



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

**Departamento de Biología Funcional**

**Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular**

**Papel de la autofagia en la respuesta  
adaptativa a los entrenamientos de fuerza y  
de resistencia en el encéfalo**

**Helena Codina Martínez**

**Oviedo**

**- 2019 -**











## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Papel de la autofagia en la respuesta adaptativa a los entrenamientos de fuerza y de resistencia en el encéfalo	Inglés: Role of the autophagy in adaptive response to resistance and endurance trainings in brain
2.- Autor	
Nombre: Helena Codina Martínez	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable: Departamento de Biología Funcional	

### RESUMEN (en español)

El estilo de vida en las poblaciones occidentales se caracteriza por la dieta hipercalórica y la inactividad física, lo cual está asociado a enfermedades no transmisibles. Sin embargo, tanto la dieta como la actividad física son factores modificables que, pautados de forma correcta, pueden disminuir o retrasar la aparición de enfermedades, como las patologías neurodegenerativas. En cuanto a la actividad física, descifrar los mecanismos moleculares que subyacen al ejercicio tiene un gran potencial preventivo y clínico. Las adaptaciones fisiológicas derivadas del entrenamiento favorecen, entre otros procesos, el mantenimiento de la homeostasis de todo el organismo, siendo la autofagia uno de sus principales mecanismos. Por ello, la inducción de esta vía de degradación por el ejercicio podría ser clave en la prevención de estas enfermedades. Además, la práctica de actividad física es una estrategia de bajo coste que mejora la calidad de vida y que no tiene efectos secundarios.

Aunque el ejercicio físico se sustenta sobre la actividad del aparato locomotor, sus efectos pueden observarse, por ejemplo, en el sistema nervioso. Así, el entrenamiento de resistencia favorece la neurogénesis y la formación de sinapsis, lo cual revierte en una mejora a nivel de la función encefálica, jugando un papel importante en la prevención de enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, este tipo de entrenamiento es capaz de inducir la autofagia en el encéfalo de modelos murinos, sugiriendo así la implicación de esta vía en los procesos de adaptación al ejercicio a nivel encefálico. Sin embargo, se sabe poco de los efectos de otros tipos de entrenamiento, como el de fuerza, sobre estos aspectos. Por ello, la hipótesis que se plantea en esta Tesis Doctoral es que tanto el ejercicio de fuerza como el de resistencia producen efectos beneficiosos sobre los mecanismos de adaptación al ejercicio en el encéfalo a diferentes niveles: funcional, afectando a la conducta; celular, afectando a la neurogénesis adulta; y molecular, afectando a los niveles de proteínas presinápticas. Y para que estas adaptaciones tengan lugar es necesaria la participación de la vía autofágica.

Se utilizaron dos modelos murinos con déficit parcial y sistémico de autofagia (*atg4d<sup>-/-</sup>* y *atg4b<sup>-/-</sup>*) con el objetivo de determinar si la deficiencia parcial afecta a nivel conductual. Los resultados mostraron alteraciones relacionadas con la ansiedad en el modelo *atg4d<sup>-/-</sup>*, mientras que ambos modelos tenían afectada la memoria a corto plazo. A continuación, determinamos las capacidades físicas tanto de resistencia como de fuerza en el modelo *atg4b<sup>-/-</sup>* a los 2 meses de edad, observando que presentaban una capacidad de fuerza menor que los ratones salvajes (Wt), lo cual indica que la autofagia



es necesaria para la cualidad de fuerza. Con el fin de evaluar el efecto de los entrenamientos de resistencia y de fuerza sobre este modelo deficiente en autofagia, se utilizaron ratones macho Wt (n=36) y *atg4b*<sup>-/-</sup> (n=36), divididos en tres grupos: control, fuerza y resistencia. Se aplicó un programa de entrenamiento físico de fuerza o de resistencia durante dos periodos: intervención a corto plazo, de 2 semanas, e intervención a largo plazo, de 14 semanas. Se analizó la conducta (en la intervención a corto plazo), la neurogénesis adulta en el hipocampo, los niveles de proteínas presinápticas (CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína) y los niveles de proteínas autofágicas (LC3 y p62) en corteza cerebral, estriado, hipocampo y cerebelo.

Las principales conclusiones indican que tanto el entrenamiento de fuerza como el de resistencia generan adaptaciones en el cerebro al inducir la neurogénesis adulta en el hipocampo y aumentar la autofagia en la corteza cerebral. Sin embargo, cuando existe una deficiencia en la ruta autofágica las adaptaciones al ejercicio de fuerza se ven comprometidas. Debido al descenso de esta vía a lo largo de la vida, estos resultados apoyan los beneficios del entrenamiento durante el envejecimiento.

#### RESUMEN (en inglés)

Western lifestyle is characterized by hypercaloric diet and physical inactivity, which are associated with noncommunicable diseases. However, diet and physical activity are modifiable factors that, correctly applied, can reduce or delay the occurrence of diseases, such as neurodegenerative pathologies. Regarding physical activity, deciphering exercise molecular mechanisms may have a great potential at preventive and clinic levels. Physiological adaptations to training favor, among others, homeostasis maintenance in the whole body, being autophagy one of the main mechanisms. Thus, exercise induction of this degradative pathway could be a key in disease prevention. Moreover, regular physical activity is a low-cost strategy which improves life quality without negative secondary side effects.

Although physical activity is based on the locomotive system activity, its effects can be observed, for example, in the nervous system. Thus, endurance training favors adult neurogenesis and synapse formation, improving brain function and playing an important role in the prevention of neurodegenerative diseases. On the other hand, this type of training is able to induce autophagy in the brain of mouse models, suggesting the role of this route in brain adaptive response to exercise. However, less is known regarding the effect of other types of exercise, such as resistance exercise, at brain level. Thus, the hypothesis of this work is that both resistance and endurance exercise are able to induce beneficial effects on exercise adaptive response mechanisms in the brain at different levels: functional, affecting behavior; cellular, affecting adult neurogenesis; and molecular, affecting presynaptic protein levels. In order to all these responses take place, autophagy is needed.

Two mouse models with partial systemic autophagy deficiency have been used (*atg4d*<sup>-/-</sup> and *atg4b*<sup>-/-</sup>) to determine whether behavior is affected by autophagy. Results showed that the *atg4d*<sup>-/-</sup> model presented alterations in anxiety related behaviors, while both models had short-term memory affected. Next, we explored endurance and resistance physical capacities in the *atg4b*<sup>-/-</sup> mouse model at 2 months of age. In these mice, resistance capacity was lower than the observed in their wild-type (Wt) counterparts, suggesting that autophagy is needed for resistance capacity. In order to evaluate the effects of endurance and resistance trainings in the *atg4b*<sup>-/-</sup> mouse model, male Wt



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

(n=36) and *atg4b*<sup>-/-</sup> (n=36) mice were divided in three groups: control, resistance, and endurance. Endurance or resistance physical training programs were applied along two different periods: short-term intervention, for 2 weeks, and long-term intervention, for 14 weeks. Behavior (in the short-term intervention), hippocampal adult neurogenesis, presynaptic proteins (CSP $\alpha$  and  $\alpha$ -synuclein) levels, and autophagic proteins (LC3 and p62) levels in cerebral cortex, striatum, hippocampus and cerebellum were analyzed.

Main conclusions indicate that both endurance and resistance trainings favor brain adaptive responses, since they induce hippocampal adult neurogenesis and increase autophagy in cerebral cortex. However, when a deficiency in the autophagic route is present, resistance training adaptive response is compromised. Due to the decrease of the autophagy pathway throughout life, these results support beneficial effects of resistance training during aging.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**



Parte de la presente Tesis Doctoral ha sido galardonada con el tercer premio del Premio Nacional de Investigación de Medicina del Deporte (convocatoria 2017) por el trabajo titulado: “Papel de la autofagia en las adaptaciones a los ejercicios de fuerza y de resistencia: del músculo al cerebro”. Escuela de Medicina del Deporte. Universidad de Oviedo.



*A mis padres,  
por el esfuerzo, la confianza y el cariño.*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, los Dres. Cristina Tomás Zapico y Benjamín Fernández García, el haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación. Por hacerme partícipe de sus conocimientos, así como enseñarme a valerme por mí misma en un laboratorio que se encontraba prácticamente en sus inicios. Gracias por permitirme comenzar a trabajar en aquello que me apasiona.

Mi agradecimiento, también, al Dr. Eduardo Iglesias Gutiérrez por recibirme junto a mis directores, por su colaboración en todo momento, y por hacer posible que esta Tesis Doctoral pudiese llevarse a cabo.

Así mismo, gracias a todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, y a todas las personas que pasaron por él. En especial gracias a Carlos y Sara por acompañarme en este viaje, a veces duro, porque su llegada al laboratorio fue un gran apoyo para mí. Por experimentar y aprender juntos. Por su grata ayuda a lo largo de estos años, tanto dentro como fuera del laboratorio.

Mi agradecimiento a los Dres. Carlos López Otín, Álvaro Fernández Fernández y Guillermo Mariño García, porque sus aportaciones fueron imprescindibles para realizar esta Tesis.

Al Área de Fisiología de la Universidad de Oviedo, al personal del Bioterio y a la Unidad de Histopatología Molecular del IUOPA; su trabajo y colaboración han sido fundamentales.

Gracias a mi familia por apoyarme para que lograra alcanzar aquello que quería. A Sofia por su predisposición a ayudarme en todo momento, por transmitirme parte de su larga experiencia en este mundo de la investigación, y por sus comentarios tan acertados. A Mariló por retomar sus clases de nuevo conmigo, porque ciencia y letras van de la mano. A Pedro por su cariño, paciencia y comprensión, por animarme siempre a continuar. A mis padres porque sin ellos jamás hubiese llegado a alcanzar la meta, gracias por cuidarme en todas las situaciones complicadas que surgieron, y por su inmenso esfuerzo para que pudiese lograrlo.

Por último, quería hacer una mención especial a los participantes de este estudio, los ratones que me permitieron aprender, poner a punto las técnicas y que formaron parte directa de este trabajo. Porque los animales de experimentación cumplen un papel fundamental en el avance de nuestro conocimiento.

“...que todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro y que aun el peor dotado es susceptible al modo de las tierras pobres, pero bien cultivadas y abonadas, de rendir copiosa mies”.

