



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

**FENOTIPO DEPRESIVO EN RATONES DEFICIENTES
EN AUTOFAGIA: EFECTOS DE LOS EJERCICIOS DE
FUERZA Y RESISTENCIA**

Helena Codina Martínez

Oviedo, Julio 2015

Trabajo Fin de Máster

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción.....	2
Beneficios del ejercicio físico.....	2
Proceso de autofagia y su regulación	4
Modelos murinos carentes de autofagina	8
Neurogénesis.....	11
Hipótesis y objetivos	14
Material y Métodos	15
Animales de experimentación	15
Test de reconocimiento de objetos.....	15
Entrenamiento.....	16
Obtención de tejidos.....	19
Medida del área del giro dentado.....	19
Análisis estadístico.....	20
Resultados	21
Protocolo de entrenamiento.....	21
Pruebas de evaluación de fuerza y de resistencia	22
Test de reconocimiento de objetos.....	26

Medición del área del giro dentado del hipocampo	27
Test de campo abierto	29
Discusión.....	31
Conclusiones.....	40
Bibliografía.....	41

RESUMEN

El ejercicio físico presenta una serie de beneficios que pueden aplicarse para el tratamiento de diversas patologías, puesto que no tiene efectos secundarios y además su coste económico es muy bajo. Sin embargo, es necesario conocer cuáles son las bases moleculares de los efectos del ejercicio para poder realizar una prescripción eficaz de ejercicio en función de la patología. La autofagia está implicada en diversas rutas metabólicas que participan en los efectos del ejercicio de resistencia y del ejercicio de fuerza. Por ello, analizamos dos tipos diferentes de entrenamiento, fuerza y resistencia, en un grupo de ratones salvajes y de ratones *Atg4b*^{-/-}, con una deficiencia parcial en la vía autofágica. Ambos tipos de entrenamiento fueron eficaces, si bien los ratones *Atg4b*^{-/-} respondieron al ejercicio con una capacidad de mejora menor con respecto a los ratones de tipo salvaje. Además, analizamos el cerebro de estos animales para valorar los efectos del ejercicio en el proceso de neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. Este análisis nos permitió observar que algunos animales deficientes en *Atg4b* presentaban una morfología del giro dentado anómala, que no había sido descrita anteriormente.

SUMMARY

Physical exercise benefits can be applied for the treatment of different diseases, since it has not side effects and its cost is very low. However, it is necessary to know molecular bases of exercise's effects, with the aim of providing a better exercise prescription depending on pathology. Autophagy is implicated in metabolic routes which participate in endurance and resistance exercises. Thus, we have carried out resistance and endurance training protocols in a small group of wild-type and *Atg4b*^{-/-} mice, which show a partial impairment of the autophagic pathway. Both types of training were effective, although *Atg4b*^{-/-} mice have shown a lower improvement than wild-type mice. Moreover, brain samples were analyzed for exercise-associated effects on dentate gyrus neurogenesis. In this case, we have found that some of the *Atg4b*^{-/-} mice have an abnormal dentate gyrus that has not been described before. Thus, more studies are needed to decipher if this morphological alteration have implication on neurogenesis and on exercise response.

INTRODUCCIÓN

Nuestro grupo de investigación está interesado en los efectos que tiene el ejercicio a diferentes niveles, ya sea en personas sanas o en personas con algún tipo de patología, como por ejemplo diabetes, hipertensión y enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, es necesario que la prescripción de ejercicio se adecue a la situación particular de cada individuo, para que tenga los efectos beneficiosos que se le atribuyen. Para realizar una prescripción adecuada, debemos conocer cómo el organismo responde al ejercicio a nivel molecular.

Beneficios del ejercicio físico

Existen numerosas evidencias que demuestran que el ejercicio regular tiene numerosos beneficios para la salud, como el mantenimiento del rendimiento físico o la prevención y la mejora de diversas patologías, entre las que se encuentran las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, algunos tipos de cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. De hecho, poseer una buena forma física es un indicador de buena calidad de vida. El entrenamiento físico es capaz de inducir diferentes adaptaciones fenotípicas a nivel del músculo esquelético, entre las que se encuentran la biogénesis mitocondrial y la transformación del tipo de fibra en el músculo, la angiogénesis o la neurogénesis entre otros (Lira y cols., 2013).

Existen diferentes clases de ejercicio, y cada uno de ellos causa efectos y beneficios distintos en el organismo. Principalmente se pueden clasificar en seis grupos: fuerza, resistencia, velocidad, flexibilidad, coordinación y equilibrio (Figura 1). El presente Trabajo Fin de Máster se centra en dos de ellos, el ejercicio de fuerza y el ejercicio de resistencia.

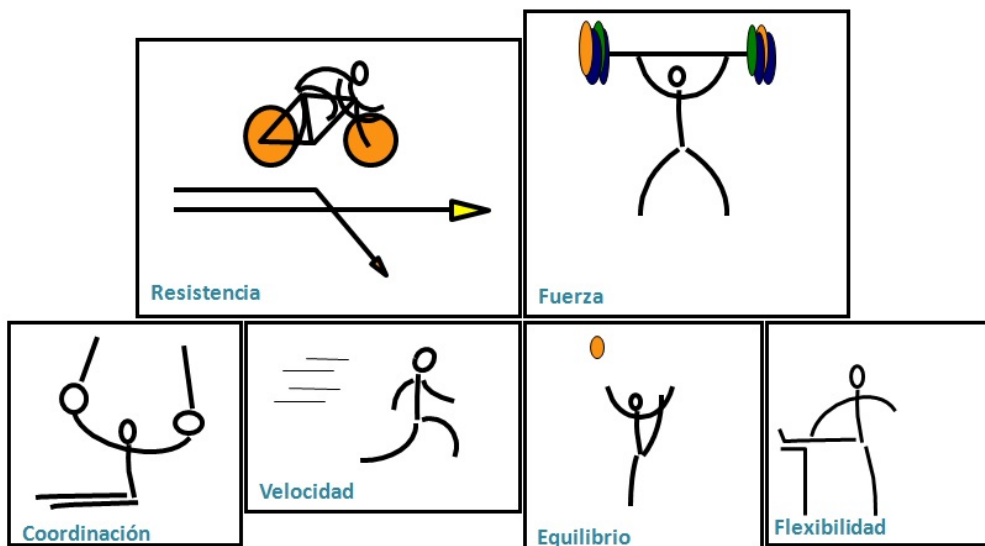


Figura 1. Clases de ejercicio. Los diferentes tipos de ejercicios se pueden clasificar, según los efectos y beneficios que causan sobre el organismo, en: resistencia, fuerza, coordinación, velocidad, equilibrio y flexibilidad. Figuras realizadas por el Dr. Fernández.

El ejercicio de fuerza se caracteriza por utilizar fundamentalmente las fibras de tipo II. Por ello la regeneración de ATP se realizará por las rutas metabólicas anaeróbicas, como es la vía láctica, y en menor grado utilizará el metabolismo aeróbico glucolítico y oxidativo. Entre los beneficios que produce el entrenamiento de fuerza cabe destacar el aumento de la masa muscular, de la densidad ósea y del metabolismo de la glucosa, hecho relevante en patologías como la diabetes (Bruusgaard y cols., 2010).

En cambio, el ejercicio de resistencia es de tipo aeróbico, lo que indica que se requiere la presencia de oxígeno para las diferentes rutas metabólicas que se llevan a cabo (lipolítica y glucolítica), y en él intervienen las fibras musculares de tipo I. Además, los beneficios descritos para este tipo de ejercicio no sólo se refieren al músculo esquelético, sino que también ejerce acciones a otros niveles. Por ejemplo, se ha descrito su papel en la regulación de la inflamación, ayudando a prevenir patologías cardiovasculares (Gleeson y cols., 2011; Pedersen y Febbraio, 2012); en la disminución tanto de la ansiedad como de la depresión; en el incremento de la neurogénesis (Kempermann y cols., 2010), ya que, entre otras cosas, el ejercicio de resistencia induce un incremento del flujo sanguíneo hacia el cerebro (Aimone y cols., 2014); así como en el aumento los niveles de factores de crecimiento, como el factor neurotrófico derivado del cerebro

(BDNF), fundamental para la supervivencia, el crecimiento y la sinaptogénesis neuronal y el músculo esquelético. Incluso, el ejercicio tiene un importante papel en la homeostasis energética de todo el organismo (Pedersen y cols., 2009; Mattson, 2012).

Una de las claves para poder determinar el por qué de los beneficios del ejercicio es conocer cómo actúa a nivel molecular. Existen diferentes vías mediadas por el ejercicio, y en cada una de ellas participan distintas proteínas reguladas por el tipo de entrenamiento que se realiza. En el caso del entrenamiento de fuerza, uno de los complejos principales que se activa es mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que se encarga de integrar las señales de la situación energética de la célula y de estímulos ambientales (nutrientes, factores de crecimiento, ejercicio, etc.), para controlar la síntesis y la degradación de proteínas, y por supuesto el crecimiento celular. En cambio, durante el ejercicio de resistencia una de las enzimas que se activa es la AMPK (*5' AMP-activated protein kinase*), que funciona como un indicador de combustible metabólico, al activarse cuando se produce una disminución de los niveles energéticos. AMPK inhibe las vías de consumo de ATP y activa vías implicadas en el catabolismo de carbohidratos y ácidos grasos para restaurar los niveles de ATP (Hawley, 2009).

Tanto mTOR como AMPK son proteínas involucradas en un gran número de rutas que están relacionadas con el metabolismo celular. Debido a esto se ha observado que algunos de los beneficios que aporta el ejercicio se solapan con otras funciones protectoras celulares, como es el caso de la vía de la autofagia, en la que también son imprescindibles mTOR y AMPK. A esto hay que añadir que se ha demostrado que el ejercicio es un inductor de la autofagia en varios tejidos y órganos como músculo estriado y cardíaco, hígado, páncreas, tejido adiposo o cerebro, (He y cols., 2012a; Lira y cols., 2013).

Proceso de autofagia y su regulación

La autofagia es una vía de degradación responsable de la digestión y del reciclaje de proteínas y de orgánulos defectuosos, así como de patógenos intracelulares, mediante autofagosomas. Es un proceso esencial para la supervivencia celular, ya que mantiene la homeostasis intracelular,

permitiendo eliminar proteínas y estructuras celulares dañadas que tienden a formar agregados. A su vez, es un proceso importante para el mantenimiento del equilibrio energético ante el déficit de nutrientes. De hecho, la vía de la autofagia se identificó como un mecanismo inducido por falta de nutrientes celulares. También es vital en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Menzies y cols., 2015). Algunos estudios han demostrado que la pérdida de autofagia está implicada en el desarrollo de numerosas patologías, desde enfermedades infecciosas hasta neurodegeneración o cáncer (Ravikumar y cols., 2010). Además, en el tejido muscular produce un desarrollo anormal del músculo cardíaco y una atrofia del músculo esquelético (He y cols., 2012a).

Hasta el momento, se sabe que la regulación de la autofagia se produce gracias a más de treinta genes diferentes, algunos de los cuales están implicados en varias rutas metabólicas. Todos ellos se pueden agrupar dependiendo de la etapa de la autofagia en la que están implicados: iniciación del autofagosoma, elongación, maduración y fusión con el lisosoma. El inicio de la autofagia comienza con la formación del autofagosoma mediante la fusión de vesículas procedentes de

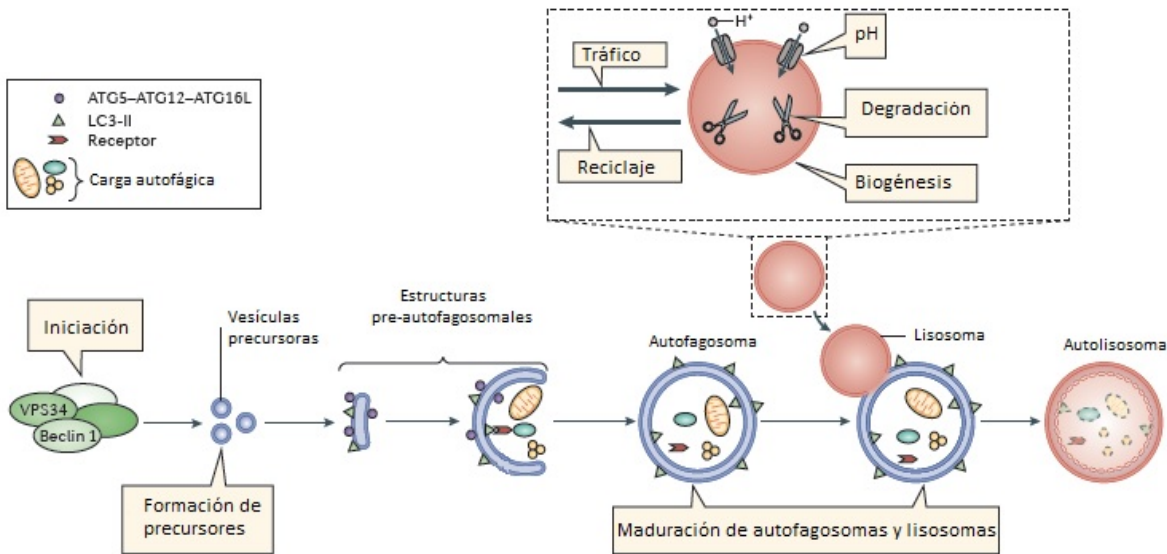


Figura 2. Formación del autofagosoma y fusión con el lisosoma. Para que la autofagia se lleve a cabo es necesaria la interacción de diversas proteínas que dan lugar a la formación de complejos como Beclin1-Vps34, imprescindible en la etapa de iniciación, o Atg5-Atg12-Atg16L1, fundamental en la elongación del fagóforo. Una vez formado el autofagosoma se fusiona al lisosoma, que previamente se encontrará en estado de acidificación. Imagen modificada de Ravikumar y cols., 2010.

diferentes orgánulos, entre los que se cree que se encuentran el retículo endoplásmico o las mitocondrias, cuando se está en estado de ayuno. Para que se lleve a cabo este proceso se requiere un número elevado de distintas proteínas y enzimas que interactúan unas con otras para activarse, inhibirse y unirse, dando complejos como el Beclin1-Vps34 o el FIP200-ULK1, integrado por las proteínas Atg13, ULK1 o su homólogo ULK2 y FIP200 (Ravikumar y cols., 2010; Menzies y cols., 2015).

