dubois-Dauphin M, Li B, Serrander L, Krause KH. A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. *Neurobiol Aging.* 2006;27:1577-87.
- Holscher C. Possible causes of Alzheimer's disease: amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis. *Neurobiol Dis.* 1998;5:129-41.
- Cardoso SM, Santos S, Swerdlow RH, Oliveira CR. Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity. *FASEB J.* 2001;15:1439-41.
- Lautenschlager NT, Cox KL, Flicker L, Foster JK, van Bockxmeer FM, Xiao J, et al. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA.* 2008;300:1027-37.
- Rockenstein E, Crews L, Masliah E. Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:1093-102.
- Yan P, Bero AW, Cirrito JR, Xiao Q, Hu X, Wang Y, et al. Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice. *J Neurosci.* 2009;29:10706-14.

13. Liu HL, Zhao G, Cai K, Zhao HH, Shi LD. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res.* 2011;218:308–14.
14. Ke HC, Huang HJ, Liang KC, Hsieh-Li HM. Selective improvement of cognitive function in adult and aged APP/PS1 transgenic mice by continuous non-shock treadmill exercise. *Brain Res.* 2011;1403:1–11.
15. Catlow BJ, Rowe AR, Clearwater CR, Mamcarz M, Arendash GW, Sánchez-Ramos J. Effects of environmental enrichment and physical activity on neurogenesis in transgenic PS1/APP mice. *Brain Res.* 2009;1256:173–9.
16. Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, et al. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell.* 2005;120:701–13.
17. Davidson SR, Burnett M, Hoffman-Goetz L. Training effects in mice after long-term voluntary exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2006;38:250–5.
18. Gómez-Cabrera MC, Doménech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:142–9.
19. Davies KJ, Packer L, Brooks GA. Exercise bioenergetics following sprint training. *Arch Biochem Biophys.* 1982;215:260–5.
20. Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol.* 1978;45:1009–15.
21. Ennaceur A, Meliani K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav Brain Res.* 1992;51:83–92.
22. Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;82:26–34.
23. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behavioral data.* *Behav Brain Res.* 1988;31:47–59.
24. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463:3–33.
25. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach Jr CN, Sunderman Jr FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem.* 1987;33:214–20.
26. Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, García de la Asunción J, Estrela JM, Vina J. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem.* 1994;217:323–8.
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265–75.
28. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med.* 2002;346:793–801.
29. Lalonde R, Kim HD, Fukuchi K. Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APPswe + PS1/DeltaE9 mice. *Neurosci Lett.* 2004;369:156–61.
30. Buchman AS, Schneider JA, Leurgans S, Bennett DA. Physical frailty in older persons is associated with Alzheimer disease pathology. *Neurology.* 2008;71:499–504.
31. Dere E, Huston JP, de Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31:673–704.
32. Ashe KH. Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Learn Mem.* 2001;8:301–8.
33. Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D. Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav Genet.* 1999;29:177–85.
34. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, et al. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature.* 2000;408:982–5.
35. Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, et al. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002;22:1858–67.
36. Lalonde R, Kim HD, Maxwell JA, Fukuchi K. Exploratory activity and spatial learning in 12-month-old APP(695)SWE/co+PS1/DeltaE9 mice with amyloid plaques. *Neurosci Lett.* 2005;390:87–92.
37. Hall CS. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934;18:385–403.
38. García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, et al. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis.* 2011;24:421–54.
39. Richter H, Ambree O, Lewejohann L, Herring A, Keyvani K, Paulus W, et al. Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: protection or symptom? *Behav Brain Res.* 2008;190:74–84.
40. Vina J, Lloret A, Valles SL, Borrás C, Badía MC, Pallardo FV, et al. Mitochondrial oxidant signalling in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2007;11:175–81.
41. Gómez-Cabrera MC, Doménech E, Vina J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:126–31.
42. Radak Z, Kumagai S, Taylor AW, Naito H, Goto S. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007;32:942–6.
43. Martins I, Galluzzi L, Kroemer G. Hormesis, cell death and aging. *Aging (Albany NY).* 2011;3:821–8.
44. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev.* 2008;7:34–42.