Fragmento del discurso del **Sr. D. Santiago Ramón y Cajal** leído en su ingreso en la Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (5 de diciembre de 1897)



# ÍNDICE

<b>I. ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>1. El ejercicio físico.....</b>	<b>9</b>
1.1. Importancia evolutiva de la actividad física en la salud .....	9
1.2. Respuesta fisiológica al ejercicio .....	10
1.3. Tipos de cualidades físicas y su entrenamiento .....	12
1.4. Regulación molecular del ejercicio.....	14
<b>2. Autofagia .....</b>	<b>16</b>
2.1. Microautofagia .....	17
2.2. Autofagia mediada por chaperonas.....	18
2.3. Macroautofagia .....	19
2.4. Regulación de la autofagia .....	22
2.5. El sistema ubiquitina-proteosoma y la autofagia selectiva .....	25
2.6. Modelos murinos carentes de autofaginas .....	30
<b>3. El sistema nervioso .....</b>	<b>34</b>
3.1. El hipocampo.....	35
3.1.1. La neurogénesis en el adulto.....	37
3.1.2. El ejercicio físico como regulador de la neurogénesis.....	43

3.2. Las chaperonas SNARE en la sinapsis .....	46
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>1. Animales y diseño experimental .....</b>	<b>63</b>
<b>2. Test de comportamiento.....</b>	<b>67</b>
2.1. Test de campo abierto.....	67
2.2. Test de reconocimiento de objetos .....	68
<b>3. Entrenamiento físico .....</b>	<b>70</b>
3.1. Adaptación.....	70
3.2. Test de evaluación de la condición física .....	72
3.3. Entrenamiento.....	73
<b>4. Obtención de tejidos.....</b>	<b>74</b>
<b>5. Análisis histológicos .....</b>	<b>74</b>
<b>6. Análisis bioquímicos.....</b>	<b>76</b>
6.1. Homogeneización y cuantificación de proteínas .....	76
6.2. <i>Western blot</i> .....	77
<b>7. Estadística .....</b>	<b>79</b>
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
<b>1. Comportamiento en dos modelos de ratón con déficit de autofagia ....</b>	<b>83</b>

1.1. El déficit de Atg4d afecta a la conducta relacionada con la ansiedad y la memoria a corto plazo .....	83
1.2. Los ratones <i>atg4b</i> <sup>-/-</sup> podrían tener afectada la memoria a corto plazo .....	85
<b>2. Capacidad física en un modelo deficiente en autofagia tras el entrenamiento de fuerza y de resistencia .....</b>	<b>86</b>
2.1. El déficit parcial de autofagia afecta a la capacidad de fuerza, pero no a la de resistencia .....	86
2.2. El entrenamiento de fuerza evita la pérdida de dicha cualidad asociada al déficit parcial de autofagia .....	88
2.3. El déficit parcial de autofagia a largo plazo podría afectar a la respuesta adaptativa al entrenamiento de resistencia .....	92
<b>3. Efecto del entrenamiento en el comportamiento de ratones <i>atg4b</i><sup>-/-</sup> .....</b>	<b>96</b>
3.1. El déficit parcial de autofagia podría estar relacionado con la ansiedad .....	96
3.2. El ejercicio de fuerza mejora la memoria a corto plazo, y el déficit parcial de autofagia impide este efecto .....	97
<b>4. Adaptaciones neuronales al entrenamiento .....</b>	<b>99</b>
4.1. Análisis de la neurogénesis .....	99
4.1.1. El potencial proliferativo de los progenitores neuronales disminuye drásticamente antes de los 6 meses de edad .....	99
4.1.2. La autofagia es necesaria para que el ejercicio induzca la neurogénesis .....	104
4.2. Niveles de CSP $\alpha$ y $\alpha$ -sinucleína .....	108

4.2.1. El ejercicio durante 14 semanas disminuye los niveles de CSP $\alpha$ en el hipocampo de los ratones <i>atg4b</i> <sup>-/-</sup> .....	108
4.2.2. El ejercicio induce cambios diferentes en los niveles de CSP $\alpha$ en el estriado y el cerebelo de los ratones con déficit parcial de autofagia .....	110
<b>5. Análisis de los niveles de proteínas involucradas en autofagia .....</b>	<b>114</b>
5.1. Niveles de las proteínas autofágicas LC3-I, LC3-II, p62 y ubiquitina.....	114
5.1.1. El ejercicio no influye sobre los niveles de LC3 en el hipocampo ..	114
5.1.2. El entrenamiento de resistencia, pero no el de fuerza, modifica los niveles de LC3-II/LC3-I en la corteza cerebral de los ratones con déficit parcial de autofagia.....	116
5.1.3. El déficit de <i>Atg4b</i> produce acumulación de la isoforma pro-LC3 en todas las regiones encefálicas estudiadas, y el ejercicio no es capaz de favorecer su procesamiento.....	124
5.2. El ejercicio de resistencia incrementa los niveles de AMPK en los ratones con déficit parcial de autofagia.....	126
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>131</b>
1. Comportamiento en dos modelos de ratón con déficit de autofagia ..	134
2. Capacidad física en un modelo deficiente en autofagia tras el entrenamiento de fuerza y de resistencia .....	136
3. Efecto del entrenamiento en el comportamiento de ratones <i>atg4b</i> <sup>-/-</sup> ...	139
4. Adaptaciones neuronales al entrenamiento .....	142
5. Análisis de los niveles de proteínas involucradas en autofagia.....	147

<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>155</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>159</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>183</b>
<b>Anexo 1. Protocolos de entrenamiento aplicados.....</b>	<b>185</b>
<b>Anexo 2. Niveles de p70 S6K en corteza cerebral, estriado y cerebelo de los ratones Wt y <i>atg4b</i><sup>-/-</sup> .....</b>	<b>199</b>



# **I. ABREVIATURAS**

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosina monofosfato/ <i>adenosine monophosphate</i>
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosina monofosfato/ <i>adenosine monophosphate activated protein kinase</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
<i>Atg</i>	Gen relacionado con autofagia/ <i>autophagy-related gene</i>
ATP	Adenosina trifosfato/ <i>adenosine triphosphate</i>
BCA	Ácido bicinconínico/ <i>bicinchoninic acid</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro/ <i>brain derived neurotrophic factor</i>
CA	Cuerno de Ammon/ <i>cornu Ammonis</i>
CaMK	Quinasa dependiente de calcio/calmodulina/ <i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CMA	Autofagia mediada por chaperonas/ <i>chaperone-mediated autophagy</i>
CSP $\alpha$	<i>Cysteine string protein <math>\alpha</math></i>
DCX	Doblecortina/ <i>doublecortin</i>
DG	Giro dentado/ <i>dentate gyrus</i>
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glia/ <i>glial fibrillary acidic protein</i>
Hsc70	Proteína de choque térmico de 70 kDa/ <i>heat shock-cognate protein of 70 kDa</i>
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1/ <i>insulin-like growth factor-1</i>
IPC	Célula progenitora intermedia/ <i>intermediate progenitor cell</i>
IUOPA	Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias
KO	<i>Knockout</i>
KO-14C	Ratones <i>knockout</i> controles pertenecientes a la intervención de 14 semanas
KO-14F	Ratones <i>knockout</i> entrenados en fuerza durante 14 semanas
KO-14R	Ratones <i>knockout</i> entrenados en resistencia durante 14 semanas
KO-2C	Ratones <i>knockout</i> controles pertenecientes a la intervención de 2 semanas

## Abreviaturas

KO-2F	Ratones <i>knockout</i> entrenados en fuerza durante 2 semanas
KO-2R	Ratones <i>knockout</i> entrenados en resistencia durante 2 semanas
LAMP-2A	Proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A/ <i>lysosome-associated membrane protein type 2A</i>
LC3A	Proteína 1 de cadena ligera 3 $\alpha$ asociada a microtúbulos/ <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3<math>\alpha</math></i>
LC3B	Proteína 1 de cadena ligera 3 $\beta$ asociada a microtúbulos/ <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3<math>\beta</math></i>
LC3C	Proteína 1 de cadena ligera 3 $\gamma$ asociada a microtúbulos/ <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3<math>\gamma</math></i>
lys-Hsc70	Proteína de choque térmico lisosomal de 70 kDa/ <i>lysosomal heat shock-cognate protein of 70 kDa</i>
mTORC1	Complejo 1 de la diana de rapamicina en células de mamífero/ <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	Complejo 2 de la diana de rapamicina en células de mamífero/ <i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
NeuN	Proteína nuclear neuronal/ <i>neuronal nuclei protein</i>
NSC	Célula madre neural/ <i>neural stem cell</i>
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida/ <i>N-ethylmaleimide sensitive factor protein</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
p62/ SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
p70 S6K	Proteína quinasa S6 ribosomal de 70 kDa/ <i>70 kDa ribosomal protein S6 kinase</i>
PE	Fosfatidiletanolamina/ <i>phosphatidylethanolamine</i>
PGC-1 $\alpha$	Coactivador 1 $\alpha$ del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas/ <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-<math>\alpha</math></i>
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinasa/ <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
Pro-LC3	Precursor de LC3
SGT	Proteína rica en glutamato y treonina/ <i>glutamate- and threonine-rich protein</i>

SGZ	Zona subgranular/ <i>subgranular zone</i>
SNAP	Proteínas de fijación soluble de NSF/ <i>soluble NSF attachment proteins</i>
SNAP-25	Proteína de 25 KDa asociada a sinaptosoma/ <i>synaptosomal-associated protein of 25 KDa</i>
SNARE	Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF/ <i>soluble NSF attachment proteins receptors</i>
SVZ	Zona subventricular/ <i>subventricular zone</i>
TSC2	Tuberina/ <i>tuberin</i>
ULK	Complejo quinasa similar a <i>Unc-51/ Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
VAMP2	Proteína 2 de membrana asociada a vesícula/ <i>vesicle-associated membrane protein-2</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular/ <i>vascular endotelial growth factor</i>
WB	<i>Western blot</i>
Wt	Tipo salvaje/ <i>wild type</i>
Wt-14C	Ratones <i>wild type</i> controles pertenecientes a la intervención de 14 semanas
Wt-14F	Ratones <i>wild type</i> entrenados en fuerza durante 14 semanas
Wt-14R	Ratones <i>wild type</i> entrenados en resistencia durante 14 semanas
Wt-2C	Ratones <i>wild type</i> controles pertenecientes a la intervención de 2 semanas
Wt-2F	Ratones <i>wild type</i> entrenados en fuerza durante 2 semanas
Wt-2R	Ratones <i>wild type</i> entrenados en resistencia durante 2 semanas

## Abreviaturas

## **II. INTRODUCCIÓN**



## 1. El ejercicio físico

### 1.1. Importancia evolutiva de la actividad física en la salud

Evolutivamente, el movimiento es un requisito fundamental en la supervivencia del ser humano. Hace miles de años era imprescindible para conseguir alimentos, defenderse ante depredadores o construir refugios, lo que produjo respuestas biológicas adaptativas diferentes en la fisiología, según la intensidad y la duración de la actividad física. Sin embargo, con el transcurso del tiempo, la especie humana ha sido capaz de desarrollar altos niveles de tecnología, lo que ha contribuido a facilitar labores que antes eran muy tediosas, a costa de transformar nuestro estilo de vida haciéndolo más sedentario. Esto ha llevado a que, actualmente, la forma de vida del ser humano haya cambiado radicalmente, y resulte muy difícil alcanzar los niveles saludables de actividad física exclusivamente mediante las tareas diarias. Por ello, se intenta estimular a la sociedad para que realice ejercicio físico con asiduidad (Hawley et al., 2014; Neuffer et al., 2015).