Una vez fusionadas las vesículas, se forma un saco aplanado y membranoso llamado fagóforo al que, a su vez, se fusionan otras vesículas adicionales hasta formar una estructura de doble membrana, el autofagosoma, capaz de englobar fracciones de citoplasma (Figura 2). Esta etapa es la de elongación y, al igual que en la iniciación, intervienen multitud de proteínas que interactúan y dan nuevos complejos imprescindibles. Es el caso de la proteína Atg12, que es activada por Atg7 y transferida por Atg10, para después unirse a Atg5 y conjugarse, a su vez, con Atg16L1. Así se forma el complejo Atg5-Atg12-Atg16L1, fundamental para que se produzca la elongación del pre-autofagosoma, y una vez formado el autofagosoma se disocia del mismo. Posteriormente, el autofagosoma se fusiona con el endosoma para formar un orgánulo híbrido denominado anfisoma, el cual es dirigido por los microtúbulos hacia el lisosoma, en estado de acidificación, degradándose el contenido (Menzies y cols., 2015).

La autofagia está regulada por un gran número de rutas y moléculas diferentes (Figura 3). Una de ellas es mTOR, que interactúa con el complejo FIP200-ULK1 y tiene un papel fundamental en el control de la formación del autofagosoma, dependiendo de si las condiciones celulares son óptimas o si hay déficit de nutrientes. A su vez, hay diversas señales que pueden controlar a mTOR, como son los factores de crecimiento, los aminoácidos, la glucosa, el estado energético, el estrés o algunos fármacos, como es el caso del antibiótico rapamicina (aislado del *Streptomyces hygroscopicus*). En diversos estudios se ha observado que, dependiendo de las condiciones, mTOR puede inhibir o activar la autofagia. Ante un ambiente enriquecido en nutrientes, mTOR interactúa con el complejo FIP200-ULK1 y media la fosforilación de ULK1 y Atg13, suprimiendo así la autofagia. Por el contrario, en estado de inanición o bajo tratamiento con algunos fármacos como la rapamicina, mTOR se disocia del complejo, dando como

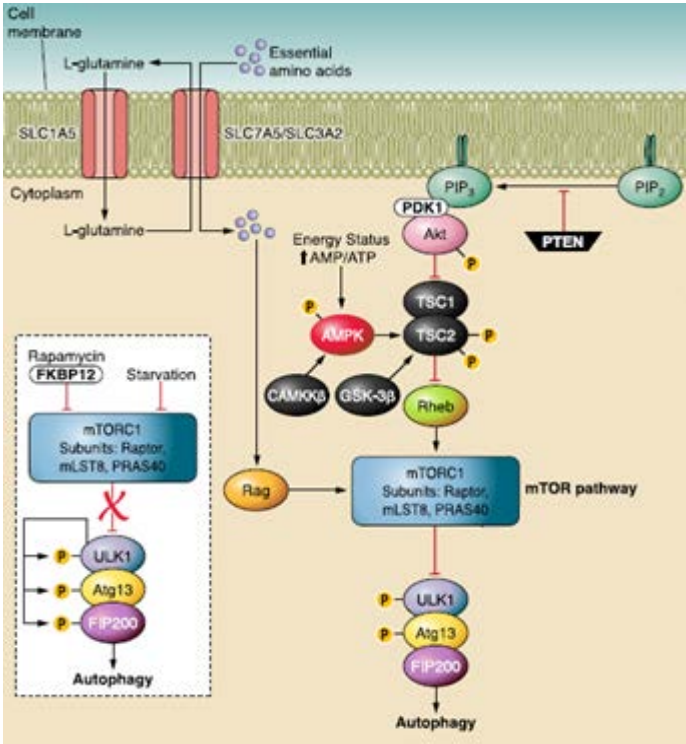


Figura 3. Regulación de la autofagia. Bajo condiciones ricas en nutrientes, mTOR interactúa con el complejo FIP200-ULK1, fosforilando a ULK1 y Atg13, e inhibiendo la autofagia. En condiciones de inanición o tratamiento con rapamicina, mTOR se disocia de dicho complejo, activándose ULK1 y fosforilando a Atg13, FIP200 y a sí misma, induciendo la autofagia. Con un balance energético en el que la relación AMP/ATP tiene niveles disminuidos, la AMPK se encuentra fosforilada y activada, fosforilando a su vez a TSC2 para inhibir a mTOR. Imagen modificada de Ravikumar y cols., 2010.

Por todo ello, tanto AMPK como mTOR cumplen un papel fundamental entre la regulación de los niveles energéticos y la autofagia, lo que podría explicar por qué el ejercicio de resistencia induce la activación de la autofagia. De hecho, el ejercicio de resistencia es un inductor de AMPK, mientras que el de fuerza activa a mTOR (Hawley, 2009). Esta afirmación está evidenciada por diferentes estudios, como el de He y colaboradores (2012a), en los que se muestra el aumento de fagosomas y proteínas involucradas en la formación de los mismos, en diferentes tejidos (músculo, hígado, páncreas, tejido adiposo y cerebro) de ratones que realizaron ejercicio de resistencia frente a los que no realizaron ejercicio.

resultado la activación de ULK1, que a su vez es capaz de fosforilar a Atg13, a FIP200 y a sí misma, activándose la autofagia (Ravikumar y cols., 2010).

mTOR puede ser un sensor de cambios a nivel energético a través de la vía de la AMPK. Cuando la relación AMP/ATP aumenta, se produce la fosforilación y activación de la AMPK, inhibiéndose las rutas anabólicas que requieren energía para llevarse a cabo. A su vez, se activan rutas catabólicas para generar más ATP y recuperar su déficit. Cuando existe un déficit energético, AMPK se activa fosforilando y activando a la proteína TSC2, encargada de inhibir a su vez a mTOR, lo que produce la activación de la autofagia. Por otro lado, AMPK también fosforila a ULK1, incrementando así la señal de

Modelos murinos carentes de autofaginas

Se han descrito muchos grupos de genes que intervienen en el proceso de autofagia entre los que caben destacar los *Atg*. En concreto, se han logrado identificar hasta dieciséis genes diferentes en levaduras, y la mayoría de ellos tienen su ortólogo en mamíferos. Gracias a esto se han podido generar diferentes modelos de ratón carentes en algunos de ellos, como es el caso de los ratones *Atg7^{-/-}* (Komatsu y cols., 2006) y *Atg5^{-/-}* (Hara y cols., 2006). Estos modelos presentan deficiencia completa en autofagia específica de células neuronales, lo que conlleva un descenso de su supervivencia pocas semanas tras el nacimiento, además de otras alteraciones, como afectación neurológica. Se ha observado que los ratones carentes en la proteína *Atg7* son viables al nacer, pero a partir de la cuarta semana su tasa de supervivencia disminuye, no superando ninguno la semana veintiocho. Estos animales muestran retraso en el crecimiento a partir de la semana catorce, así como déficits motores, reflejos anormales y temblores. A su vez, presentan deterioro en la conducta entre las semanas catorce y veintiuno, lo que sugiere que la autofagia produce trastornos neurológicos severos. Los exámenes histológicos muestran la presencia de atrofia en la región cortical del cerebro, con un número muy pequeño de neuronas piramidales en esa zona, así como reducción del número de células de Purkinje en la corteza cerebelosa y cuerpos fibrilares, que contienen ubiquitina tanto en el espacio intercelular como en las neuritas. Los cuerpos de inclusión que contienen ubiquitina aumentan en número según avanza la edad de los animales (Komatsu y cols., 2006).

Por otro lado, se ha visto que los ratones *Atg5^{-/-}* apenas expresan la proteína LC3 (imprescindible en la etapa de elongación del fagóforo), lo que indica que la formación del autofagosoma está deteriorada en el cerebro. Al igual que los *Atg7^{-/-}*, presentan retraso en el crecimiento y desarrollo anormal a nivel motor y de conducta después de las tres semanas. Se ha observado también que tienen caminar atáxico, así como deterioro de la coordinación motora, el equilibrio y la fuerza de agarre. Los análisis histológicos muestran que el número de células de Purkinje del cerebelo está disminuido en estos animales, y que estas células, a su vez, presentan núcleos situados excéntricamente. Además, se detectaron niveles altos de apoptosis en las células granulares, pérdida de células piramidales en corteza e inflamación axonal a nivel de la corteza y del

hipocampo. Al igual que en los ratones *Atg7^{-/-}*, los *Atg5^{-/-}* poseen agregados proteicos con alto contenido en ubiquitina, dependientes de la edad (Hara y cols., 2006).

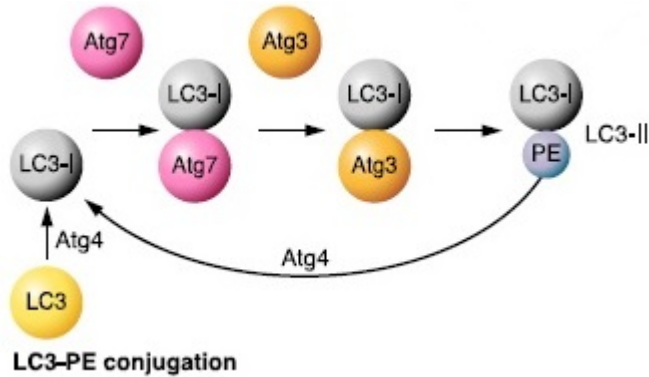


Figura 4. Acción de la cisteína proteasa Atg4. Atg4 proteoliza al precursor LC3, transformándose éste en LC3-I y conjugándose con PE para formar LC3-II, en una reacción en la que colaboran Atg 7 y Atg 3. LC3-II está implicado en alargar el fagóforo, y permanece en el autofagosoma hasta que éste se fusione con el lisosoma. Imagen tomada de Ravikumar y cols., 2010.

Otra proteína involucrada en la autofagia, que se ha estudiado en modelos murinos carentes en autofagia, es la Atg4 (Figura 4). La Atg4 es una cisteína proteasa de mamíferos que posee cuatro ortólogos diferentes en el ser humano (Atg4a, Atg4b, Atg4c y Atg4d), a diferencia de la Atg7 y la Atg5, que poseen un único ortólogo, de los cuáles aún no se conoce su función exacta. Se ha observado que los ratones con deficiencia en el gen *Atg4b* o en el *Atg4c* (*Atg4b^{-/-}* o *Atg4c^{-/-}*, respectivamente) presentan autofagia parcial y un desarrollo aparentemente normal, alcanzando la edad

adulta sin exceso de mortalidad, siendo fértiles y sin sufrir patologías aparentes. Los animales *Atg4c^{-/-}* son susceptibles al desarrollo de fibrosarcomas inducidos por carcinógenos químicos, además de mostrar movilidad reducida en condiciones de inanición (Mariño y cols., 2007), sin que se hayan descrito otras afectaciones fenotípicas. Por otro lado, el modelo de ratón deficiente en *Atg4b* presenta la cabeza inclinada así como movimientos circulares y desplazamiento hacia atrás en condiciones normales (Mariño y cols., 2010). Estos ratones *Atg4b^{-/-}* mostraban un desarrollo anormal de las otoconias, al igual que algunos *Atg5^{-/-}*, lo que conllevó que estos animales presentasen problemas para nadar, flotar y desorientación cuando se les coloca sobre el agua (Mariño y cols., 2010).

Todos estos datos sugieren que la deficiencia total de autofagia es letal para los ratones a las pocas semanas de nacer, mientras que un déficit parcial de autofagia les permite mantener las funciones celulares y su supervivencia no está comprometida. Además, la deficiencia total de autofagia conduce a la acumulación de proteínas anormales, seguida de la generación de cuerpos

de inclusión, que son seña de identidad de multitud de enfermedades neurodegenerativas y trastornos neurológicos severos. Por otro lado, la deficiencia total de autofagia también provoca déficits motores, problemas de equilibrio o deterioro de la conducta, que muestran la afectación de diferentes áreas del cerebro como la corteza, el cerebelo o el hipocampo (Hara y cols., 2006; Komatsu y cols., 2006).

En el caso concreto de *Atg4b* y de *Atg4c*, los niveles de expresión son elevados en el hipocampo, tanto en la región CA (asta o cuerpo de Ammón) como en el en el giro dentado (Figura 5), lo cual puede determinar que la actividad en estas zonas se vea afectada por alteraciones en la vía de la autofagia.

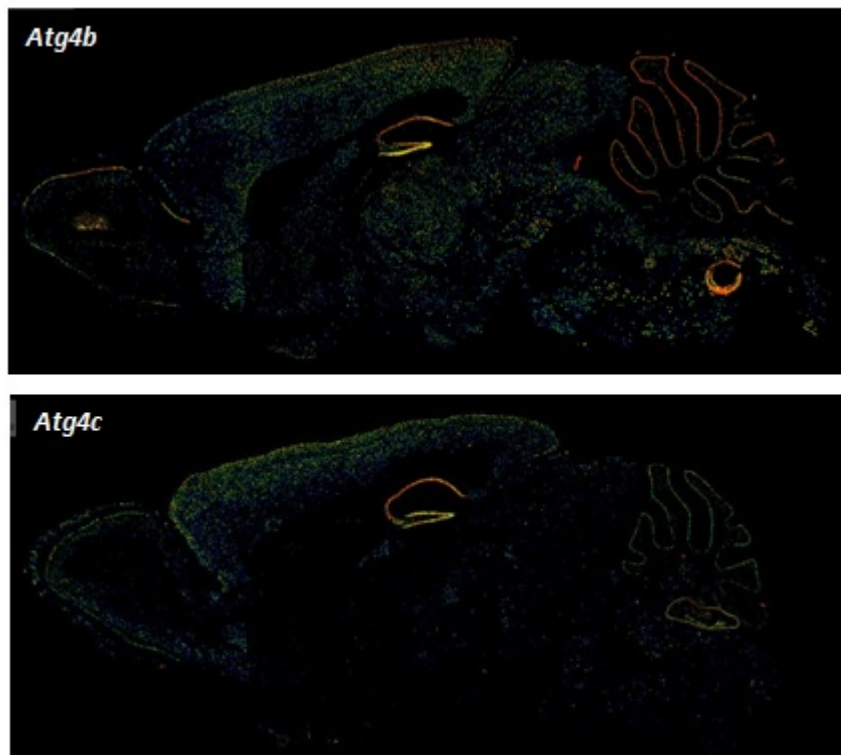


Figura 5. Hibridación *in situ* con sondas antisentido para *Atg4b* y *Atg4c*, en una sección sagital de cerebro de un ratón macho de 56 días de edad. Se observan niveles de expresión de *Atg4b* y *Atg4c* más elevados en el hipocampo. Imagen tomada del Allen Atlas.

Neurogénesis

En la actualidad se sabe que las neuronas están generándose continuamente en el cerebro adulto, especialmente en dos regiones, en la zona subventricular de los ventrículos laterales (SVZ) y en la zona subgranular del giro dentado (SGZ) del hipocampo.

El hipocampo es la estructura cerebral encargada de la orientación (Chadwick y cols., 2015), de la organización de la memoria episódica (Burgess y cols., 2002) y de la discriminación (Schmidt y cols., 2012). Posee un gran número de neuronas con un alto grado de plasticidad, capaces de formar un circuito muy complejo que se va remodelando. Está formado por dos partes imbricadas denominadas asta o cuerno de Ammon (CA, de sus siglas en inglés) y giro dentado. Existe un gran número de células integradas en el giro dentado que forman tres capas claramente diferenciadas: capa granular, capa molecular y capa polimórfica, también llamada hilo o zona

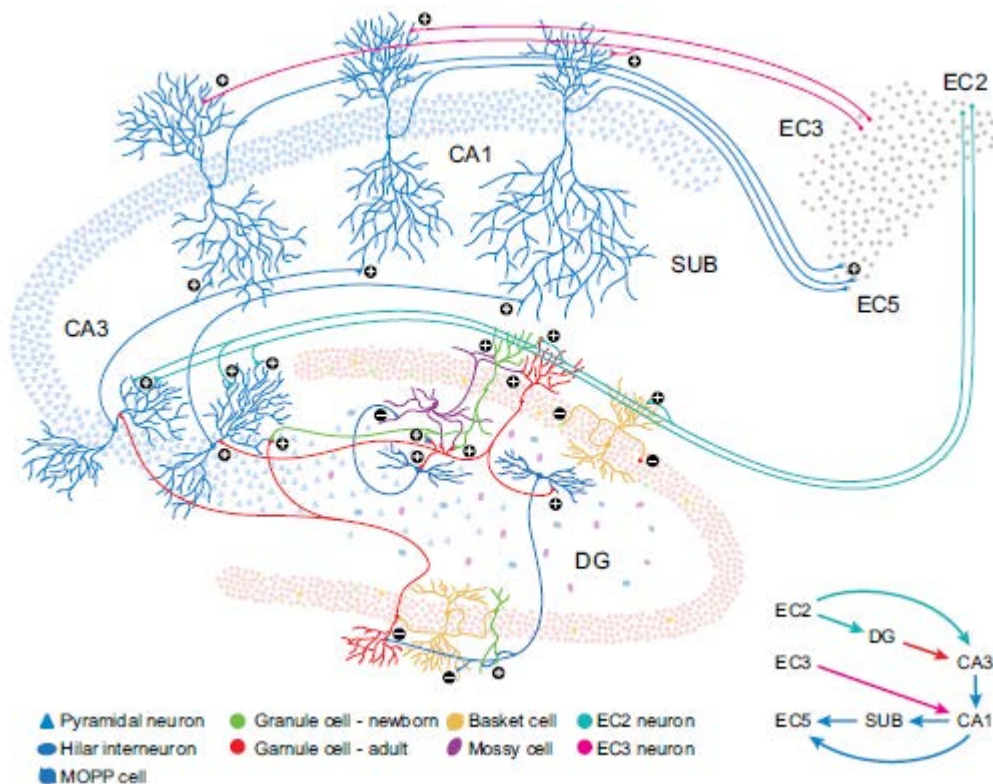


Figura 6. Integración de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo. Existe un gran número de células integradas en el giro dentado que forman un complejo circuito interno con interneuronas inhibitorias y neuronas excitatorias. Imagen tomada de Aimone y cols., 2014.

hilar. Cabe destacar que la primera de ellas está formada por células granulares, las únicas capaces de renovarse a lo largo de la vida, y se caracteriza porque las dendritas de dichas células se extienden perpendicularmente a la capa. Además, sus axones se dirigen hacia la capa polimórfica para contactar con las células piramidales de la región 3 de la CA (CA3) (Figura 6). La interacción entre las diferentes células con factores de crecimiento o con neurotransmisores, induce la expansión de las neuritas y el aumento de la arborización neuronal (Aimone y cols., 2014).

En la SGZ del giro dentado existe una población de células madre que da lugar a progenitores, que se pueden diferenciar tanto en astrocitos como en neuronas. En el caso de las nuevas neuronas, éstas migran distancias muy cortas dentro de la propia capa granular del giro dentado, madurando como neuronas granulares y enviando proyecciones axonales y dendríticas al área CA3 del hipocampo (Lledo y cols., 2006).

En la neurogénesis es importante considerar tres procesos: proliferación, diferenciación celular y supervivencia. Las neuronas tardan, desde que nacen, unos dos meses en madurar, y mientras lo hacen van cambiando morfológica y bioquímicamente (mostrando diferentes proteínas en sus membranas). De esta forma, se pueden identificar y clasificar según la etapa en la que se encuentran. Este periodo de tiempo es muy crítico en el proceso de neurogénesis, ya que no todas las células nuevas sobreviven a la fase de proliferación. Más del 60% pueden sufrir un proceso de muerte celular programada (Sahay y cols., 2011).

La renovación de las neuronas no es un proceso estático o reparador, sino que la neurogénesis adulta responde ante estímulos del entorno o a su estado interno, como las hormonas, los factores de crecimiento, la edad, la realización de ejercicio, el tipo de dieta o el estrés. Cada uno de estos factores ejercen influencia a distintos niveles dentro del proceso neurogénico (Aimone y cols., 2014). Por ejemplo, se sabe que el ejercicio promueve la proliferación de los precursores celulares y que el enriquecimiento ambiental ayuda a la supervivencia de las neuronas recién nacidas, así como a su integración funcional duradera. Un bajo nivel de actividad física dificulta el aumento del número de células, lo que puede conllevar una falta de preparación para proveerse de nuevas neuronas en el futuro. Por el contrario, la actividad física voluntaria estimula la

neurogénesis en el hipocampo, y, en concreto, la acción de correr puede, en cierta medida, revertir la disminución de neurogénesis que se produce en edades avanzadas (Kempermann y cols., 1998). Pero la actividad física por sí sola no es suficiente, ya que no ayuda a que las neuronas recién nacidas sobrevivan y se integren; por eso es también importante el enriquecimiento ambiental. Los ambientes enriquecidos influyen sobre la anatomía y la fisiología del cerebro. Los entornos desafiantes en los que hay cierto componente de novedad, como por ejemplo la incertidumbre de recompensa, son estimulantes cognitivos muy efectivos para dicha supervivencia e integración (Kempermann y cols., 2010).

HIPÓTESIS

Los ejercicios de fuerza y de resistencia pueden tener efectos diferentes sobre el proceso de neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, y la autofagia está implicada en dichos efectos.

OBJETIVOS

Para determinar si la hipótesis es cierta hemos planteado el siguiente objetivo general:

Determinar si es mejor el ejercicio de fuerza o el de resistencia para el proceso de neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

Para llevar a cabo dicho objetivo, nos propusimos los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Aplicar un protocolo de entrenamiento de fuerza y de entrenamiento de resistencia a ratones silvestres y ratones deficientes en *Atg4b*, con alteraciones en la vía autofágica, durante dos periodos diferentes de tiempo: 2 semanas (entrenamiento subcrónico) y 12 semanas (entrenamiento crónico).

Objetivo 2: Analizar los efectos de los entrenamientos del objetivo 1 sobre la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron 48 ratones, todos ellos machos, con fondo genético C57BL6/129Sv, salvajes (*wild type*; Wt, n=24) y deficientes en el gen de la autofagina-1 (*Atg4b*^{-/-}; KO, n=24) de dos meses de edad, generados en el Bioterio de la Universidad de Oviedo y cedidos por el Dr. Carlos López Otín. En cada jaula se alojaron de ocho a diez animales con comida y agua *ad libitum*, bajo condiciones de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ$ C), y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas respectivamente (inicio del periodo de luz a las 08:00 horas).

Test de reconocimiento de objetos

Para realizar el test de reconocimiento de objetos, se utilizó el protocolo propuesto por de Lima y cols., (2005), con algunas modificaciones. El test de comportamiento se realizó durante los tres primeros días del periodo de adaptación al ejercicio y durante los tres primeros días del periodo de evaluación final tras la fase de ejercicio realizado por los animales del entrenamiento subcrónico.

Se colocaron los ratones individualmente en jaulas para ratas de 60 x 38 x 19,5 cm. Antes de realizar el test, todos los animales pasaron por una sesión de adaptación en la que se les dejó explorar libremente, sin la presencia de ningún objeto, durante 5 minutos. Veinticuatro horas después se les colocó en la misma jaula dos objetos de plástico iguales (A1 y A2), en dos esquinas adyacentes y a 10 cm de las paredes. Los animales pudieron explorar la jaula durante 5 minutos y de forma individual (fase de entrenamiento). Hora y media después se realizó un test de memoria a corto plazo, para el que se dejó uno de los objetos ya conocido (A1) y el segundo objeto se cambió por uno nuevo (B), dejándoles explorar otra vez durante 5 minutos. Los objetos A y B presentaron color, textura y tamaño similar, pero forma diferente.

Tanto las jaulas como los objetos se limpiaron con etanol al 10%, cada vez que se comenzaba un test con un animal nuevo. Cada ratón siguió siempre el mismo orden según se estableció, al azar, el primer día, durante el proceso de adaptación, y realizó los test siempre en la misma jaula. Cada uno de estos test fue grabado con una cámara, para su posterior visualización y análisis.

Para determinar si un ratón explora o no el objeto, se considera que éste está interesado cuando apunta con su hocico al objeto, con una separación máxima de 2 cm alrededor de éste. El índice de reconocimiento se calculó mediante la siguiente fórmula: $N_B / (N_{A1} + N_B)$, donde N_{A1} es el número de veces que el ratón se acercó al objeto A1 y N_B es el número de veces que el ratón se acercó al objeto B.

Entrenamiento

Se realizaron dos tipos de entrenamiento, de fuerza y de resistencia, con dos duraciones distintas, doce semanas (entrenamiento crónico; $Wt=12$, $KO=12$) y dos semanas (entrenamiento subcrónico; $Wt=12$, $KO=12$). Todos los ratones comenzaron el entrenamiento con 2 meses de edad.

Periodo de adaptación:

Antes de comenzar los entrenamientos todos los ratones fueron sometidos a diez días de adaptación. Para llevar a cabo el entrenamiento se utilizaron dos estaciones diferentes: una escalera vertical, con diferentes ángulos de inclinación, y una cinta de correr, en la que se puede regular tanto la velocidad como la inclinación. Los ratones fueron divididos en grupos de 4 animales, los cuales realizarían todos los procedimientos a la vez. Los cinco primeros días se les colocó en las dos estaciones de entrenamiento y en una jaula con serrín (estación control) para que las exploraran, y los siguientes cinco días se les enseñó a caminar por la cinta y a subir por la escalera.

Test de evaluación:

Antes y después de realizar el entrenamiento se hizo un test de evaluación (Figura 7). Este test se desarrolló antes de comenzar el entrenamiento (test inicial), para conocer la capacidad de cada ratón en cuanto a la velocidad máxima y fuerza máxima, sin haber hecho ningún tipo de ejercicio previamente. Una vez terminado el periodo de entrenamiento se repitió este test de evaluación. Con el test final se observó si dicha capacidad es mayor tras el entrenamiento.