Según el Diccionario de la Real Academia Nacional de Medicina, la actividad física se define como: la “Contracción voluntaria de los músculos esqueléticos, que implica un consumo energético, con fines laborales o de ejercicio físico”, por lo que el ejercicio forma parte de la actividad física, al igual que otras actividades que entrañan movimiento corporal y que se realizan mientras se llevan a cabo actividades recreativas, de trabajo o de desplazamiento. El ejercicio es una actividad física planificada, estructurada y repetitiva que tiene como objetivo mejorar o mantener los componentes de la aptitud física (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2010).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la actividad física es un factor que condiciona la salud (Morris et al., 1953; Myers et al., 2002), influyendo en el desarrollo y la esperanza de vida (OMS, 2010). Por el contrario, la inactividad tiene graves consecuencias tanto a nivel fisiológico como a nivel clínico (Hawley et al., 2014; Neuffer et al., 2015). De hecho, es el cuarto factor de riesgo de muerte en el mundo, estando, además, asociada al 21 %-25 % de los cánceres de mama y colon, al 27 % de los casos de diabetes y al 30 % de la carga de cardiopatía isquémica (OMS, 2010). Por ello el ejercicio aporta grandes beneficios que abarcan desde el mantenimiento del

rendimiento físico, hasta la prevención y el tratamiento de un gran número de patologías, como enfermedades cardiovasculares, respiratorias, diabetes tipo 2, obesidad, osteoporosis, sarcopenia, algunos tipos de cáncer o enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Neufer et al., 2015; Grazioli et al., 2017).

La práctica de ejercicio físico regular es una actividad de bajo coste, que mejora la calidad de vida y apenas produce efectos secundarios, siendo su acción semejante, en algunos casos, a la del tratamiento con fármacos (Fiuza-Luces et al., 2013). Sin embargo, el ejercicio no solo ayuda a tratar patologías, sino que también permite prevenirlas, lo que revierte a nivel económico en una reducción del gasto público sanitario (Vina et al., 2012). Además, es el único tratamiento que permite atenuar la disminución de las aptitudes físicas relacionadas con el envejecimiento, ya que ningún fármaco es capaz de revertirlo a nivel general, pero el ejercicio regular mitiga los efectos del envejecimiento a nivel sistémico (Garatachea et al., 2015).

### **1.2. Respuesta fisiológica al ejercicio**

El ejercicio físico se sustenta sobre la actividad muscular, que actúa sobre palancas óseas, produciendo un trabajo. El músculo esquelético está compuesto por sincitios: células de gran tamaño que poseen varios núcleos y que resultan de la fusión de varias células. Estos sincitios se extienden, frecuentemente, de tendón a tendón, por lo que se les denomina fibras musculares. Las fibras musculares soportan todo tipo de actividades, algunas de baja amplitud y esfuerzos repetitivos, como el mantenimiento de la postura, y otras de intensidad muy alta, como levantar grandes pesos de forma puntual (Rowe et al., 2015). Esto es posible gracias a la existencia de diferentes tipos de fibras adaptadas a las tareas que se realizan: fibras lentas o de tipo I, que presentan una velocidad de contracción lenta y pueden trabajar durante periodos largos de tiempo, y fibras rápidas o de tipo II, que poseen una velocidad de contracción más rápida, lo que conlleva mayor fatiga. A su vez, las fibras rápidas se pueden clasificar en fibras de tipo II-a, de tipo II-b y de tipo II-x/d (Ferraro et al., 2014; Hawley et al., 2014; Rowe et al., 2015).

Las fibras de tipo I y II-a tienen mayor capacidad oxidativa, puesto que presentan mayor número de mitocondrias y capilares por fibra, lo que permite que en ellas se produzca la oxidación de la glucosa, de los ácidos grasos y, en menor medida, de las proteínas, para generar adenosina trifosfato (ATP) mediante metabolismo aerobio. Además, poseen altas concentraciones de mioglobina, lo que da lugar a que estas células tengan un tono rojizo y también se les denomine fibras rojas. Sin embargo, las fibras de tipo II-b y II-x/d son principalmente glucolíticas y contienen proteínas fibrilares que les permiten generar movimientos rápidos y de gran potencia. El número de mitocondrias y capilares en cada una de estas fibras es menor que en las de tipo I y II-a, por lo que la síntesis de ATP se produce a expensas del metabolismo anaerobio, siendo cuantitativamente menos eficiente, pero más rápida (Gundersen et al., 2011; Ferraro et al., 2014; Rowe et al., 2015).

Todos los mamíferos poseen diferentes tipos de fibras musculares, pero el porcentaje de las mismas varía entre individuos. El músculo esquelético adquiere esta heterogeneidad durante el desarrollo, aunque en la edad adulta presenta gran plasticidad, pudiendo adquirir una mayor red de capilares y mitocondrias para mantener la homeostasis celular, que conlleva un cambio del contenido fibrilar y de las propias fibras (Hawley et al., 2014; Rowe et al., 2015).

Por todo lo anteriormente descrito, el ejercicio físico produce una respuesta adaptativa en el músculo esquelético que depende del tipo de ejercicio que se practique, de la intensidad, del volumen y de la frecuencia de los estímulos contráctiles (Rowe et al., 2015). Sin embargo, el ejercicio físico no solo actúa sobre el músculo esquelético sino también sobre otros tejidos y órganos, como el tejido adiposo, el páncreas, el hígado, el hueso, o el cerebro (Pedersen y Febbraio, 2012). Para realizar ejercicio voluntario es necesario, en primer lugar, que se envíe una señal desde la corteza motora del cerebro hacia la médula espinal, para que se activen diversas unidades motoras que produzcan la contracción muscular. Así mismo, otros estímulos nerviosos actúan a la vez sobre los sistemas cardiovascular, respiratorio, metabólico y endocrino, enviando señales, que producen una activación a nivel sistémico, incrementándose las demandas metabólicas y rompiéndose la homeostasis celular (Hawley et al., 2014).

### **1.3. Tipos de cualidades físicas y su entrenamiento**

El ejercicio físico se basa en diferentes tipos de cualidades físicas y motrices, cada una de las cuales causa efectos y beneficios distintos sobre el organismo: fuerza, resistencia, velocidad, flexibilidad, equilibrio y coordinación. Esta Tesis se centra en las dos más estudiadas, la fuerza y la resistencia, y en su entrenamiento, lo cual denominaremos, a partir de ahora, como ejercicio de fuerza y ejercicio de resistencia.

#### Ejercicio de fuerza

En el contexto biológico, la fuerza es la capacidad de vencer físicamente una resistencia por medio de la acción muscular. Cuando se realiza ejercicio de fuerza se produce una adaptación del músculo esquelético que conlleva el incremento del número de núcleos y de proteínas contráctiles en los miocitos, lo que se traduce en un aumento de la masa muscular (Bruusgaard et al., 2010). El ejercicio de fuerza está asociado con la activación de las fibras rápidas, o de tipo II-b, del músculo esquelético. Estas fibras presentan un diámetro grande y están formadas por miofibrillas densas e importantes reservas de glucógeno. Además, el restablecimiento energético en ellas se lleva a cabo sin la presencia de oxígeno, lo que relaciona al ejercicio de fuerza con el metabolismo anaeróbico (Rowe et al., 2015). Desde el punto de vista de la salud, el ejercicio de fuerza es muy importante en la prevención, no solo de la pérdida de masa muscular, sino también de la pérdida de densidad ósea, ya que se ha demostrado que el entrenamiento de fuerza promueve la síntesis de marcadores involucrados en la formación del hueso, y disminuye los niveles de aquellos relacionados con la resorción del tejido óseo (Mosti et al., 2013). A su vez, el ejercicio de fuerza puede cumplir un papel fundamental en patologías metabólicas como la obesidad o la diabetes, ya que se ha visto que aporta grandes beneficios en relación con la sensibilidad a la insulina (Lumb, 2014). Así mismo, diversos estudios han descrito, a nivel cerebral, que el ejercicio de fuerza es capaz de mejorar la función cognitiva (Northey et al., 2018; Wilke et al., 2019).

Por todo ello, este tipo de ejercicio representa una intervención no farmacológica muy importante para prevenir lesiones, así como diferentes patologías como la

sarcopenia, la osteopenia, la osteoporosis, la obesidad, la diabetes o el deterioro cognitivo.

### Ejercicio de resistencia

La resistencia es la capacidad para llevar a cabo un trabajo durante un tiempo prolongado. El ejercicio de resistencia está asociado con las fibras lentas o de tipo I, y requiere gran demanda energética y un elevado consumo de oxígeno, por lo que está relacionado con el metabolismo aeróbico. Para ello, produce la activación de las rutas metabólicas oxidativas, glucolíticas y lipolíticas, para recuperar los niveles de ATP (Ferraro et al., 2014; Rowe et al., 2015).

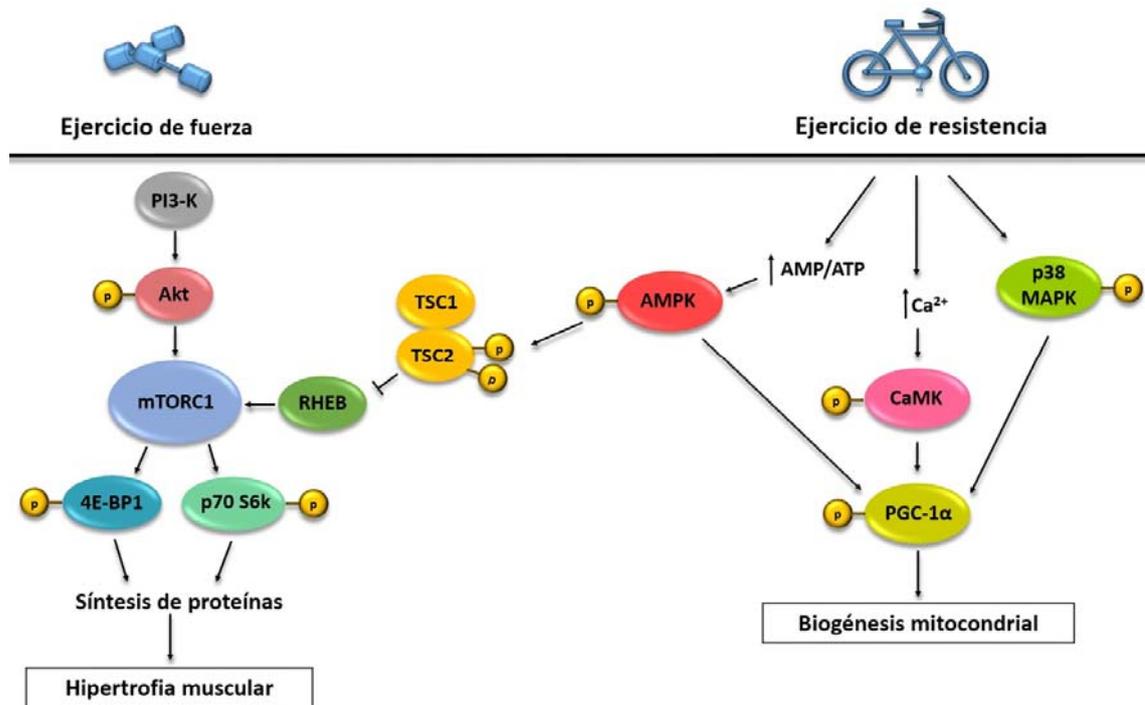
El ejercicio de resistencia está relacionado con la prevención de patologías cardiovasculares, como la cardiopatía isquémica o el accidente cerebrovascular, ya que previene la obesidad y disminuye, a nivel circulatorio, la concentración de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL), mientras que incrementa las lipoproteínas de alta densidad (HDL), lo que evita la aparición de aterosclerosis (Garber et al., 2011; Gleeson et al., 2011). Además, es capaz de reducir la presión sanguínea, mejorar la sensibilidad a la insulina, regular la concentración de marcadores pro-inflamatorios (controlando la inflamación sistémica), o aumentar los niveles de algunos factores de crecimiento, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Garber et al., 2011; Gleeson et al., 2011; Pedersen y Febbraio, 2012; Lumb, 2014; Hung et al., 2015).