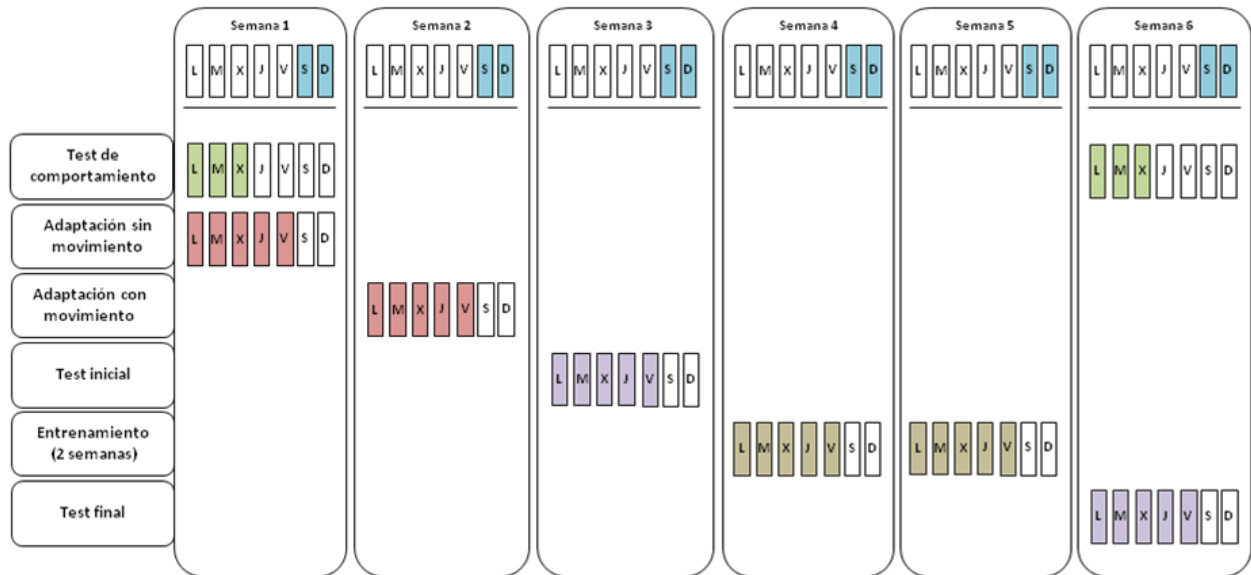


Figura 7. Esquema de los procedimientos llevados a cabo. El esquema muestra el calendario realizado con los ratones que entrenaron durante 2 semanas (entrenamiento subcrónico). Los ratones entrenados durante 12 semanas (entrenamiento crónico) no realizaron las pruebas de comportamiento.

Primero se llevó a cabo el test de resistencia: para ello se colocó a los ratones sobre la cinta y realizaron un calentamiento de 3 minutos sin inclinación y a una velocidad de 10cm/s. Para comenzar con el test se aumentó la inclinación a 10° y se fue incrementando, cada 3 minutos, la velocidad 3,3cm/s. Cuando los ratones comenzaron a agotarse se depositaron de nuevo en su caja uno a uno. Posteriormente se anotó el tiempo que se mantuvieron corriendo y la velocidad máxima a la que finalizaron. Tras el test inicial de resistencia se dejó a los animales 48 horas de descanso para que se recuperaran, antes de llevar a cabo el test de fuerza.

Antes de someter a los ratones al test de fuerza, se realizó previamente un calentamiento de 10 series de 10 escalones (10x10). Se dejó que descansaran 2 minutos y se volvió a repetir una segunda vez. Para comenzar con el test se colocó a los animales en el décimo escalón con 10 g de peso en la cola. Posteriormente se incrementó 5 g el peso en la cola cada vez que lograban alcanzar la parte superior de la escalera, dándoles 2 minutos de descanso entre ascenso y ascenso. A los que no conseguían alcanzar la parte superior se les dio una segunda oportunidad antes de ser excluidos del estudio. A continuación, se anotó el peso máximo con el que consiguieron subir las escaleras.

Período de entrenamiento:

Para comenzar con el entrenamiento, los ratones fueron asignados por sorteo a tres grupos diferentes, constando cada uno de 4 ratones: controles, entrenados en fuerza y entrenados en resistencia. Al tener dos genotipos diferentes, Wt y KO, se trabajó con un total de 6 grupos de animales.

Los controles se colocaron en una jaula nueva para que exploraran libremente, durante el tiempo que entrenaba el resto. El ejercicio realizado por los ratones de fuerza y los de resistencia se fue aumentando de forma paulatina, alternándose con días de descanso (fines de semana), para evitar cualquier tipo de lesión. A los ratones entrenados en resistencia se les fue incrementando tanto la velocidad como el grado de inclinación de la cinta y el tiempo que se mantenían corriendo. A los entrenados en fuerza se les colocó un peso en la cola que se incrementó poco a poco junto con la inclinación de la escalera, el número de escalones a subir y el número de series.

Para calcular tanto la velocidad inicial del entrenamiento de resistencia como la carga inicial en el entrenamiento de fuerza, se tomaron los valores de velocidad máxima y fuerza máxima realizados en el test inicial por el ratón más débil de cada grupo. Posteriormente, se calculó el 50% de la menor velocidad máxima y el 5% de la fuerza máxima menor, y se realizó un protocolo progresivo, para cada uno de los dos entrenamientos, en el que se fue incrementando tanto la velocidad como el peso, respectivamente.

Obtención de tejidos

Los animales que realizaron alguno de los dos tipos de entrenamiento se sacrificaron 48 horas después de haber realizado los test de evaluación final, mientras que los controles se sacrificaron una semana más tarde, para eliminar la posible influencia de esos test. Los animales se sacrificaron por inhalación de CO₂. Se extrajeron los cerebros y se realizó un corte sagital a nivel de la línea media del cerebro, separando ambos hemisferios. El hemisferio derecho se fijó con una solución de paraformaldehído al 4% y del hemisferio izquierdo se extrajeron, con ayuda de una lupa binocular (Leica Microsystems), la corteza, el estriado, el hipocampo y el cerebelo, que se guardaron a -80° C para análisis bioquímicos.

Medida del área del giro dentado

El procesamiento de las muestras para histología se realizó en la Unidad de Histopatología Molecular del IUOPA (Instituto de Oncología del Principado de Asturias). El hemisferio derecho, previamente fijado en paraformaldehído al 4%, se deshidrató dejando la muestra durante 1 hora en una sucesión de alcoholes al 50, 70, 80 y 96%. Posteriormente se pasaron las muestras a etanol al 100% durante 5 horas, y por xilol 5 horas y media. Finalmente, se embebió el tejido en parafina durante 4 horas.

A continuación se realizaron cortes seriados de 4 µm que se introdujeron en una estufa a 55° C durante 1 hora. Después se desparafinaron y se realizó la desenmascaración de los epítomos de forma automatizada en el *PT Link* (Dako) a 95° C y pH 6 durante 20 minutos, utilizando el reactivo *EnVision Flex Target Retrieval Solution, Low pH* (Dako). A continuación se llevó a cabo un pretratamiento con *Sudan Black* para eliminar la autofluorescencia del tejido previo a iniciar la inmunofluorescencia.

Para ello, las muestras se deshidrataron en una batería de alcoholes del 10, 30, 50 y 70%, permaneciendo 10 minutos en cada una de las diluciones. Después se incubaron 10 minutos en una solución saturada de *Sudan Black* en alcohol al 70% (que elimina la autofluorescencia del

tejido), y se volvieron a rehidratar con etanol al 70, 50, 30 y 10% (10 minutos en cada uno). Seguidamente, se realizó un lavado de 10 minutos con agua destilada, otro con PBS 1X (NaCl 136,75 mM; KCl 2,68 mM; Na₂HPO₄ 10,14 mM; KH₂PO₄ 17,6 mM; a pH 7,4) y un último lavado con Tritón 0,1% en PBS de 15 minutos. Una vez finalizado este proceso, las muestras se incubaron en una solución de bloqueo (BSA al 1% y Tritón al 0,1%, ambos en PBS) durante 45 minutos. Por último, se realizaron dos lavados de 10 minutos con agua destilada y se procedió al montaje aplicando *Fluoroshield Mounting Medium with DAPI* (Abcam). Las muestras se guardaron en oscuridad a 4° C. Las imágenes se tomaron con un microscopio automático Olympus BX61 usando los *software* Olympus Optical Co., Ltd 2002 y DP Manager.

Para calcular el área del giro dentado y del hilo, de cada una de las muestras, se utilizó el programa informático ImageJ versión 2.0.0-rc-30.

Análisis estadístico

Para determinar la normalidad de las muestras se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov seguido del test de Shapiro-Wilks. Para las comparaciones entre los genotipos dentro del mismo tipo de entrenamiento se realizó la prueba t de Student para muestras independientes. Para comparar los diferentes entrenamientos entre sí (control, fuerza y resistencia) dentro de cada genotipo, se realizó un test ANOVA de un factor seguido del test *post hoc* de Bonferroni. Por otro lado, para comparar los valores iniciales y finales, dentro del mismo genotipo y del mismo entrenamiento, se utilizó una prueba t de Student para muestras dependientes.

El valor de significación considerado fue $P < 0,05$ y para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS 15.0.

RESULTADOS

Protocolo de entrenamiento

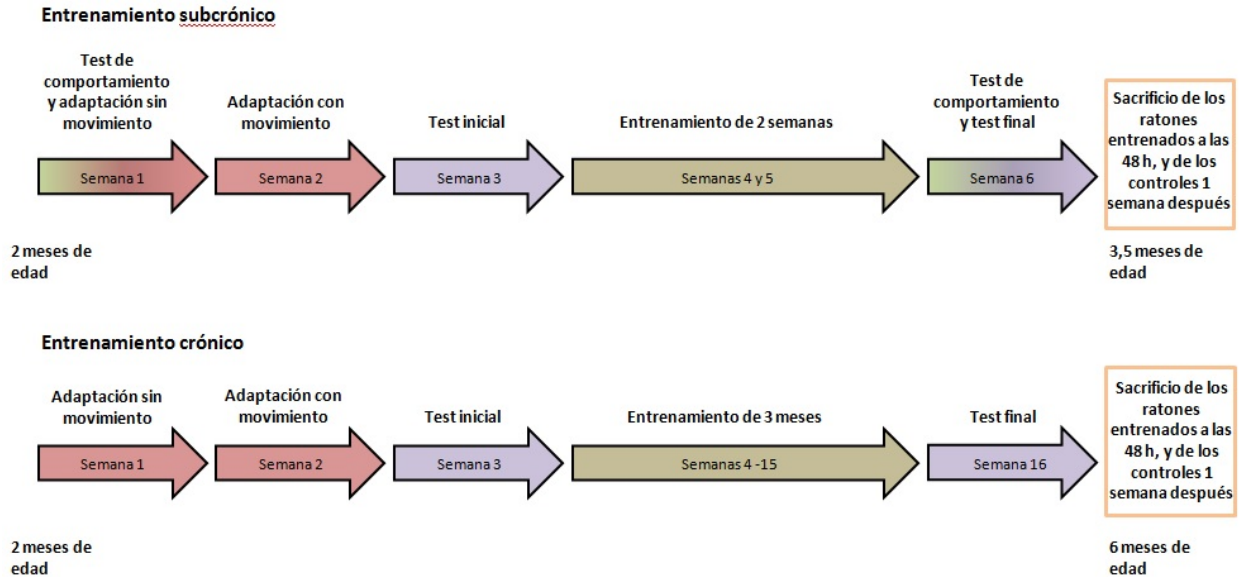


Figura 8. Esquema de los procedimientos llevados a cabo. El esquema muestra el calendario realizado con los ratones que se entrenaron durante 2 semanas (entrenamiento subcrónico) y durante 3 meses (entrenamiento crónico).

Todos los animales comenzaron el protocolo de entrenamiento con 2 meses de edad y se les realizó una adaptación, durante las dos primeras semanas, a las tres estaciones (cinta de correr, escalera y jaula control) donde se iban a realizar tanto las evaluaciones como los entrenamientos. A los ratones que llevaron a cabo el entrenamiento subcrónico (dos semanas de entrenamiento), se les sometió además a un test de comportamiento inicial durante la primera semana de adaptación.

En la tercera semana, todos los ratones fueron sometidos a un test de valoración inicial, para establecer el punto de partida, tanto en sus capacidades para el ejercicio de resistencia (correr en una cinta), como para el ejercicio de fuerza (subir unas escaleras con peso en la cola). Al terminar el periodo de entrenamiento se realizó el mismo test de valoración, para poder así determinar el efecto del ejercicio a lo largo del periodo de entrenamiento. En el caso de los

ratones que realizaron el entrenamiento subcrónico, se les sometió a un test de comportamiento final en la misma semana en la que se realizó el test de evaluación final.

Por tanto, los animales que realizaron el entrenamiento subcrónico terminaron el experimento cuando tenían 3,5 meses de edad, mientras que los animales del entrenamiento crónico finalizaron el experimento a los 6 meses de edad.

Pruebas de evaluación de fuerza y de resistencia

Test de evaluación de fuerza:

Este test nos permite determinar la carga máxima que es capaz de subir el ratón por una escalera, como una representación de su fuerza máxima.