El ejercicio de resistencia también produce diversos efectos sobre el cerebro: es capaz de disminuir la ansiedad y de prevenir el deterioro cognitivo y la demencia (Erickson et al., 2015). Además, se ha visto en modelos animales que puede inducir la neurogénesis en el hipocampo, lo que le confiere un papel importantísimo a nivel cerebral (van Praag et al., 1999; Kempermann et al., 2010).

#### 1.4. Regulación molecular del ejercicio

A pesar de la evidencia de que el ejercicio físico produce grandes beneficios para la salud, no se conocen aún las bases moleculares exactas que los inducen. De hecho, se estima que los efectos protectores del ejercicio sobre el organismo pueden ser mayores de lo que se pronostica actualmente (Neufer et al., 2015). La ciencia ha intentado fraccionar diferentes sistemas biológicos para que resultasen más fáciles de estudiar y comprender sus bases bioquímicas. Esto también se ha llevado a cabo para tratar de explicar las bases moleculares del ejercicio, pero su biología integrativa es compleja, y no es suficiente estudiar sus componentes de forma individual para lograr conocer su acción a nivel fisiológico. Aun así, en los últimos años, la aparición de nuevas técnicas moleculares ha ayudado a aportar nuevos datos sobre algunos de los mecanismos fundamentales del ejercicio (Hawley et al., 2014; Rowe et al., 2015).

Al realizar ejercicio de fuerza, por ejemplo, el levantamiento de pesas en halterofilia, la contracción muscular que se produce se caracteriza por ser de alta intensidad y corta duración. A nivel de la célula muscular, el ejercicio de fuerza está relacionado con la síntesis proteica y la hipertrofia muscular (Figura 1). Uno de los principales complejos que activa la fuerza es mTORC1 (complejo 1 de la diana de rapamicina en células de mamífero), que se encarga de la regulación de la síntesis y degradación proteica, así como del crecimiento celular. mTORC1 induce la síntesis de diferentes factores involucrados en la traducción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), como factores de iniciación y de elongación. Por otro lado, también facilita la biogénesis ribosomal para la traducción del ARNm y la síntesis proteica. La activación de mTORC1 provoca la fosforilación de 4E-BP1 (proteína de unión al factor de iniciación de la traducción eucariótica) y p70 S6K1 (proteína quinasa S6 ribosomal de 70 kDa), produciendo la formación del complejo eIF4F, que junto a eIF4B, permiten la formación del complejo de pre-iniciación 48S para que se lleve a cabo la traducción del ARNm (Adegoke, 2012; Kimball, 2014; Watson et al., 2014; Atherton et al., 2015).



**Figura 1.** Vías de señalización que se activan al realizar ejercicio de fuerza o de resistencia. Cuando se realiza ejercicio de fuerza se induce la vía PI3-K (fosfatidilinositol 3-quinasa) y Akt, en la que se activa el complejo mTORC1 que fosforila a 4E-BP1 y p70 S6K, induciéndose la formación del complejo de pre-iniciación 48S para que se inicie la traducción de diferentes ARNm y se sinteticen proteínas, lo que conlleva hipertrofia muscular. Sin embargo, cuando se realiza ejercicio de resistencia aumenta la concentración de calcio y de AMPK (proteína quinasa activada por AMP), así como la fosforilación de p38, una proteína que forma parte de las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos). Esto produce la activación de PGC-1 (coactivador 1 $\alpha$  del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas), que interviene en la regulación de la transcripción de proteínas mitocondriales implicadas en la biogénesis mitocondrial. Figura adaptada de Hawley et al., 2009.

Por otro lado, cuando se realiza ejercicio de resistencia, como correr o montar en bicicleta, se produce la contracción de diversos músculos esqueléticos durante un periodo largo de tiempo, lo que conlleva un incremento sostenido de la concentración de calcio en el sarcoplasma celular (Figura 1). Dicho incremento mantenido produce la activación de CaMK (quinasa dependiente de calcio/calmodulina), aumentándose la expresión de PGC-1 $\alpha$  (Hawley et al., 2014; Combes et al., 2015; Rowe et al., 2015). PGC-1 $\alpha$  regula la transcripción de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo celular y en el genoma de la mitocondria que intervienen en la biogénesis mitocondrial (Lin et al., 2005).

Otras rutas intracelulares que favorecen el aumento de la expresión de PGC-1 $\alpha$  en el músculo esquelético, durante la realización de ejercicio de resistencia, son las reguladas por el incremento de AMP (adenosina monofosfato) y p38 MAPK. Cuando la relación AMP/ATP se incrementa y se produce la disminución del nivel energético, se activa la proteína AMPK, aumentando los niveles de PGC-1 $\alpha$  y activando a la proteína tuberina (TSC2). De esta forma, se inhiben las vías anabólicas, que requieren energía para llevarse a cabo, y se activan las rutas catabólicas de carbohidratos y ácidos grasos, para que se restauren los niveles de ATP (Hawley et al., 2009). Por otro lado, p38-AMPK también fosforila y activa a PGC-1 $\alpha$ , lo que favorece el proceso de biogénesis mitocondrial (Puigserver y cols, 2001; Combes et al., 2015).

Tanto mTORC1 como AMPK son proteínas involucradas en un gran número de rutas diferentes que se encargan de regular el metabolismo celular. Debido a esto, el ejercicio físico está relacionado con vías celulares imprescindibles para la supervivencia y el mantenimiento de la homeostasis celular, como la autofagia (Ferraro et al., 2014; Vainshtein y Hood, 2016; Martin-Rincon et al., 2017). De hecho, se ha visto que el ejercicio físico es un inductor de la vía autofágica en diferentes órganos como el músculo esquelético, el tejido adiposo, el páncreas, el hígado o el cerebro (Grumati et al., 2011; He et al., 2012a, b; Lira et al., 2013; Luo et al., 2013; Bayod et al., 2014; Lo Verso et al., 2014; White et al., 2016; Martin-Rincon et al., 2018).

## 2. Autofagia

En 1933 el físico alemán Ernst Ruska construyó el primer microscopio electrónico de transmisión, con un poder de resolución, nunca antes alcanzado, que pronto acarrearía el desarrollo de nuevas técnicas de preparación de muestras para microscopía e innumerables descubrimientos citológicos. Ruska recibió el Premio Nobel de Física en 1986 gracias a su trabajo en óptica electrónica. A principios de la década de los cincuenta del siglo pasado, diferentes científicos comenzaron a utilizar el ácido ósmico como tampón de fijación y a embeber el tejido en plástico duro del que cortaban secciones muy finas (60-100 nm) mediante cuchillas de cristal. Estos avances permitieron a algunos biólogos celulares, entre los que se encontraba George Palade,

realizar importantes estudios celulares a nivel ultraestructural, que implicarían el comienzo de la investigación en el proceso autofágico, entre otros mecanismos celulares (Eskelinen et al., 2011).

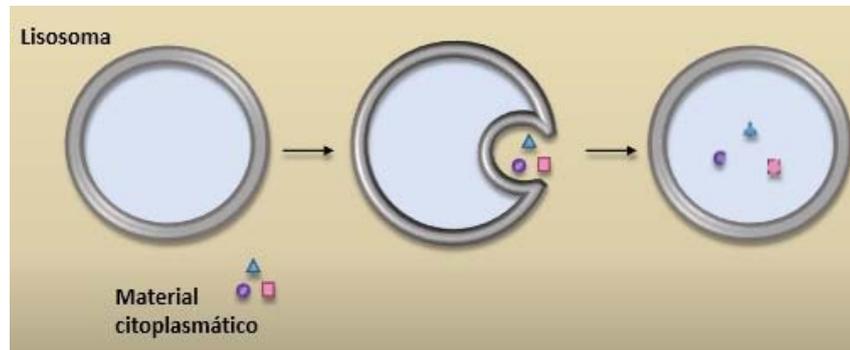
La palabra autofagia deriva del griego “*auto*” (a sí mismo) y “*phagia*” (comer), y fue utilizada por primera vez en 1963 por Christian de Duve, un citólogo y bioquímico inglés premiado en 1974 con el Nobel de Fisiología o Medicina, junto a George Palade y Albert Claude, gracias a sus estudios sobre los lisosomas. de Duve utilizó este término para referirse al fenómeno celular, que observó en células de mamífero, mediante el cual vesículas de membrana sencilla o doble englobaban fracciones del citoplasma y orgánulos, que eran digeridos posteriormente. Este proceso se podía diferenciar de la heterofagia porque, en esta última, las células degradan material extracelular (Ravikumar et al., 2010; Eskelinen et al., 2011).

Hoy en día, los científicos intentan descifrar los mecanismos mediante los cuales se produce esta vía autofágica. De hecho, en 2016, la Fundación Nobel entregó su premio en Fisiología o Medicina a Yoshinori Ohsumi por la identificación y caracterización de la maquinaria autofágica, en concreto por los genes *Atg* (*autophagy-related genes*). Actualmente, la autofagia se define como el proceso catabólico mediante el cual regiones del citoplasma de la célula, orgánulos, proteínas o patógenos intracelulares, son degradados en el lisosoma (Ravikumar et al., 2010). Existen tres tipos de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas y macroautofagia.

## 2.1. Microautofagia

La microautofagia es el proceso autofágico menos conocido hasta el momento. Aunque inicialmente se describió en el hígado de rata, la mayor parte de la caracterización de esta ruta se ha llevado a cabo en levaduras, y poco se conoce de esta vía en mamíferos. En la microautofagia, el material citoplasmático es captado directamente por lisosomas primarios preexistentes o por lisosomas secundarios, que modifican su forma esférica a formas alargadas, con brazos o invaginaciones (Figura 2). Tras ser secuestrado, el contenido citoplasmático se degrada rápidamente en el lumen lisosomal por hidrolasas, y el lisosoma vuelve a su morfología inicial redondeada, para

continuar con su ciclo. Estímulos como el déficit de nutrientes durante 48 horas induce cambios morfológicos a nivel de la membrana del lisosoma, pero se desconoce su influencia en la renovación proteica (Martinez-Vicente y Cuervo, 2007; Mijaljica et al., 2011).



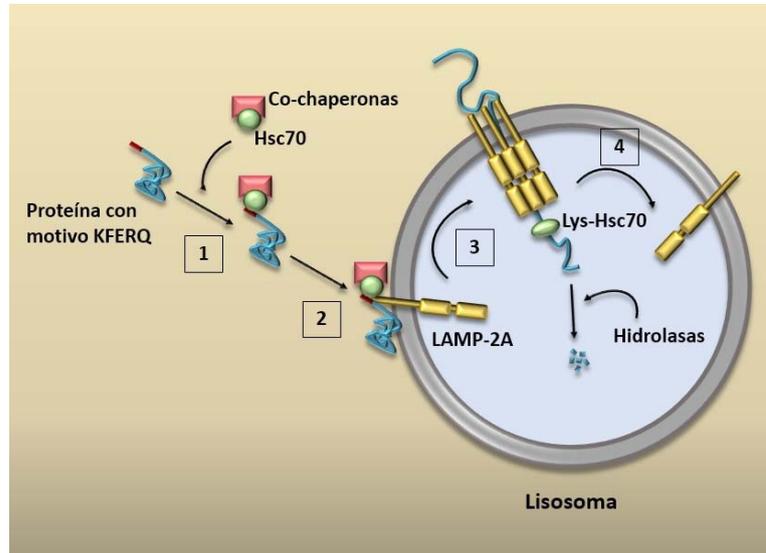
**Figura 2. Microautofagia.** El material citoplasmático es captado directamente por el lisosoma, y degradado en el lumen de este orgánulo mediante hidrolasas. Figura adaptada de Mizushima y Komatsu, 2011a.

## 2.2. Autofagia mediada por chaperonas

La autofagia mediada por chaperonas (CMA, del inglés *chaperon-mediated autophagy*), a diferencia de la microautofagia, solo se ha descrito en células de mamíferos (Cuervo y Wong, 2014; Cai et al., 2015). Es un proceso complejo mediante el cual las proteínas citosólicas con el motivo KFERQ son translocadas al interior del lisosoma, gracias al receptor lisosomal LAMP-2A, y degradadas por las hidrolasas (Figura 3).

Diferentes estudios han demostrado que cuando las células de mamíferos se encuentran en un estado de ayuno entre 8-10 horas, la autofagia mediada por chaperonas se activa, incrementándose la transcripción de LAMP-2A y de lys-Hsc70 (proteína de choque térmico lisosomal de 70 kDa). A su vez, la CMA tiene la función de eliminar proteínas dañadas o defectuosas para mantener la homeostasis celular, activándose ante el estrés oxidativo o la exposición a componentes tóxicos. Sin embargo, la inhibición de esta vía produce la acumulación de proteínas dañadas, disminuyendo la viabilidad celular y produciendo diferentes patologías, como la neurodegeneración (Cuervo y Wong, 2014; Cai et al., 2015).

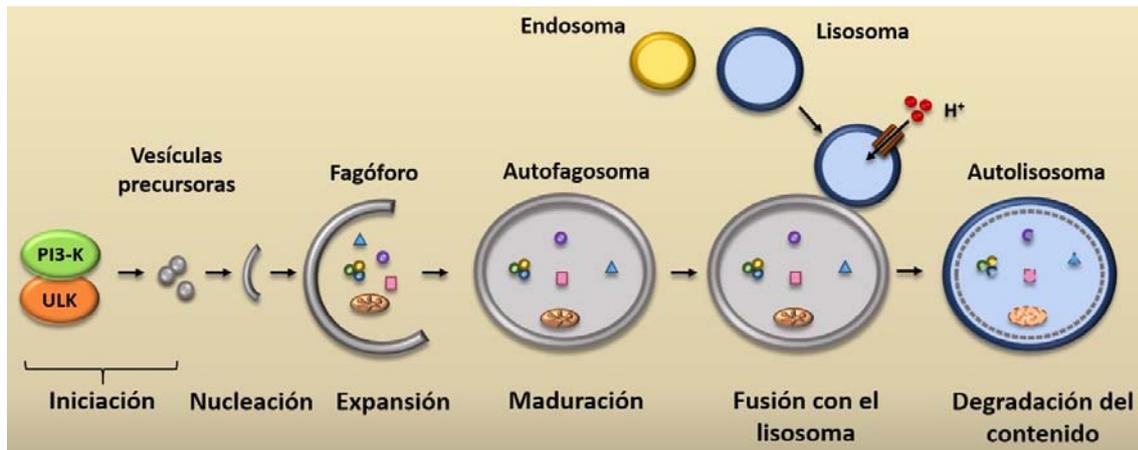
**Figura 3. Autofagia mediada por chaperonas.** (1) En el citoplasma celular se produce la conjugación entre Hsc70 (proteína de choque térmico de 70 kDa) y el motivo KFERQ de la proteína que se va a degradar. (2) Posteriormente, el complejo Hsc70-proteína se une a la cola citosólica de LAMP-2A (proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A), que se encuentra en la membrana lisosomal. (3) A continuación, se produce la multimerización de LAMP-2A, translocándose el sustrato al lumen lisosomal. (4) Por último, se desensambla el sustrato de LAMP-2A gracias a la lys-Hsc70, para volver a su estado monomérico y captar nuevos sustratos, mientras el sustrato inicial se degrada en el lumen del lisosoma por la acción de las hidrolasas. Figura adaptada de Cuervo y Wong, 2014.



### 2.3. Macroautofagia

La macroautofagia, a la cual nos referiremos en el resto del trabajo como autofagia, es un sistema celular que se encarga de la digestión y el reciclaje de proteínas y orgánulos defectuosos, así como de patógenos. Es un proceso fundamental para la supervivencia celular, ya que ayuda a mantener la homeostasis intracelular, degradando proteínas y estructuras celulares dañadas que tienden a formar agregados, interfiriendo en el adecuado funcionamiento celular. A su vez, posee un papel fundamental regulando el equilibrio energético ante el déficit de nutrientes, activándose poco después del ayuno y alcanzando su pico máximo tras 4-6 horas (Ravikumar et al., 2010; Mizushima et al., 2011; Lamb et al., 2013; Cuervo y Wong, 2014; Galluzzi et al., 2017; Yu et al., 2018).

Al igual que la microautofagia, la autofagia ha sido descrita tanto en mamíferos como en levaduras, y actualmente se conocen más de treinta genes que se encargan de regular la vía autofágica y sus diferentes etapas: iniciación, nucleación, expansión, maduración y fusión (Figura 4).



**Figura 4. Etapas de la vía autofágica.** La autofagia es una ruta compleja formada por varias etapas. La primera de ellas es la de iniciación, en la que se fusionan pequeños fragmentos de membrana de origen inexacto e interaccionan los complejos ULK y PI3-K. Durante la etapa de nucleación se reclutan las proteínas necesarias para que, en la siguiente fase, la expansión, la doble membrana del fagóforo se vaya elongando y englobando fracciones del citoplasma. Posteriormente, se produce la maduración del autofagosoma, ya formado, y la fusión con el lisosoma, para que en la última etapa se degraden los componentes citoplasmáticos. Figura adaptada de Menzies et al., 2015.

## Iniciación

La etapa de iniciación comienza con la fusión de pequeños fragmentos de membrana, de los que aún no se conoce con exactitud su procedencia. Hasta el momento, se han sugerido diferentes hipótesis sobre el origen de estas estructuras membranosas: su formación *de novo* a partir de precursores moleculares, o a partir de membranas ya preexistentes. Los estudios más recientes indican que el candidato más plausible para la formación del autofagosoma es el retículo endoplasmático, aunque se cree que también pueden ser importantes el aparato de Golgi, las mitocondrias, los endosomas y la membrana plasmática (Lamb et al., 2013).

Bajo condiciones en las que hay un déficit de nutrientes o bajo tratamiento con algunos fármacos, como la rapamicina, se produce la inactivación de mTORC1 y su disociación del complejo ULK. Posteriormente, ULK se transloca en el retículo endoplasmático, lo que produce su activación y su posterior implicación en la regulación de otras proteínas clave en la vía de la autofagia como PI3-K. De esta forma se lleva a cabo la primera etapa de la vía autofágica (Ravikumar et al., 2010; Lamb et al., 2013).

### **Nucleación**

Durante la nucleación los complejos ULK y PI3-K fosforilan y reclutan diferentes proteínas entre las que se encuentran las ATG. Así se generan los omegasomas, estructuras de doble membrana que se forman en los dominios del retículo endoplasmático. Los omegasomas son estructuras muy curvadas, que favorecen la generación de cambios lipídicos en la composición del fagóforo, así como la exposición de proteínas que se encuentran en la membrana de este para reclutar a otras proteínas (Yu et al., 2018).

### **Expansión**

La tercera etapa de la autofagia es la expansión, en la que se lleva a cabo la elongación de la doble membrana del fagóforo. Durante esta fase se produce la lipidación de LC3 o MAP1LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) gracias a la implicación de las proteínas ATG4, ATG7, ATG3 y ATG16L, que transforman proLC3 en LC3-II en sucesivas reacciones, como se explicará más adelante (Ravikumar et al., 2010; Dooley et al., 2014; Schaaf et al., 2016).

### **Maduración y fusión**

El ayuno produce el agrupamiento de lisosomas en la zona perinuclear, a causa de cambios en el pH intracelular. Por otro lado, los autofagosomas se forman en las zonas más periféricas de la célula, por lo que son desplazados bidireccionalmente a lo largo de los microtúbulos y dirigidos hacia los endosomas, con los que se fusionarán primero, y finalmente, con los lisosomas (Yu et al., 2018). Para que se produzca la fusión entre estas vesículas es necesario que se fusionen sus paredes membranosas entre sí. En este proceso intervienen diferentes proteínas como las proteínas SNARE (*Soluble NSF attachment protein*) o LC3 (Ravikumar et al., 2010; Galluzzi et al., 2017; Yu et al., 2018).

Los lisosomas contienen en su membrana ATPasas que bombean protones hacia el interior del orgánulo, acidificando el lumen y activando diferentes hidrolasas. Tras la acidificación del lisosoma, se produce la fusión con el autofagosoma, que da lugar a una nueva vesícula denominada autolisosoma, en la que será degradado el contenido

citoplasmático por las hidrolasas ya activadas (Klionsky et al., 2014; Galluzzi et al., 2017).