Al comparar las medias de la fuerza máxima de los ratones de ambos genotipos antes de realizar el entrenamiento subcrónico, los animales Wt lograron ascender por la escalera con más peso en la cola que los KO ($54,58 \pm 2,64$ g y $44,16 \pm 2,67$ g, respectivamente; $n=12$, $P=0,011$).

Tras realizar el entrenamiento, los ratones del grupo de fuerza, de ambos genotipos, aumentaron su fuerza máxima con respecto al valor inicial; en concreto, los ratones Wt mostraron un incremento de aproximadamente un 41% ($55,00 \pm 2,04$ g vs $77,50 \pm 5,20$ g; $P=0,018$), mientras que los animales KO lo hicieron aproximadamente en un 60% ($38,75 \pm 5,54$ g vs $58,75 \pm 2,39$ g; $P=0,022$) (Figura 9).

En el caso de los animales que siguieron un entrenamiento crónico de fuerza, los dos genotipos partieron también de valores iniciales de fuerza máxima diferentes, ya que los ratones Wt pudieron cargar con más peso que los KO ($62,91 \pm 2,49$ g vs $45,41 \pm 2,91$ g; $P=0,000$).

El entrenamiento crónico favoreció que los animales Wt del grupo de fuerza aumentaran su fuerza máxima aproximadamente un 72% ($56,25 \pm 6,25$ g vs $95,00 \pm 7,35$ g; $P=0,008$), mientras que los grupos control y resistencia no presentaron cambios significativos (Figura 9). Por otro

lado, los KO ejercitados en fuerza incrementaron su fuerza máxima un 40% ($40,00 \pm 2,04\text{g}$ vs $56,25 \pm 5,15\text{g}$; $P=0,023$) (Figura 9).

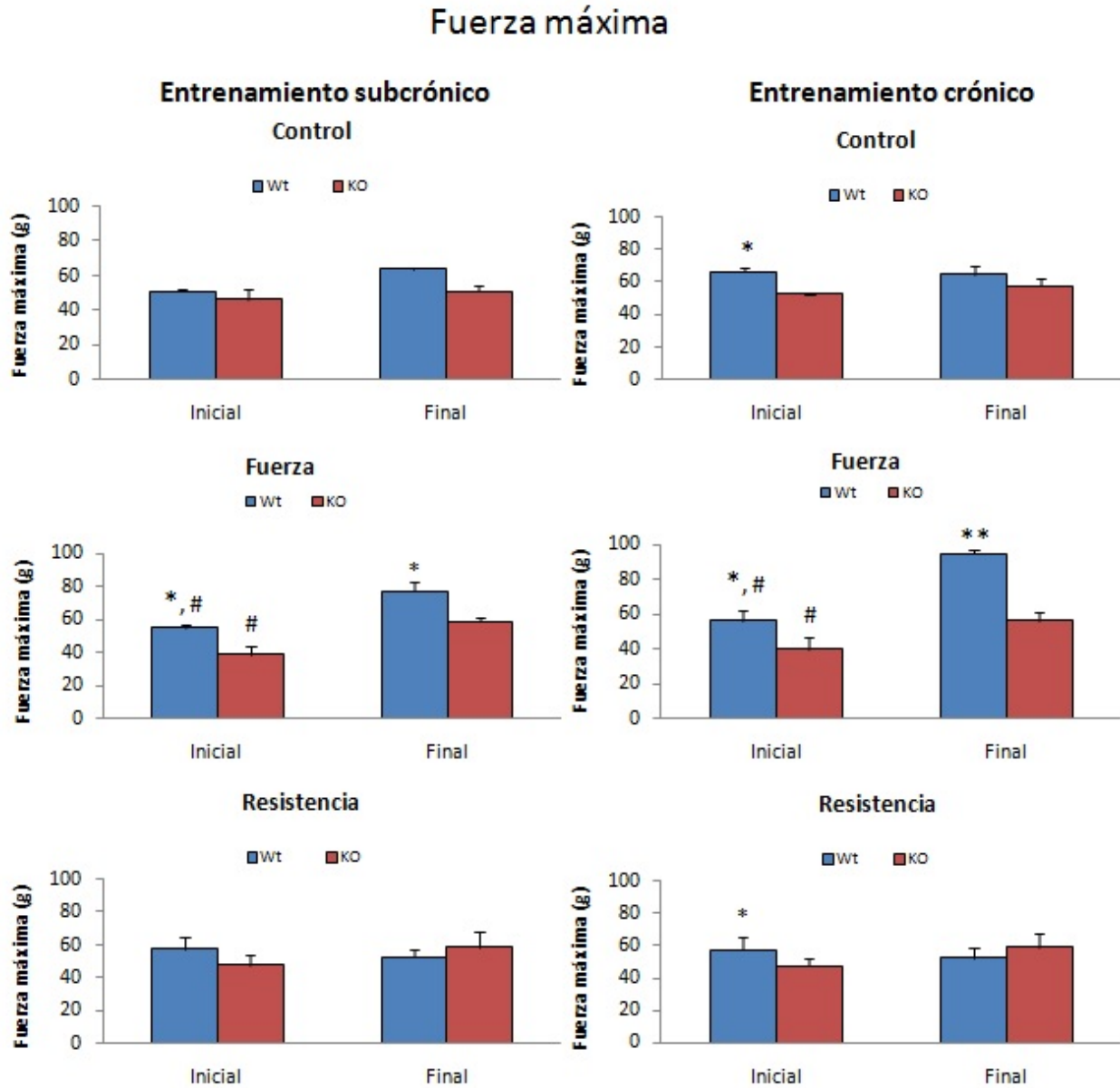


Figura 9: Fuerza máxima ejercida por los ratones de ambos genotipos, antes y después los entrenamientos subcrónico (2 semanas) y crónico (12 semanas). Los datos se representan como media±sem; los datos se analizaron con una prueba t de Student para muestras independientes (*, $P<0,05$; Wt vs KO) y con una prueba t de Student para muestras dependientes (#, $P<0,05$; Inicial vs Final). $N=4$ para cada grupo.

Por lo tanto, el protocolo de ejercicio de fuerza propuesto es eficaz tanto para el entrenamiento subcrónico como para el entrenamiento crónico, ya que ambos genotipos ganan fuerza después del entrenamiento.

Test de evaluación de resistencia:

Este test permite evaluar la velocidad máxima que puede soportar un ratón al correr sobre una cinta. Al incrementarse la velocidad de la cinta de forma escalonada (3,3 cm/s cada 3 min), como medida de valoración se tomó la distancia recorrida por cada ratón.

Al analizar las medias de la distancia recorrida de los ratones de ambos genotipos, antes y después del entrenamiento de resistencia, todos los ratones de los grupos de resistencia, tanto subcrónico como crónico, aumentaron la distancia recorrida de manera significativa (Figura 10).

En el caso de los ratones Wt que realizaron el entrenamiento de resistencia subcrónico, la distancia recorrida final fue un 48% mayor que la inicial (708,04±66,22 m vs 1049,99±98,93 m respectivamente; $P=0,002$), y los animales KO aumentaron la distancia un 45% (596,19±23,58 m vs 869,15±64,38 m; $P=0,014$).

Por otro lado, los animales entrenados de forma crónica, también mejoraron la distancia recorrida tras finalizar el entrenamiento, y esa mejoría fue notablemente superior en los ratones Wt (115%; 485,88±31,41 m vs 1043,31±126,71 m; $P=0,033$), en comparación a la observada en los animales KO (53%; 691,60±50,34 m vs 1056,27±100,23; $P=0,056$) de la misma edad, si bien en este caso las diferencias no llegan a ser significativas (Figura 10).

Además, tanto los ratones que llevaron a cabo el entrenamiento de fuerza (subcrónico y crónico) como los controles no mostraron diferencias significativas (Figura 10).

Por lo tanto, el entrenamiento de resistencia permite incrementar la distancia recorrida, consiguiéndose mejores resultados tras un entrenamiento de tipo crónico (en este caso de doce semanas de duración), en comparación con uno subcrónico (de dos semanas de duración). Las diferencias más evidentes han sido sobre todo en el caso de los ratones Wt.

Distancia

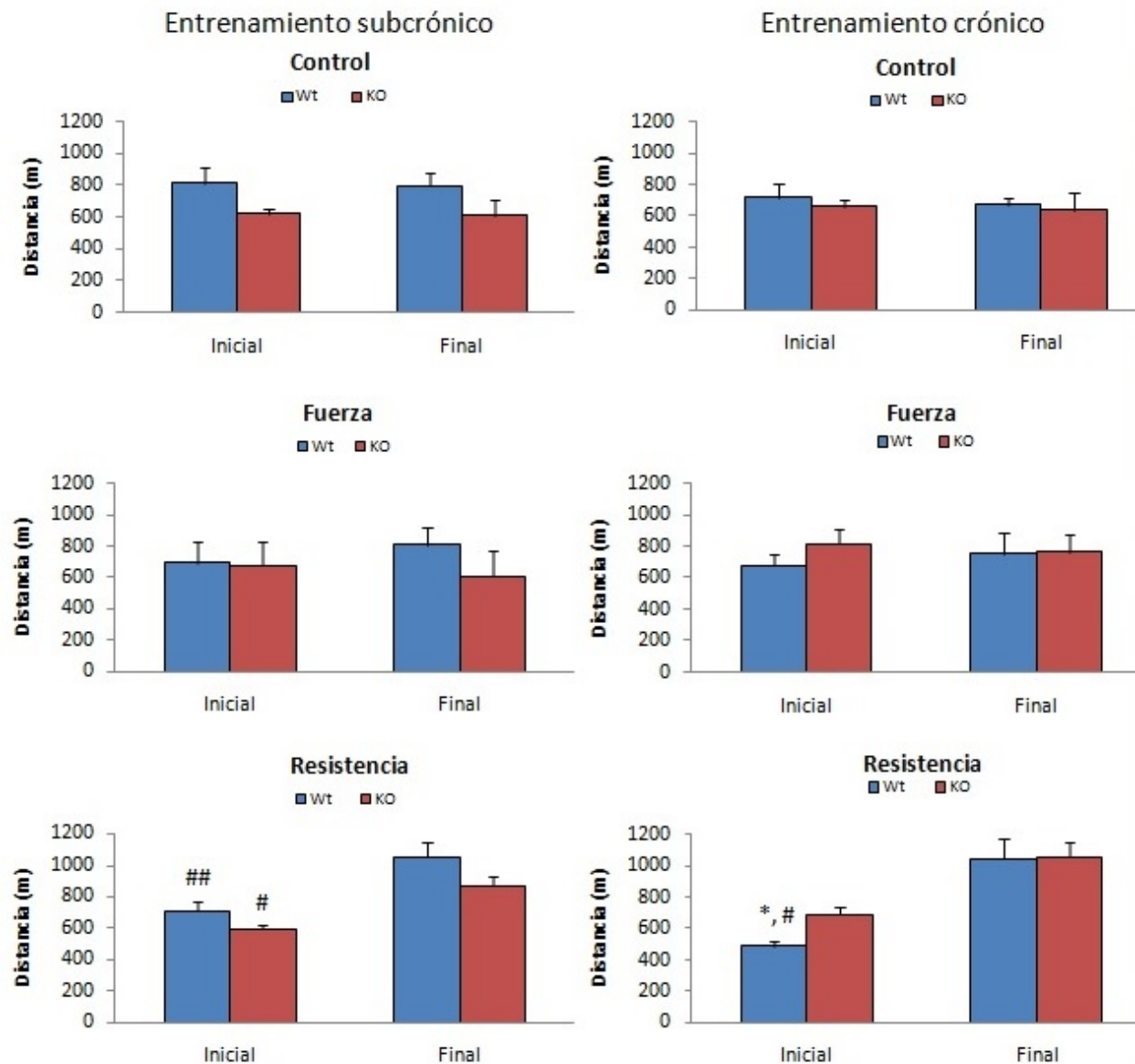


Figura 10: Distancia máxima recorrida por los ratones de ambos genotipos, antes y después de los entrenamientos subcrónico (2 semanas) y crónico (12 semanas). Los datos se representan como media±sem; los datos se analizaron con una prueba t de Student para muestras independientes (*, $P < 0,05$; Wt vs KO) y con una prueba t de Student para muestras dependientes (#, $P < 0,05$; Inicial vs Final). N=4 para cada grupo.

Test de reconocimiento de objetos

El test de reconocimiento de objetos permite determinar la capacidad de discriminación de los ratones entre dos objetos diferentes, sirviendo además como factor de determinación de la memoria a corto plazo de estos animales.

Este test se realizó únicamente a los ratones que han seguido el entrenamiento subcrónico. Se analizó el número de veces (N) que los ratones interactuaban con el objeto A1 (objeto conocido) y con el objeto B (objeto nuevo), pudiendo calcular el índice de reconocimiento ($N_B / (N_{A1} + N_B)$).

El índice de reconocimiento en todos los casos ha presentado una gran variabilidad en cada uno de los grupos analizados, por lo que no se han podido obtener resultados concluyentes (Figura 11). Por lo tanto, sería necesario aumentar el número de animales para realizar este tipo de procedimiento.