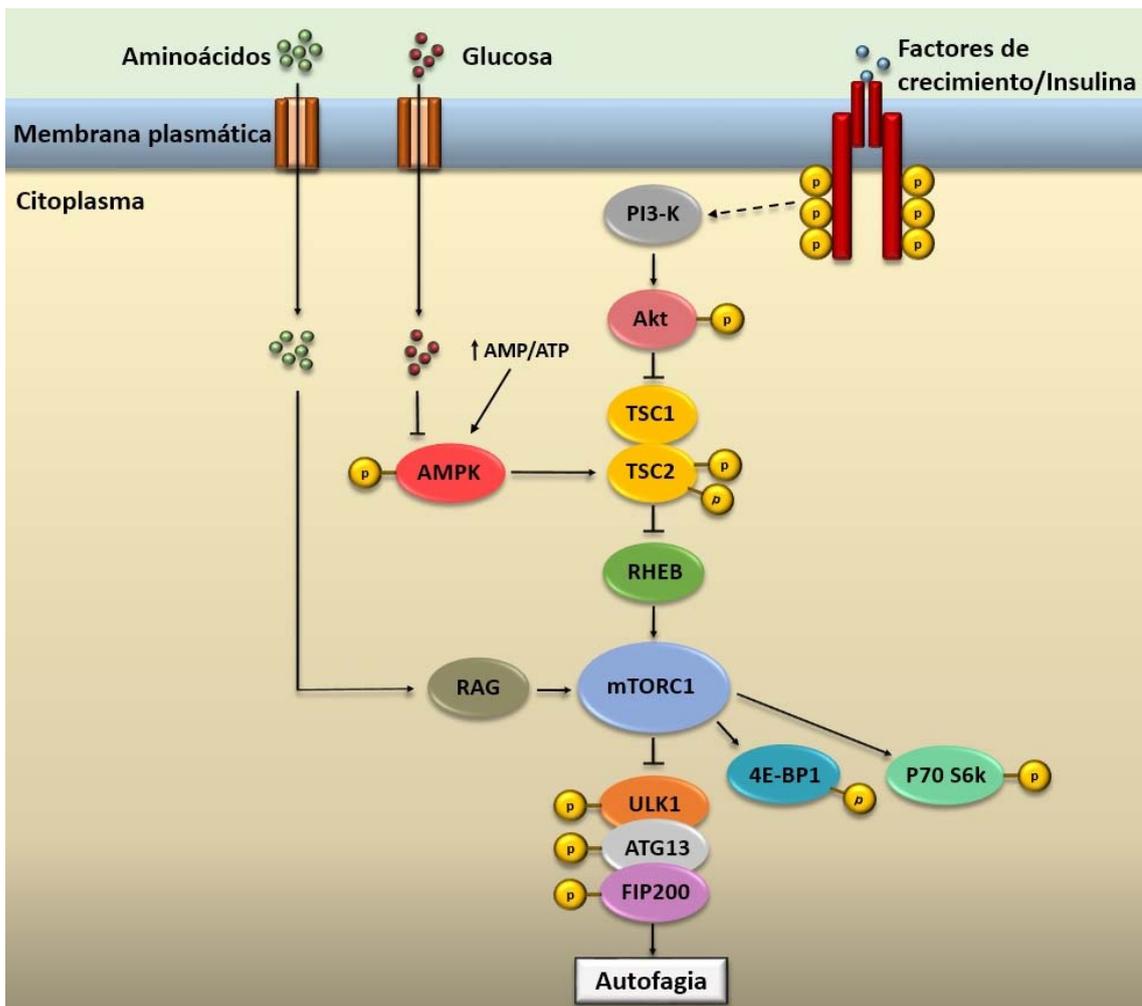
### 2.4. Regulación de la autofagia

La autofagia se encuentra activada de forma continua, manteniendo unos niveles basales. Sin embargo, ante el déficit de nutrientes, la disminución del balance energético o la hipoxia, dicha activación se ve incrementada gracias a la acción de diferentes proteínas que inducen la autofagia de forma rápida (Ravikumar et al., 2010; Kim et al., 2013; Lamb et al., 2013; Wirth et al., 2013; Klionsky et al., 2016) (Figura 5). El inicio de la autofagia se produce antes de que los recursos energéticos se hayan agotado completamente. De hecho, en varios estudios con ratones se ha demostrado que, tras un ayuno de 24 horas, los niveles de autofagia estaban aumentados en muchos tejidos, aunque tuvieran suficientes reservas de lípidos. Debido a esto, se cree que los aminoácidos derivados de la autofagia se pueden utilizar para sintetizar proteínas esenciales durante la adaptación al ayuno (Mizushima y Komatsu, 2011a).

La vía de mTOR es una de las más estudiadas como reguladora de la autofagia. mTOR está formado por dos complejos: mTORC1 (regulador directo de la vía autofágica) y mTORC2, que difieren en sus componentes, en su función y en su regulación (Ravikumar et al., 2010; Kim et al., 2013; Lamb et al., 2013). Existen diferentes señales que regulan el inicio de la autofagia a través de mTORC1, como el estado energético, los aminoácidos, la glucosa, los factores de crecimiento, el estrés o algunos fármacos, entre los que se encuentra el antibiótico rapamicina (aislado de *Streptomyces hygroscopicus*) (Ravikumar et al., 2010; Kim et al., 2013; Lamb et al., 2013).

En condiciones en las que hay abundancia de nutrientes, los aminoácidos se acumulan en el lisosoma de la célula, reclutándose y anclándose mTORC1 a la membrana del lisosoma. Posteriormente, mTORC1 se une al complejo ULK y lo inactiva, de forma que la vía autofágica no se lleva a cabo (Wirth et al., 2013). Sin embargo, ante un déficit de aminoácidos en el lisosoma, mTORC1 no puede ser reclutado hacia la membrana de este orgánulo, por lo que se disocia del complejo ULK

(Lamb et al., 2013). En ese momento, se fosforilan las proteínas que forman parte del complejo ULK, activándose, lo que conlleva el inicio de la autofagia (Ravikumar et al., 2010; Wirth et al., 2013). Una vez se hayan reestablecido los niveles adecuados de aminoácidos, se vuelve a reactivar mTORC1, inhibiéndose la ruta autofágica. Algunos estudios han demostrado que el ayuno prolongado puede regular a los transportadores de aminoácidos en la membrana plasmática, acumulándose los aminoácidos en el interior celular y contribuyendo a la reactivación de mTORC1 (Yu et al., 2018).



**Figura 5. Regulación de la autofagia.** Bajo condiciones en las que hay abundancia de nutrientes, los aminoácidos se acumulan en el lisosoma y se activa el complejo RAG en la membrana lisosomal, lo que produce el reclutamiento de mTORC1 y su unión al complejo ULK, inactivándolo. En condiciones en las que hay déficit de aminoácidos, RAG se inactiva y se produce la disociación de mTORC1 del complejo ULK (formado por ULK1, ATG13 y FIP200). De esta forma, ULK1 se autofosforila y fosforila a ATG13 y a FIP200, activándose la autofagia. Por otro lado, ante un balance energético en el que la relación AMP/ATP se encuentra disminuida, se fosforila y activa AMPK, fosforilando y activando, a su vez, a TSC2 para inhibir a mTORC1. Figura adaptada de Ravikumar et al., 2010.

Otro de los factores que regula la vía autofágica es el estado energético. Uno de los sensores principales capaz de detectar el balance entre AMP y ATP es la quinasa AMPK. Cuando la relación AMP/ATP se incrementa, y se produce una reducción del nivel energético, AMPK se fosforila y activa, fosforilando y activando, a su vez, a TSC2. La activación de TSC2 conlleva la inhibición de RHEB y, en consecuencia, de mTORC1, induciéndose la autofagia para recuperar los niveles energéticos (Lamb et al., 2013; Wirth et al., 2013). En otras ocasiones, AMPK puede también inhibir a mTORC1 o activar directamente a ULK1 ante el déficit de aminoácidos o de glucosa (Gwinn et al., 2008; Egan et al., 2011). Una vez reestablecidos los niveles energéticos se produce la reactivación de mTORC1, que vuelve a conjugarse con ULK1 inhibiéndose la autofagia (Galluzzi et al., 2017).

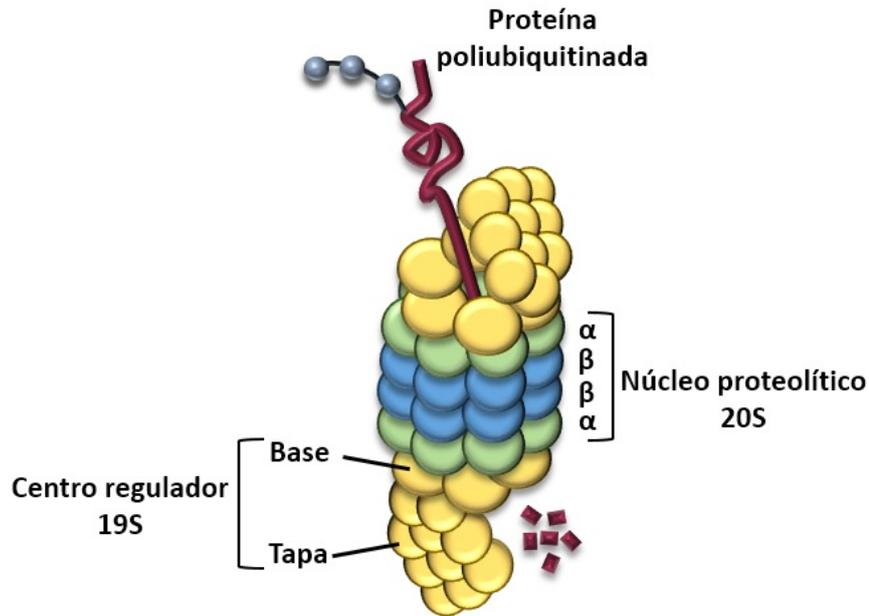
La vía de AMPK se activa para reestablecer el equilibrio energético cuando los niveles de ATP disminuyen, y esto se puede producir por un déficit de nutrientes o por un incremento del gasto energético, por ejemplo, al realizar un entrenamiento aeróbico. Se ha observado que tanto el ejercicio de fuerza como el de resistencia son capaces de inducir la vía autofágica, aunque aún no se conoce si se debe a la acción directa de la contracción del músculo esquelético o a consecuencia de cambios metabólicos indirectos (Grumati et al., 2011; Vainshtein y Hood, 2016). Por ello, diversos trabajos han estudiado el efecto del ejercicio en el músculo esquelético de diferentes modelos de roedores, confirmando que el ejercicio incrementa los niveles de autofagia en este tejido (He et al., 2012a; Lira et al., 2013; Luo et al., 2013; Lo Verso et al., 2014; White et al., 2016; Martin-Rincon et al., 2018). Sin embargo, el ejercicio físico no solo actúa a nivel del músculo esquelético, sino que produce efectos a nivel sistémico, por lo que su inducción de la vía autofágica se ha observado en otros órganos y tejidos como el cerebro (He et al., 2012b; Bayod, et al., 2014).

Otras señales que regulan la autofagia a través de la vía de mTORC1 son los factores de crecimiento o algunas hormonas, como la insulina. Cuando estas moléculas se unen a su receptor específico se activa una cascada que produce la fosforilación y activación de PI3-K y de Akt. A su vez, Akt inhibe a TSC2 para que se active mTORC1 y no se pueda inducir la autofagia (Ravikumar et al., 2010; Lamb et al., 2013).

## 2.5. El sistema ubiquitina-proteosoma y la autofagia selectiva

La degradación proteica es esencial para mantener la homeostasis celular, por lo que, además de la autofagia, existen diversos sistemas celulares que la regulan. Cuando hay presencia de proteínas mal plegadas en el citoplasma, estas son marcadas mediante ubiquitinación para su posterior degradación. La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos que presenta un aminoácido glicina unido al extremo carboxilo. Esta glicina se une covalentemente a los grupos  $\epsilon$ -amino de varias lisinas de la proteína que se va a degradar (Schreiber y Peter, 2014). Para que la ubiquitina se una a su proteína diana es necesario que se produzca una cascada de tres reacciones consecutivas. En la primera, una enzima E1 se une a la proteína ubiquitina para activarla. En la segunda reacción, la ubiquitina es conjugada mediante otra familia de enzimas (E2). Por último, en la tercera reacción química, la familia de ligasas E3 cataliza la transferencia de la ubiquitina, desde E2 a un grupo  $\epsilon$ -amino de una de las lisinas de la proteína que se degradará. A su vez, al extremo amino-terminal de la ubiquitina, se puede unir otra molécula de ubiquitina, para formar una cadena de poliubiquitinas (Korolchuk et al., 2009; Schreiber y Peter, 2014). Hasta hace algunos años se creía que, para que ocurriera la degradación de estas proteínas, era necesario que se hubiese formado una cadena de poliubiquitinas. Sin embargo, en la última década se descubrió que las proteínas de pequeño tamaño son marcadas mediante monoubiquitinación para ser degradadas en el proteosoma (Shabek et al., 2012).

El proteosoma 26S es una proteasa que se encuentra en el citoplasma y en el núcleo de la célula, y se encarga de degradar proteínas de vida media corta. Está formado por la subunidad 20S, que es el núcleo proteolítico, y por dos centros reguladores 19S (Figura 6). El núcleo proteolítico es una estructura con forma de canal formada por cuatro anillos heptaméricos, dos de los cuales presentan siete subunidades tipo alfa y los otros dos de tipo beta. Además, los residuos catalíticos del núcleo 20S se encuentran situados en la zona interna del canal central de la estructura. Por otro lado, los centros reguladores 19S se encuentran en ambos extremos del proteosoma regulando la entrada de proteínas. La partícula 19S está formada por una tapa, que se encarga del reciclaje de la ubiquitina, y una base consistente en seis ATPasas que catalizan el despliegue del sustrato para que se desplace hacia el núcleo 20S, donde se degrada (Chowdhury y Enenkel, 2015).



**Figura 6. Estructura del proteosoma 26S.** El proteosoma 26S es una proteasa encargada de degradar proteínas marcadas con moléculas de ubiquitina. Está formado por un núcleo proteolítico 20S, cuya función es la de catalizar las proteínas, y por dos centros reguladores 19S, que controlan la entrada de la proteína en el proteosoma, así como del reciclaje de las ubiquitinas. Figura adaptada de Lub et al., 2016.

Al igual que ocurre con la degradación de proteínas en el proteosoma, la ubiquitina puede marcar sustratos que necesitan degradarse por autofagia selectiva (Johansen y Lamark, 2011). En este caso, las proteínas que se degradan tienen una vida media mayor y, al permanecer más tiempo en el citoplasma, a veces forman agregados. Debido a esto, la autofagia es capaz de degradar proteínas de mayor tamaño y complejidad que el proteosoma 26S no es capaz de procesar, como es el caso de agregados proteicos, orgánulos defectuosos o patógenos (Schreiber y Peter, 2014). El reconocimiento de estructuras marcadas con ubiquitina, que se deben degradar por autofagia selectiva, se ha detectado en eucariotas superiores, pero no en levaduras, y para que se lleve a cabo es necesario que entren en acción proteínas adaptadoras, como p62 (también denominada SQSTM1, del inglés *sequestosome 1*).

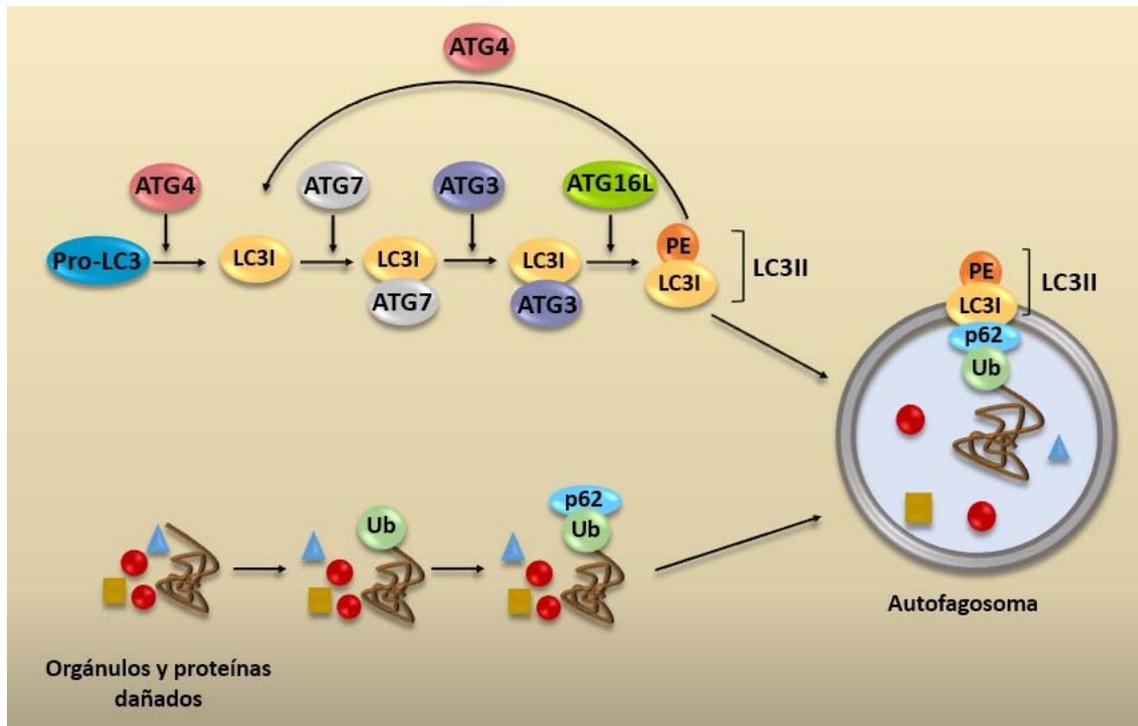
La proteína celular p62 se expresa en metazoos, pero no en plantas ni en hongos, y posee varias funciones bioquímicas diferentes, formando parte de la regulación de

funciones celulares esenciales, como el estrés celular, la supervivencia, la muerte celular o la inflamación (Moscat y Díaz-Meco, 2009; Komatsu e Ichimura, 2010; Mizhusima y Komatsu, 2011). A su vez, también está involucrada en la eliminación de proteínas marcadas con ubiquitina durante la autofagia, así como en la adipogénesis y el control energético (Komatsu e Ichimura, 2010; Moscat y Díaz-Meco, 2011). Está formada por 440 aminoácidos y contiene un dominio PB1 en su extremo amino-terminal (dominio de auto-oligomerización), seguido por un motivo dedo de zinc tipo ZZ, y un dominio UBA, encargado de la unión con ubiquitina, en su extremo carboxi-terminal (Birgisdottir et al., 2013). Gracias a que presenta múltiples motivos de interacción proteína-proteína es capaz de unirse a distintas proteínas, entre las que se encuentra LC3 (Bjorkoy et al., 2005; Noda et al., 2008).

LC3 es una proteína perteneciente a la familia de las proteínas Atg8. Los mamíferos presentan 7 homólogos dentro de este grupo de proteínas: LC3A o MAP1LC3A (*microtubule-associated protein 1 light chain 3 $\alpha$* ), que presenta dos variantes de *splicing* (LC3A-a y LC3A-b); LC3B, también denominada MAP1LC3B (*microtubule-associated protein 1 light chain 3 $\beta$* ); LC3C o MAP1LC3C (*microtubule-associated protein 1 light chain 3 $\gamma$* ); GABARAP (*GABA type A receptor-associated protein*); GABARAPL1 o *gec1* (*GABARAP-like 1*) y GABARAPL2 o GATE16 (*GABARAP-like 2*). Estas proteínas se sintetizan a partir de transcritos separados, sin embargo, comparten secuencias muy similares. Todas ellas poseen una glicina muy conservada, así como un núcleo ubiquitina en su extremo carboxi-terminal. Por otro lado, presentan dos hélices  $\alpha$  en el extremo amino-terminal (Schaaf et al., 2016). De todas estas proteínas, la más estudiada y mejor comprendida es LC3B. Debido a esto, se suele utilizar como marcador para analizar la actividad autofágica (Klionsky et al., 2016).

La proteína LC3 se localiza en el citoplasma de las células y presenta diferentes isoformas hasta formar parte de la membrana del autofagosoma. Se encuentra libre en el citoplasma en forma de pro-LC3 y se transforma en LC3-I tras sufrir una proteólisis por parte de la cisteín-proteasa ATG4 (Ravikumar et al., 2010; Schaaf et al., 2016). Posteriormente, es activada por ATG7 y, a continuación, se fosfolipida al conjugarse con fosfoetanolamina (PE), en una reacción en la que está involucrada ATG3 (Dancourt

y Melia, 2014). Una vez fosfolipidada, se transforma en LC3-II, la cual se ancla a la membrana del fagóforo (Figura 7).



**Figura 7. Degradación de un agregado proteico ubiquitinado mediante autofagia.** La proteína ATG4 proteoliza a pro-LC3 transformándose en LC3-I que, a través de varias reacciones consecutivas en las que intervienen ATG7 y ATG3, es fosfolipidada por fosfoetanolamina (PE), convirtiéndose en LC3-II. Esta proteína se ancla a la membrana del autofagosoma y participa en la elongación del fagóforo, así como en la maduración del autofagosoma y la fusión con el lisosoma. Por otro lado, en el citoplasma celular se encuentra material celular, como agregados proteicos marcados con ubiquitina, que deben ser degradados en la vía autofágica. Para ello, la proteína p62 se conjuga con la ubiquitina, y ambas, junto con el contenido a degradar, son dirigidas hacia el interior del fagóforo, anclándose a LC3-II para ser degradadas. Figura adaptada de Ravikumar et al., 2010 y de la *web* de Novus Biologicals.

LC3-II se localiza en la doble membrana del fagóforo, facilitando el reclutamiento de otras proteínas para que se lleve a cabo la etapa de elongación. A su vez, está involucrada en la maduración del autofagosoma, así como en la fusión con el endosoma y el lisosoma, en las que interactúa con algunas proteínas como las SNARE (Schaaf et al., 2016; Reggiori y Ungermann, 2017, Yu et al., 2018).

Cuando hay presencia de agregados proteicos ubiquitinados en el citoplasma celular, que se deben degradar mediante autofagia, el dominio UBA de p62 se conjuga con la ubiquitina y todo el sistema es transportado hacia el interior del fagóforo, que se encuentra en la fase de elongación (Figura 7). A continuación, una región de p62, aún desconocida, que se encuentra entre los dedos de zinc y el domino UBA, se une al motivo LIR de LC3-II, quedando anclado hasta que el autofagosoma haya englobado todo el contenido citoplasmático. Finalmente, tanto el agregado proteico, como la ubiquitina, p62 y la porción de LC3-II que se encuentra en la cara interna del autofagosoma, son degradados en el lisosoma (Komatsu e Ichimura, 2010; Johansen y Lamark, 2011; Schreiber y Peter, 2014). Sin embargo, la región de LC3-II que está en la cara citoplasmática queda libre en el citosol, gracias a que la proteína ATG4 la deslipida. De esta forma LC3-II adopta su forma LC3-I y es reciclada para volver a intervenir en la autofagia de nuevo (Komatsu e Ichimura, 2010; Ravikumar et al., 2010).

Se ha demostrado que el bloqueo o el déficit de los sistemas que regulan la proteostasis celular, como los diferentes tipos de autofagia o el sistema ubiquitina-proteosoma, está relacionado con la acumulación de material de desecho que rompe la homeostasis celular. Por eso, el mantenimiento de la proteostasis es esencial para la conservación de las funciones de la célula, así como de su supervivencia, y si estos sistemas fallan, se pueden producir diferentes patologías (Mizushima y Komatsu, 2011). De hecho, la disminución de los sistemas proteostáticos está relacionada con el envejecimiento (López-Otín et al., 2013, 2016).