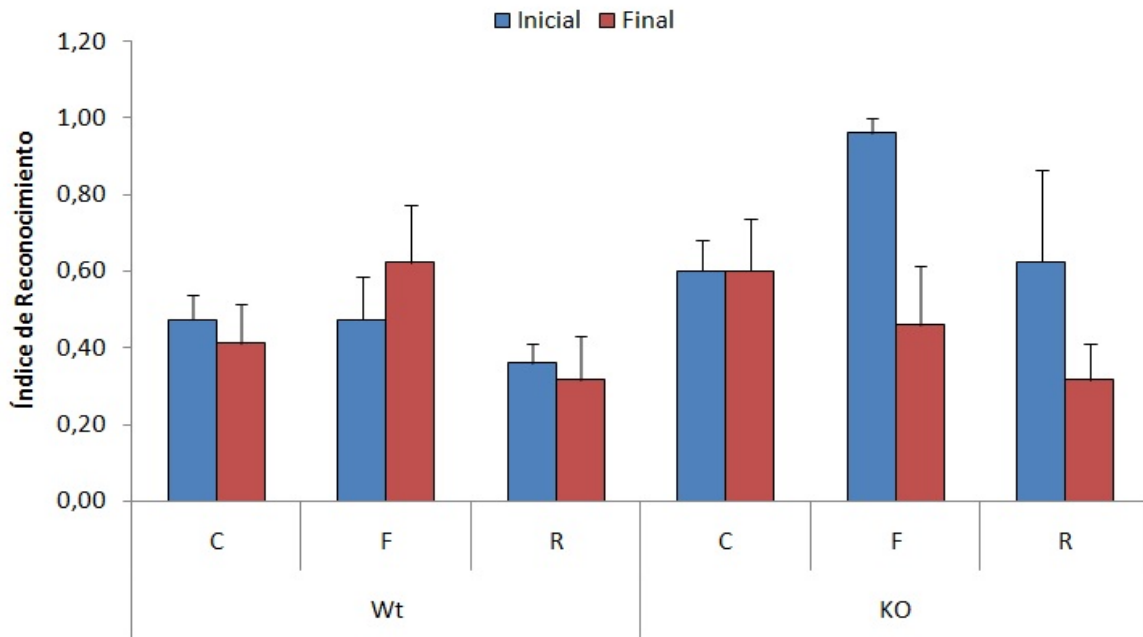


Figura 11: Memoria a corto plazo de los ratones de ambos genotipos, antes y después del entrenamiento subcrónico (2 semanas). El índice de reconocimiento indica el número de veces que el ratón se ha fijado en el objeto nuevo respecto a los dos objetos que había en la jaula. Los datos se representan como media \pm sem; para el análisis de los datos se realizó una prueba t para muestras independientes (Wt vs KO) y una prueba t para muestras dependientes (Inicial vs Final). N=4 para todos los genotipos; C=control, F=fuerza, R=resistencia.

Medición del área del giro dentado del hipocampo

Para analizar la neurogénesis en los distintos grupos de animales hemos medido el área del giro dentado, ya que en la zona subgranular de esta estructura es donde tiene lugar la formación de nuevas neuronas que se incorporarán a la capa granular.

Los animales que realizaron el entrenamiento subcrónico fueron sacrificados a los 3,5 meses de edad. En este grupo de animales los ratones Wt no mostraron diferencias con respecto a las áreas de sus giros dentados (Figura 12; izquierda).

Sin embargo, los ratones deficientes en *Atg4b* presentaron una reducción significativa en esta región en los grupos de ejercicio de fuerza y ejercicio de resistencia, con respecto al grupo de animales que no entrenó: entrenamiento fuerza: $3,81 \pm 0,40 \mu\text{m}^2$ vs controles $5,79 \pm 0,37 \mu\text{m}^2$; $P=0,043$; entrenamiento resistencia: $4,15 \pm 0,33 \mu\text{m}^2$ vs controles $5,79 \pm 0,37 \mu\text{m}^2$; $P=0,015$, (Figura 12; izquierda).

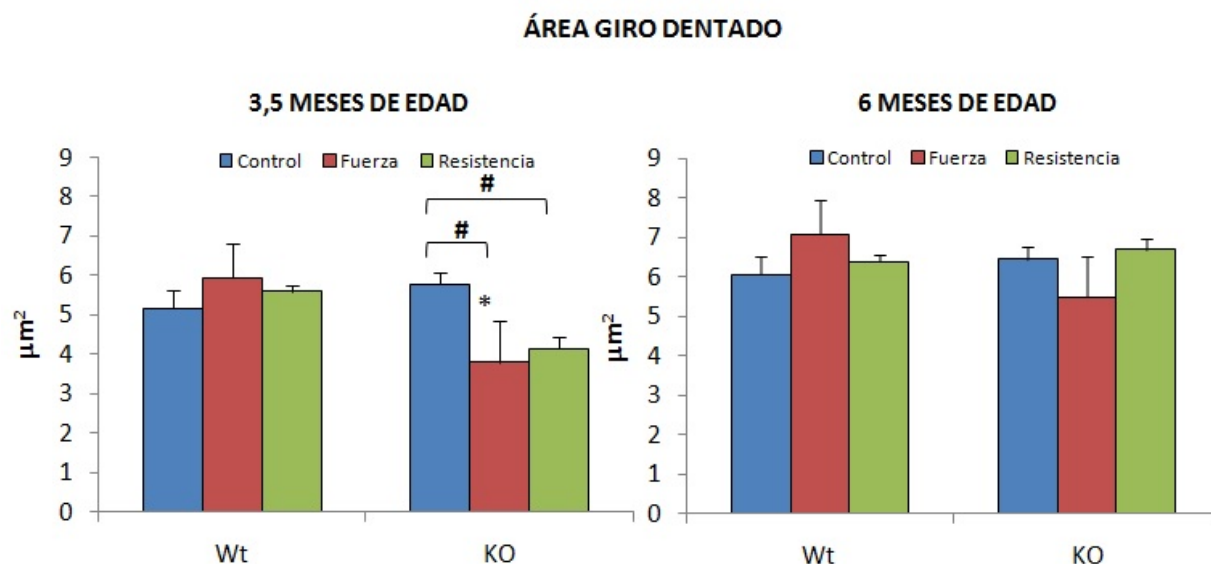
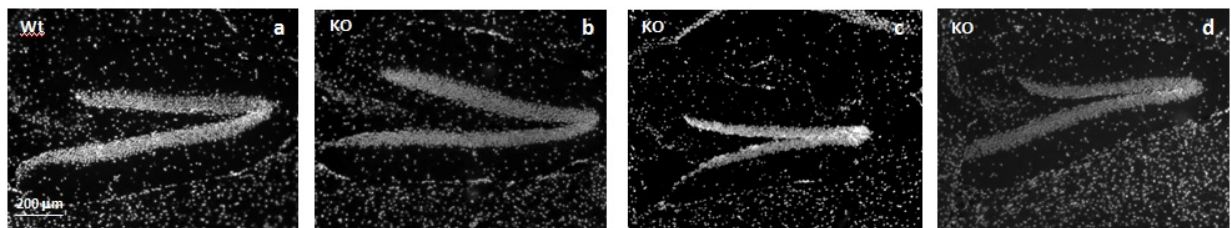


Figura 12: Áreas del giro dentado. Los datos se representan como media±sem; los datos se analizaron con una prueba t de Student para muestras independientes (*, $P<0,05$; Wt vs KO) y con una prueba ANOVA de un factor seguido por el *post hoc* Bonferroni (#, $P<0,05$; factor: entrenamiento). N=4 para todos los grupos.

Los ratones que realizaron el entrenamiento crónico fueron sacrificados a los 6 meses de edad. En este caso, ninguno de los genotipos presentó diferencias en el área del giro dentado en ninguna de las condiciones estudiadas (Figura 12; derecha).

Al observar al microscopio de fluorescencia el giro dentado de cada uno de los ratones, para obtener fotografías y poder calcular las áreas, se pudo observar que los giros dentados de algunos ratones *Atg4b*^{-/-} de 3,5 meses y de 6 meses de edad presentaban una morfología anormal, con un giro dentado “cerrado”. Esta alteración en la morfología del giro dentado no se ha observado en todos los ratones KO, ya que sólo se ha visto en el 25% de los animales (2 ratones del experimento crónico y 4 ratones del experimento subcrónico; n=24; Figura 13).

3,5 MESES DE EDAD



6 MESES DE EDAD

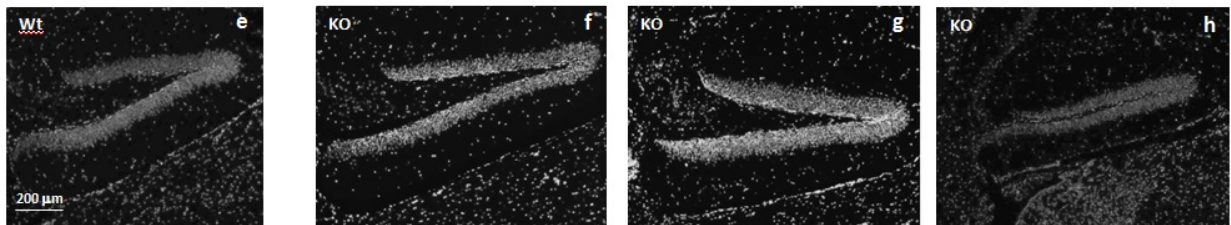


Figura 13. Imágenes representativas de giros dentados, de los ratones *Atg4*^{-/-}. Se observa cómo algunos de los giros dentados en los ratones KO, de ambas edades, presentan los brazos muy próximos, dejando un pequeño espacio correspondiente a la capa polimórfica o zona hilar (imágenes c y d) o prácticamente ningún espacio (h). Núcleos marcados con DAPI.

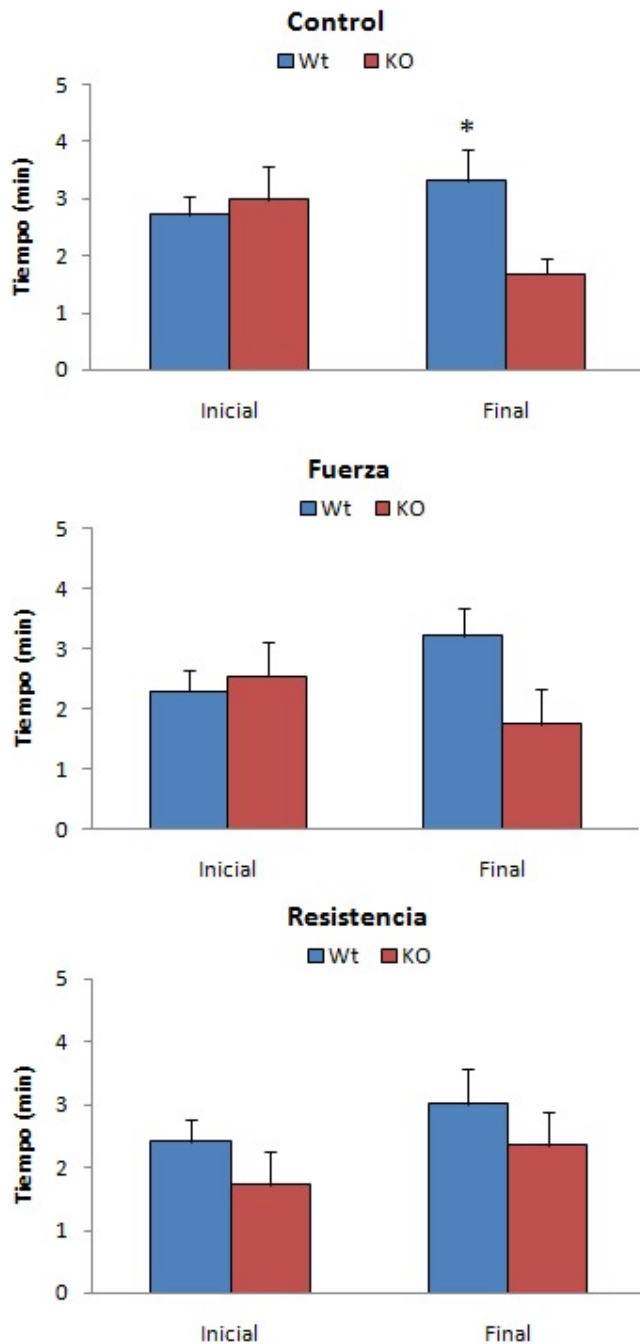


Figura 14: Comportamiento exploratorio en campo abierto. Los ratones estuvieron cinco minutos explorando la jaula. Se midió el tiempo que estaban en movimiento. Los datos se representan como media±sem; los datos se analizaron con una prueba t de Student para muestras independientes (*, $P < 0,05$; Wt vs KO) y con una prueba t de Student para muestras dependientes (#, $P < 0,05$; Inicial vs Final). N=4 para cada grupo.

Test de campo abierto

En vista de los resultados anteriores, donde se pudo observar que algunos ratones *Atg4b*^{-/-} presentaban anomalías en el giro dentado, decidimos revisar los vídeos grabados para la realización de los test de reconocimiento de objetos.

Se visualizaron los vídeos en los que los animales exploraban la jaula con dos objetos iguales (A1 y A2) y se midió el tiempo que permanecían en movimiento, obteniendo una medida del tiempo ambulatorio.

En la Figura 14 se observa que, tras el entrenamiento subcrónico, los animales Wt control presentaron un tiempo ambulatorio mayor al final del procedimiento con respecto a los ratones KO (Wt control $3,31 \pm 0,55$ min vs KO control $1,68 \pm 0,27$ min; $P = 0,038$). En el caso de los ratones de los grupos de fuerza, este incremento se muestra como una tendencia, al no presentar diferencias significativas (Wt fuerza $3,22 \pm 0,46$ min vs KO fuerza $1,74 \pm 0,60$ min; $P = 0,098$).

Además, los ratones KO tanto del grupo control como del grupo de fuerza, estuvieron menos tiempo explorando después del periodo de entrenamiento con respecto al tiempo ambulatorio inicial (un 43% y un 31% menos, respectivamente; $P < 0,1$).

Sin embargo, los ratones KO que entrenaron resistencia no mostraron diferencias en el comportamiento entre las valoraciones inicial y final ($P = 0,545$).

Por lo tanto, la duración de la exploración presenta una tendencia a aumentar, a la vista de los datos de los animales Wt control y los entrenados en fuerza desde los 2 meses de edad, a la que comenzaron a entrenar, hasta los 3,5 meses de edad, momento en el que fueron sacrificados. Los ratones KO en cambio, exploraron menos tiempo a los 3,5 meses que a los 2 meses de edad, a excepción de los que realizaron el entrenamiento de resistencia.

DISCUSIÓN

El ejercicio físico presenta una serie de beneficios que pueden aplicarse para tratar diferentes tipos de patologías. La prescripción adecuada de ejercicio supondría una gran ventaja frente a otro tipo de tratamientos, como por ejemplo farmacológicos, en enfermedades crónicas, puesto que no tendría efectos secundarios graves y la inversión económica sería baja (Fiuza-Luces y cols., 2013).

Sin embargo, la prescripción de ejercicio más adecuada para cada situación debe realizarse en base a la patología concreta y al efecto potencial que el ejercicio tendría sobre ella. Por lo tanto, es necesario conocer la respuesta del organismo al ejercicio.

Tanto el ejercicio de resistencia como el ejercicio de fuerza regulan diferentes vías metabólicas que implican a proteínas tan importantes como AMPK y mTOR, respectivamente (Hawley, 2009; He y cols., 2012a, b; Lira y cols., 2013), y ambos son reguladores imprescindibles de la vía autofágica.

Los estudios que analizan los efectos del ejercicio sobre la autofagia, en modelos animales, se basan en el ejercicio de resistencia. En estos casos, los animales corren en una rueda que tienen disponible en su jaula de forma voluntaria (Lira y cols., 2013; Zhang y cols., 2013), o bien siguen un protocolo de entrenamiento (He y cols., 2012b). Sin embargo, no hay estudios que analicen el efecto del ejercicio de fuerza sobre la ruta autofágica.

Además, los trabajos se centran en los efectos del ejercicio sobre el músculo esquelético, aunque el ejercicio tiene influencia más allá de este tejido. De hecho, el ejercicio de resistencia juega un papel importante en el proceso de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (van Praag y cols., 1999; Kempermann y cols., 2010).

Por lo tanto, el estudio de los efectos del ejercicio, tanto de fuerza como de resistencia, sobre un modelo de ratón con una deficiencia parcial en autofagia, como es el ratón *Atg4^{f/-}*, permite valorar la implicación de la autofagia tanto en el ejercicio como en la neurogénesis.

Para llevar a cabo este trabajo, se partió de los experimentos iniciales del Dr. Benjamín Fernández y Álvaro Fernández. Ambos pusieron a punto un protocolo de entrenamiento crónico

(de doce semanas de duración) en un grupo de ratones *Wt* y de ratones *Atg4b^{-/-}*, que realizaron ejercicio de fuerza y ejercicio de resistencia. Posteriormente, se realizó otro protocolo de entrenamiento subcrónico, con un periodo de duración más corto (dos semanas). Esto nos permitió incorporar un test de comportamiento para completar el estudio.

Los protocolos de ejercicio que se aplicaron en este trabajo tuvieron un carácter progresivo, donde tanto la fuerza como la resistencia fueron incrementadas de forma paulatina con el paso del tiempo de entrenamiento. Por lo tanto, los ratones que realizaron un entrenamiento crónico no sólo realizaron ejercicio durante más tiempo, sino que además la intensidad del mismo fue mayor con respecto al ejercicio realizado por los animales del entrenamiento subcrónico.

Antes de comenzar el entrenamiento, los ratones fueron sometidos a un test de valoración inicial, para establecer el punto de partida tanto en sus capacidades para el ejercicio de resistencia (correr en una cinta) como para el ejercicio de fuerza (subir unas escaleras con peso en la cola). Al terminar el periodo de entrenamiento se realizó el mismo test de valoración, para poder así determinar el efecto del ejercicio a lo largo del periodo de entrenamiento.

Los resultados obtenidos indican que el protocolo de fuerza y el protocolo de resistencia fueron eficaces en ambos entrenamientos. Sin embargo, los grupos de ratones estudiados, *Wt* y *Atg4b^{-/-}*, no respondieron de la misma manera. En el caso de los ratones *Wt*, a mayor tiempo de entrenamiento, mayor es la fuerza que pueden desarrollar y mayor es la distancia recorrida al final del mismo.

Sin embargo, la ganancia de fuerza que experimentan los animales *Atg4b^{-/-}* es diferente en función del tiempo de entrenamiento. Mientras que con el entrenamiento subcrónico los ratones *Atg4b^{-/-}* ganan más fuerza que los *Wt* (60% vs 41%, respectivamente), tras el entrenamiento crónico la ganancia de fuerza es mayor en los *Wt* que en los *Atg4b^{-/-}* (72% vs 40%, respectivamente). Puede que la diferencia en los efectos del ejercicio de fuerza, en los ratones *Atg4b^{-/-}*, esté asociada a la edad que tienen los animales cuando finalizan el entrenamiento crónico (6 meses) más que al propio entrenamiento. Esto podría deberse a que la deficiencia parcial de autofagia que presentan tenga aún más importancia a medida que el ratón envejece, ya que el proceso autofágico disminuye con la edad (Mariño y López-Otín, 2008). Así, los ratones

que realizaron el entrenamiento subcrónico fueron valorados en el test final cuando tenían 3,5 meses de edad, mientras que los del entrenamiento crónico terminaron el experimento con 6 meses de edad, aún cuando todos los animales empezaron los entrenamientos a los 2 meses de edad.

El entrenamiento de fuerza parece que no ayuda a mejorar la distancia recorrida, lo que podría deberse a que el ejercicio de fuerza y de resistencia interfieren uno sobre otro, al activar diferentes vías metabólicas (Hawley, 2009). A su vez, esto podría influir de manera especial en los *Atg4b*^{-/-}, ya que el ejercicio de fuerza podría intensificar el déficit de autofagia que poseen estos animales, al activar a mTOR (inhibidor de la autofagia). Por todo ello, sería interesante realizar estudios bioquímicos para comprobar los niveles de mTOR y AMPK que poseen los ratones antes y después de cada uno de los entrenamientos. Esto podría llevarse a cabo en diferentes tejidos, como músculo esquelético y distintas zonas del cerebro, y determinar la influencia del ejercicio, a nivel molecular, sobre el déficit parcial de autofagia.

Los niveles de expresión de *Atg4b*^{-/-} en el cerebro son más elevados en el hipocampo, tanto en las regiones CA como en el giro dentado. Por tanto, un déficit en esta zona del cerebro podría implicar alteraciones en el proceso de neurogénesis de la SGZ del giro dentado de los ratones deficientes en esta proteína. Las nuevas neuronas que se incorporan a la capa granular del giro dentado son las receptoras de los nuevos recuerdos, estando además implicadas en la discriminación de objetos que visualmente son similares (Aimone y cols., 2014). Por esta razón, decidimos realizar un test de reconocimiento de objetos antes de comenzar el entrenamiento subcrónico y repetir la prueba después, con el fin de valorar el efecto del ejercicio a este nivel. Dos semanas de ejercicio, como el que se realizó en el entrenamiento subcrónico, son suficientes para inducir el proceso de neurogénesis (van Praag y cols., 1999).

Sin embargo, no hemos podido obtener datos concluyentes a este nivel, debido a la gran variabilidad en los datos dentro de cada genotipo y grupo de entrenamiento. Como este dato es fundamental para el estudio, se decidió realizar el entrenamiento subcrónico a un nuevo grupo de animales (n=4 por grupo), para obtener un número final de 8 animales, y poder así tratar de reducir esta variabilidad. El aumento del número de animales por grupo permite reducir factores que influyen sobre el comportamiento de los ratones, como puede ser la jerarquía entre los

animales que conviven en la misma jaula (Crawley, 2008). También sería necesario completar la batería de pruebas de comportamiento para evaluar el papel del hipocampo en estos animales. Uno de los test más utilizados es el *Morris watermaze*, que permite determinar el aprendizaje, la orientación espacial, la memoria de trabajo y la memoria a corto y largo plazo. En este test, los ratones se colocan en una piscina con una plataforma y tienen que aprender su localización, en base a referencias externas, para más tarde localizarla cuando se oculta (Crawley, 2008). Sin embargo, realizar esta prueba en los animales *Atg4b*^{-/-} no es lo más adecuado debido a que se han descrito alteraciones en las otoconias de estos animales, por lo que presentan alteraciones en el equilibrio (Mariño y cols., 2010). Otro test que sí podrían realizar estos ratones es la prueba de Barnes, que es una modificación de la prueba de Morris, pero donde los elementos aversivos son la luz o el ruido, en lugar del agua (Crawley, 2008).

Estas baterías de test de comportamiento permitirían comprender el papel de los entrenamientos de fuerza y resistencia sobre diferentes aspectos regulados por el hipocampo y la influencia de la autofagia en estos procesos.

Una vez que hemos determinado que los entrenamientos subcrónico y crónico han tenido el efecto esperado en cuanto a la ganancia de fuerza o resistencia en todos los grupos de ratones entrenados, analizamos el nivel de neurogénesis en el giro dentado de estos animales. Para realizar ese estudio, se hicieron una serie de inmunofluorescencias en secciones sagitales del cerebro de los ratones de ambos tipos de entrenamiento. Para ellas se utilizaron diferentes marcadores de distintas fases dentro del proceso de neurogénesis. Sin embargo, una aproximación más rápida es la medición del volumen del giro dentado del hipocampo (van Praag y cols., 1999). Por ello, a partir de las primeras secciones sagitales obtenidas, se calculó el área del giro dentado.

Los ratones que realizaron el entrenamiento subcrónico fueron sacrificados a los 3,5 meses de edad. En estos animales, el área del giro dentado de los ratones Wt que realizaron entrenamiento, tanto de fuerza como de resistencia, no mostró cambios significativos con respecto a los animales control. Sin embargo, los ratones *Atg4b*^{-/-} que realizaron ejercicio mostraron un área del giro dentado menor que la de los animales del grupo control. Este resultado fue inesperado, ya

que en todo caso se esperaría lo mismo que lo observado en los ratones *Wt*, es decir, que no haya cambios.

Por otro lado, los ratones que realizaron el entrenamiento crónico fueron sacrificados a los 6 meses de edad. En este caso, no se observaron diferencias en las áreas del giro dentado en ninguno de los dos genotipos ni en ninguno de los grupos de entrenamiento.

Al obtener las imágenes en el microscopio, observamos que la región del giro dentado estaba alterada en algunos de los ratones *Atg4b^{-/-}*. De hecho, un 25% de los animales *Atg4b^{-/-}*, del total de ratones utilizados en los dos entrenamientos (n=24), mostró anomalías morfológicas en el giro dentado, de tal manera que esta zona del hipocampo aparecía más cerrada que en el resto de animales.

Esto afectó a los resultados obtenidos en el área del giro dentado, puesto que la distribución de los animales con el giro dentado anómalo no fue homogénea entre los diferentes grupos de estudio. De los cuatro ratones *Atg4b^{-/-}* que presentaban alteraciones en los animales de entrenamiento subcrónico, dos ratones estaban en el grupo de fuerza y dos en el de resistencia, mientras que todos los ratones del grupo control tenían el giro dentado normal.

De la misma forma, de los doce animales *Atg4b^{-/-}* que realizaron el entrenamiento crónico, sólo dos presentaron un giro dentado anómalo, y ambos formaron parte del grupo de fuerza. Esto podría explicar que el área media en este grupo sea más baja y que el error estándar sea mayor (Figura 12).

Estas diferencias podrían indicar que los ratones *Atg4b^{-/-}* que han hecho ejercicio muestran un menor número de núcleos en la capa granular del giro dentado, lo cual iría en contra de nuestra hipótesis. Sin embargo, es probable que no se deban realmente a los efectos del ejercicio, sino a que varios de los ratones *Atg4b^{-/-}* presentaban una morfología del giro dentado anómala. En cualquier caso, al no haber ningún animal *Atg4b^{-/-}* con esta morfología en el grupo control, aún no podemos descartar ninguna posibilidad: que sea un efecto del ejercicio o que sea un efecto la deficiencia en *Atg4b^{-/-}*.

Hasta el momento no se habían descrito en la literatura alteraciones morfológicas en el giro dentado en ratones deficientes en *Atg4b*^{-/-}. Este “cierre” del giro dentado implica también la reducción, o incluso la pérdida, de la capa polimórfica, situada justo por debajo de la capa granular.

En los estudios publicados previamente sobre los efectos de la supresión de las autofaginas, si bien se describen algunas alteraciones en el cerebro, como acumulación de ubiquitina y apoptosis (Hara y cols., 2006; Komatsu y cols., 2006; Mariño y cols., 2010), en ningún caso se había descrito esta morfología en el giro dentado, ni una disminución de la capa polimórfica o zona hilar.

Si estas alteraciones en el hipocampo se deben a la deficiencia en *Atg4b*^{-/-}, sería interesante realizar un estudio a largo plazo mediante resonancia magnética, para poder seguir la evolución de la morfología del hipocampo a medida que crece el ratón, a fin de saber si esta morfología alterada ocurre desde edades muy tempranas y si va empeorando a lo largo de la vida de los ratones *Atg4b*^{-/-}. Además, esto permitiría establecer grupos de ejercicio más homogéneos, pudiendo realizar estudios de ejercicio con grupos de ratones *Atg4b*^{-/-} sin alteraciones en el hipocampo y grupos con ratones con el hipocampo anómalo.

No hemos encontrado ningún estudio que describa una morfología como la observada a nivel del giro dentado. Sin embargo, el “cierre” del giro dentado implicaría la disminución, o incluso pérdida, de la capa polimórfica situada entre los dos brazos del giro dentado. La degeneración de la capa polimórfica suele ser característica de patologías como la epilepsia y el accidente cerebrovascular, fundamentalmente debido a que las células de la capa granular del giro dentado están hiperexcitadas, a consecuencia de la pérdida de las aferencias de las neuronas localizadas en la capa polimórfica (Jinde y cols., 2012).

La pérdida masiva de células musgosas presentes en la capa polimórfica provoca una hiperexcitación de las células granulares que, según los estudios de Jinde y cols. (2012), produce una alteración de la discriminación de contexto y un incremento de la ansiedad. Para comprobar si los ratones *Atg4b*^{-/-} mostraban un comportamiento asociado a la ansiedad, partimos de los vídeos grabados para el test de reconocimiento de objetos.

La ansiedad se caracteriza por un estado de excitación sostenida, vigilancia y aprensión, que produce patrones específicos de comportamiento defensivo (Tovote y cols., 2015). Para evaluar el estado de ansiedad en modelos animales, se pueden utilizar diferentes técnicas entre las que se encuentra el test *open field*, o prueba de campo abierto, que permite observar el comportamiento exploratorio de los ratones. Gracias a este test se pueden detectar estados de ansiedad, si el animal explora los extremos de la jaula pegado siempre a las paredes, sin atreverse a desplazarse por el centro de la misma, o incluso de depresión, si permanece la mayor parte del tiempo quieto en alguna de las esquinas.

Los resultados obtenidos en cuanto al tiempo ambulatorio mostraron que, si bien no son significativos, el tiempo ambulatorio es menor en los animales *Atg4b*^{-/-} al final del experimento, cuando tenían 3,5 meses de edad, mientras que los ratones que entrenaron resistencia no experimentaron dicho descenso. Así, es posible que el déficit parcial de autofagia que presentan los ratones *Atg4b*^{-/-} afecte a las regiones del cerebro implicadas en este tipo de comportamiento. Sin embargo, sería necesario incorporar los resultados del nuevo grupo de animales que estamos realizando actualmente para determinar si existe un efecto a este nivel. Además, también estamos procesando animales *Atg4b*^{-/-} de 12 meses de edad, para saber si las alteraciones que vemos en el hipocampo son específicas de estas camadas o bien estaban presentes en animales de más edad y que nunca han realizado ejercicio.

Las alteraciones morfológicas que hemos observado en el hipocampo de los ratones *Atg4b*^{-/-} puede que no sólo afecten al hipocampo dorsal, que es la zona que aparece en las secciones sagitales con las que hemos estado trabajando. Profundizando más en el cerebro aparecería el hipocampo ventral. Está descrito que el hipocampo en los ratones puede dividirse en dos regiones: dorsal y ventral (Bannerman y cols., 2003). El hipocampo dorsal desarrolla funciones principalmente cognitivas, mientras que el hipocampo ventral está relacionado con el estrés, la emoción y el afecto (Fanselow y Dong, 2010). Por lo tanto, sería interesante analizar también la zona ventral del hipocampo en estos animales y ver si esta zona presenta algún tipo de alteración. Algunos estudios sugieren que el hipocampo no debe estudiarse como una región única, sino que hay que analizar cada región por separado, puesto que pueden degenerar de forma diferente (Fúster-Matanzo y cols., 2011). Además, incluso existe una expresión génica diferente en cada

una de las regiones, lo cual apoya aún más el hecho de que sus funciones no sean las mismas (Fanselow y Dong, 2010).

El objetivo principal de este trabajo era determinar qué tipo de entrenamiento (fuerza o resistencia) era mejor para el proceso de neurogénesis producido en el giro dentado, y determinar si la autofagia está implicada en estos efectos. Este estudio sería el primero en analizar el efecto del ejercicio de fuerza a este nivel, ya que gran parte de los trabajos en los que se explora neurogénesis y ejercicio fueron realizados bien con un acceso libre para los ratones a una rueda en su jaula (a modo de ejercicio voluntario) (Lira y cols., 2013), o bien con protocolos para ejercicio de resistencia (He y cols., 2012b). Además, para tratar de determinar los mecanismos moleculares que se inducen tras el ejercicio de fuerza o de resistencia, contábamos con un modelo de ratón con una deficiencia parcial en autofagia, que nos permitiría determinar cuál es el papel de la autofagia en el ejercicio.

Sin embargo, al observar las secciones de cerebro de estos animales, una vez terminados los periodos de entrenamiento, hemos visto que algunos de los ratones *Atg4b*^{-/-} presentaban anomalías morfológicas en el giro dentado del hipocampo. Este defecto no había sido descrito con anterioridad, lo cual tuvo un efecto en el trabajo importante.

Los resultados referentes al área del giro del hipocampo en distintas condiciones de ejercicio no se corresponden con lo esperado. Los animales *Atg4b*^{-/-} que realizaron ejercicio mostraron un área menor de esta zona, pero no podemos determinar si es por acción del ejercicio, lo cual iría en contra de los estudios que indican que el ejercicio físico incrementa la neurogénesis, o bien por esta anomalía que hace que el área sea más pequeña.

También es importante analizar los resultados obtenidos en las pruebas de evaluación de fuerza y resistencia de estos animales, ya que no podemos descartar que las diferencias observadas entre los grupos Wt y los grupos *Atg4b*^{-/-} sean debidas a la presencia de estos animales anómalos. Una cosa similar ocurrió en el trabajo de Mariño y cols. (2010), donde analizaron la coordinación motora de los ratones *Atg4b*^{-/-} en una prueba de rotarod. En este test se mide el tiempo que tardan los ratones en caer del aparato. Los animales *Atg4b*^{-/-} mostraron una latencia menor que los

correspondientes Wt. Sin embargo, aproximadamente un 25% de los *Atg4b*^{-/-} fueron incapaces de realizar la prueba, al permanecer sobre el rotarod sólo unos segundos.

En la actualidad, estamos llevando a cabo otro entrenamiento subcrónico con un nuevo grupo de ratones, a los que estamos inyectando bromodeoxiuridina, un análogo de la timina que se incorpora a las células en proliferación para lograr un seguimiento más eficiente del proceso neurogénico, y poder además incrementar el número de ratones en los test de comportamiento. Además, en paralelo a este trabajo, se han puesto a punto una serie de inmunofluorescencias para diferentes marcadores de neurogénesis que están siendo analizadas en los ratones que formaron parte de los entrenamientos ya concluidos. Estos marcadores nos permitirán determinar el efecto del ejercicio sobre la neurogénesis, así como valorar si las alteraciones observadas en algunos animales *Atg4b*^{-/-} afectan también a este proceso.

Por último, debemos continuar explorando el hipocampo de estos animales en condiciones normales, ya que podrían revelar qué papel juega la autofagia tanto en la capa granular del giro dentado como en el mantenimiento del capa polimórfica de esta zona del hipocampo. Asimismo, también es necesario conocer hasta qué nivel está afectada la zona ventral del hipocampo de estos animales *Atg4b*^{-/-}.

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- 1) Los protocolos de ejercicio de fuerza y de ejercicio de resistencia aplicados fueron eficaces tanto en el entrenamiento subcrónico como en el entrenamiento crónico.
- 2) Los ratones *Atg4b*^{-/-} respondieron a los entrenamientos con una capacidad de mejora en los ejercicios de fuerza y de resistencia menor a la observada en los animales Wt, implicando que el proceso autofágico es importante a este nivel.
- 3) Aproximadamente un 25% de los ratones *Atg4b*^{-/-} presentan un giro dentado anómalo, con una capa polimórfica muy disminuida.

BIBLIOGRAFÍA

Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W. and Gage, F. H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev* 94, 991-1026.

Bannerman, D. M., Grubb, M., Deacon, R. M., Yee, B. K., Feldon, J. and Rawlins, J. N. (2003). Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res*. 139 (1-2), 197-213.

Bruusgaard, J. C., Johansen, I. B., Egner, I. M., Rana, Z. A. and Gundersen, K. (2010). Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *PNAS* 107 (34), 15111-15116.

Burgess, N., Maguire, E. A. and O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35 (4), 625-641.

Chadwick, M. J., Jolly, A. E., Amos, D. P., Hassabis, D. and Spiers, H. J. (2015). A goal direction signal in the human entorhinal/subicular region. *Curr Biol* 25 (1), 87-92.

Crawley, J. N. (2008). Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron* 57 (6), 809-818.

de Lima, M. N. M., Laranja, D. C., Bromberg, E., Roesler, R. and Schröder, N. (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res* 156, 139-143.

Fanselow, M. S. and Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65 (1), 7-19.

Fiuza-Luces, C., Garatachea, N., Berger, N. A. and Lucia, A. (2013). Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)* 28(5), 330-358.

Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., de Barreda, E. G., Ávila, J. and Hernández, F. (2011). Different susceptibility to neurodegeneration of dorsal and ventral hippocampal dentate gyrus: a study with transgenic mice overexpressing GSK3 β . *PLoS One* 6 (11), e27262.

Gleeson, M., Bishop, N. C., Stensel, D. J., Lindley, M. R., Mastana, S. S., Nimmo, M. A. (2011). The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 11 (9), 607-615.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Okano, H. and Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889.

Hawley, J. A. (2009). Molecular responses to strength and endurance training: Are they incompatible? *Appl. Physiol. Nutr. Metab* 34, 355-361.

He, C., Sumpter, R. and Levine, B. (2012a). Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy* 8, 1548-1551.

He, C., Bassik, M. C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., An, Z., Loh, J., Fisher, J., Sun, Q., Korsmeyer, S., Packer, M., May, H. I., Hill, J. A., Virgin, H. W., Gilpin, C., Xiao, G., Bassel-Duby, R., Scherer, P. E. and Levine, B. (2012b). Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* 481, 511-515.

Jinde, S., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Pickel, J., Kohno, K., Belforte, J. E. and Nakazawa, K. (2012). Hilar mossy cell degeneration causes transient dentate granule cell hyperexcitability and impaired pattern separation. *Neuron* 76 (6), 1189-200.

Kempermann, G., Kuhn, H.G. and Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18 (9), 3206-3212.

Kempermann, G., Fabel, K., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., Garthe, A. and Wolf, S. A. (2010). Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. *Front Neurosci* 4, 1-9.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. and Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.

Lledo, P., Alonso, M. and Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neural circuits. *Nature* 7, 179-193.

Lira, V. A., Okutsu, M., Zhang, M., Greene, N. P., Laker, R. C., Breen, D. S., Hoehn, K. L. and Yan, Z. (2013). Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J* 27, 4184-4193.

Mariño, G., Salvador-Montoliu, N., Fueyo, A., Knecht, E., Mizushima, N. and López-Otín, C. (2007). Tissue-specific Autophagy Alterations and Increased Tumorigenesis in Mice Deficient in Atg4C/Autophagin. *JBC* 282(25), 18573-18583.

Mariño, G. and López-Otín, C. (2008). Autophagy and aging: new lessons from progeroid mice. *Autophagy* 4 (6), 807-809.

Mariño, G., Fernández, A. F., Cabrera, S., Lundberg, Y. W., Cabanillas, R., Rodríguez, F., Salvador-Montoliu, N., Vega, J. A., Germanà, A., Fueyo, A., Freije, J. M. P. and López-Otín, C. (2010). Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J Clin Invest* 120 (7), 2331-2344.

Mattson, M. P. (2012). Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell Metab* 16 (6). 706-722.

Menzies, F. M., Fleming, A. and Rubinsztein, D. C. (2015). Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nature* 16, 345-357.

Pedersen, B. K. and Febbraio, M. A. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8 (8), 457-465.

Pedersen, B. K., Pedersen, M., Krabbe, K. S., Bruunsgaard, H., Matthews, V. B. and Febbraio, M. A. (2009). Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. *Exp Physiol* 94 (12), 1153-1160.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., García-Arencibia, M., Green-thompson, Z. W., Jiménez-Sánchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C. O., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna M., Siddiqi, F. F., Underwood, B. R., Winslow, A. R. and Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiology Rev* 90, 1383-1435.

Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A. and Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472 (7344), 466-470.

Schmidt, B., Marrone, D. F. and Markus, E. J. (2012). Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res* 226 (1), 56-65.

Tovote, P., Fadok, J. P. and Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 16 (6), 317-331.

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), 266-270.

Zhang, L., Hu, X., Luo, J., Li, L., Chen, X., Huang, R. and Pei, Z. (2013). Physical exercise improves functional recovery through mitigation of autophagy, attenuation of apoptosis and enhancement of neurogenesis after MCAO in rats. *BMC Neurosci* 14, 46.