El déficit de los sistemas celulares encargados de la degradación y el reciclaje de compuestos dañinos intracelulares está acompañado de la acumulación de agregados que contienen p62 y ubiquitina, lo cual está relacionado con la aparición de enfermedades, principalmente las enfermedades neurodegenerativas (Zatloukal et al., 2002; Bjorkoy et al., 2005). Las neuronas se caracterizan por presentar grandes extensiones citoplasmáticas (dendritas y axones) en las que se acumulan productos de desecho. Sin embargo, los autofagosomas formados en los extremos de los axones y las dendritas son transportados hacia el soma, donde se encuentran localizados los lisosomas, pudiendo así eliminar los materiales potencialmente tóxicos (Nixon, 2013). Esto hace que las neuronas sean altamente dependientes del correcto funcionamiento de la autofagia, frente a otros tipos celulares con un nivel de proliferación mayor, ya que

ello les permite diluir el efecto de la acumulación de orgánulos y proteínas defectuosos (Nixon, 2013).

En muchos casos se ha visto que la autofagia se ve afectada en los procesos neurodegenerativos, tanto en sus etapas iniciales como en las finales, favoreciendo la acumulación de proteínas tóxicas (Nixon, 2013). En modelos animales se ha observado que mutaciones en los genes involucrados en la autofagia pueden disminuir los niveles de esta vía de degradación (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006), mientras que, en otras ocasiones, las altas concentraciones de proteínas características de las enfermedades neurodegenerativas (péptido  $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína, etc.) son las que interfieren, bloqueando el sistema o inhibiendo la acción de las proteínas autofágicas (Martínez-Vicente y Cuervo, 2007; Cuervo y Wong, 2014; Yamamoto y Yue, 2014; Menzies et al., 2015). La autofagia es un sistema que disminuye con la edad, y que es vulnerable en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson o de Huntington, patologías que, a su vez, están asociadas al envejecimiento (López-Otín et al., 2013). Por todo ello, en los últimos años se ha estudiado cómo se podrían reducir los agregados proteicos y otros desechos intracelulares mediante la utilización de fármacos, para tratar de revertir el descenso de la actividad de los sistemas proteolíticos (Menzies et al., 2015).

### **2.6. Modelos murinos carentes de autofaginas**

En la autofagia están implicados un gran número de genes, algunos de los cuales han sido clasificados en grupos, como es el caso de los *ATG*. Hasta el momento se han identificado 41 genes pertenecientes a la familia de los *ATG* en levaduras, muchos de los cuales presentan su ortólogo en mamíferos. Gracias a esto, se han podido generar diversos modelos de ratón carentes de algunos *Atg*, que han permitido conocer mejor tanto el papel fisiológico de estos genes *in vivo* como el de la vía autofágica (Mizushima et al., 2011b; Kuma et al., 2017). Hasta 2004 varios autores habían intentado generar ratones *knockout* para algún gen *Atg*, como *Beclin 1*, pero estos animales morían durante el desarrollo embrionario (Yue et al., 2003). El primer modelo de ratón *knockout* (*atg5<sup>-/-</sup>*) fue generado por Kuma y colaboradores (2004). Con este estudio se

demonstró que la autofagia es esencial para la supervivencia postnatal, ya que la mayoría de los animales no fueron capaces de superar el primer día de vida y ninguno sobrevivió tras nueve días. Esto se debe a que la autofagia se induce de forma masiva inmediatamente después del nacimiento, para revertir el estado de ayuno tras la interrupción repentina de la fuente transplacentaria de nutrientes. Además, observaron que estos ratones *atg5<sup>-/-</sup>* presentaban unos niveles de LC3-II reducidos, mientras que los de LC3-I estaban incrementados, lo que supone que la lipidación de LC3 se encuentra disminuida, no pudiéndose formar los autofagosomas y quedando bloqueada la vía autofágica.

Por otro lado, se han realizado estudios para conocer cómo afecta el déficit de autofagia específicamente en las neuronas. Se ha demostrado que los ratones *atg5<sup>-/-</sup>* presentaban crecimiento retardado, así como afectación neurológica y un descenso de la supervivencia pocas semanas después del nacimiento. Además, mostraron un déficit progresivo a nivel motor y de comportamiento (temblores, ataxia, deterioro de la fuerza de agarre y disminución de la coordinación motora y del equilibrio). A nivel histológico se detectó una pérdida del número de neuronas, tanto a nivel de células piramidales en la corteza cerebral como de células de Purkinje en el cerebelo. En este último tipo celular también se observaron cambios morfológicos, presentando núcleos excéntricos e inflamación axonal, y niveles altos de apoptosis en las células granulares del cerebelo. También se describió, en el citoplasma de algunas neuronas, la acumulación de proteínas anormales y cuerpos de inclusión, con altos niveles de ubiquitina, asociados al envejecimiento del animal (Hara et al., 2006).

Otro modelo murino con déficit completo de autofagia, específicamente en células nerviosas, fue el *atg7<sup>-/-</sup>* generado por Komatsu y colaboradores (2006). Estos ratones presentaron, al igual que los *atg5<sup>-/-</sup>*, un retraso en el crecimiento y una supervivencia muy reducida a partir de las cuatro semanas de vida, sin que ninguno superara las veintiocho semanas de edad. También presentaron graves déficits motores y de comportamiento, manifestando temblores, problemas de coordinación motora y de patrón de la marcha. Los análisis histológicos mostraron una señal incrementada de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) en la corteza cerebral y una fuerte disminución del número de células piramidales, tanto en esta región cerebral como en el hipocampo, así como de las células de Purkinje a nivel del cerebelo. Por otro

## Introducción

lado, describieron un aumento de células apoptóticas en la corteza cerebral y en la capa granular del cerebelo, además de agregados proteicos con acúmulo de ubiquitina en diversas áreas cerebrales, dependientes de la edad. A diferencia de los *atg5<sup>-/-</sup>*, en estos animales solo se pudo detectar LC3-I; no había presencia de LC3-II, por lo que la lipidación de LC3 estaba bloqueada completamente.

En otro modelo *knockout* para *Atg7*, específicamente en células de Purkinje, se observó que esta delección producía distrofia axonal, con la consecuente degeneración celular. Estos ratones presentaron inflamación en axones situados en los núcleos cerebelosos. A diferencia de los dos modelos anteriores, no se observaron desórdenes severos a nivel de locomoción y coordinación hasta el año de edad. No encontraron marcaje frente a LC3, sin embargo, los niveles de p62 estaban incrementados (Komatsu et al., 2007), lo que indica que esta proteína se encontraba acumulada en los axones de las células de Purkinje, siendo la causa de la distrofia axonal y su consecuente degeneración celular.

Dependiendo del gen delecionado el tiempo de supervivencia es mayor o menor. En el caso de los animales *beclin 1<sup>-/-</sup>*, se produce la muerte en el útero materno durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, los *atg5<sup>-/-</sup>* diseñados por Kuma y colaboradores (2004) morían en su mayoría tras el primer día de vida. Otros modelos murinos en los que se elimina un gen *Atg*, que presenta genes parálogos, sufren un déficit parcial de autofagia que les permite tener una esperanza de vida aparentemente normal. Este es el caso de los ratones *atg4b<sup>-/-</sup>*, *atg4c<sup>-/-</sup>* y *atg4d<sup>-/-</sup>* (Mariño et al., 2007<sup>\*</sup>; Mariño et al., 2010; Kuma et al., 2017).

La proteína Atg4 es una cisteín-proteasa de mamíferos encargada de proteolizar al precursor de LC3 (pro-LC3) para que se transforme en LC3-I, así como de deslipidar a LC3-II para que vuelva a su conformación de pro-LC3. Atg4 posee cuatro parálogos (Atg4a, Atg4b, Atg4c y Atg4d) que intervienen a diferentes niveles durante el procesamiento de LC3 (Kauffman et al., 2018; Agrotis et al., 2019).

<sup>\*</sup> Este artículo ha sido retractado durante la redacción de esta Tesis, no existiendo otros trabajos similares. Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, López-Otín C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. JBC. 2007; 282(25):18573-83.

Se ha visto que los ratones *atg4c*<sup>-/-</sup> presentan fenotipo, crecimiento y tasa de supervivencia normales. Además, las hembras no tienen problemas de fertilidad. Todos estos datos demuestran que, a diferencia de los ratones *atg5*<sup>-/-</sup>, la proteína Atg4c no es esencial para que se produzca un desarrollo normal, así como tampoco para inducir de forma masiva la autofagia inmediatamente después del nacimiento de los ratones. Sin embargo, cuando se sometió a los animales a periodos de inanición, los *atg4c*<sup>-/-</sup> mostraron una reducción de la movilidad con respecto a los controles, y algunos murieron tras las 48 horas de ayuno. En este caso, se observó que el cociente de LC3-II/LC3-I estaba disminuido en el tejido muscular de los ratones *atg4c*<sup>-/-</sup>. Por otro lado, se ha visto que estos animales desarrollan mayor número de fibrosarcomas cuando se les expone ante carcinógenos químicos (Mariño et al., 2007\*).

Los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> presentaron un desarrollo aparentemente normal, alcanzando la edad adulta sin una tasa de mortalidad elevada. A su vez, también fueron fértiles y no presentaron alteraciones llamativas a nivel histopatológico ni bioquímico. Sin embargo, aproximadamente el 25 % de los *atg4b*<sup>-/-</sup> mostraban problemas al desplazarse, se arrastraban, caminaban hacia atrás y realizaban movimientos circulares. En ellos se detectó que sufrían un desarrollo anormal de las otoconias, lo que les producía problemas para mantenerse en el agua; no eran capaces de nadar ni flotar y se encontraban desorientados. A nivel celular, se observó que los *atg4b*<sup>-/-</sup> presentaban bajos niveles de LC3-II y acumulación de pro-LC3 en varios tejidos. De hecho, en los análisis por *Western blot* (WB) se detectaron diferentes bandas, correspondientes a distintas isoformas de LC3, lo que sugirió que la maduración estaba reducida en los *knockout*. Además, estos animales presentaron niveles elevados de p62 y ubiquitina, lo que se confirmó a nivel histológico al detectar agregados de p62 y de proteínas ubiquitinadas (Mariño et al., 2010).

Todos estos datos sugieren que el déficit total de autofagia afecta al desarrollo y la viabilidad de los ratones, pudiendo ser letal durante el desarrollo embrionario o en las primeras semanas de vida. A su vez, el bloqueo de esta vía de degradación produce acumulación de proteínas que no se pueden eliminar y que forman agregados muy tóxicos para las neuronas, característicos de las enfermedades neurodegenerativas. Por ello, estos animales sufren problemas motores, de equilibrio y de comportamiento (Hara

et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Komatsu et al., 2007). Sin embargo, el déficit parcial de autofagia no parece comprometer la supervivencia ni el crecimiento de estos animales, aunque en algunos casos también aparecieron problemas motores y de equilibrio asociados a situaciones de estrés, por ejemplo, someterlos a la actividad de nadar (Mariño et al., 2010).

El interés de los modelos animales *knockout* para alguno de los parálogos de *Atg4* (*atg4b*<sup>-/-</sup>, *atg4c*<sup>-/-</sup> o *atg4d*<sup>-/-</sup>) es que su déficit parcial de autofagia es equiparable a los niveles de autofagia presentes a edades avanzadas en humanos, debido a que esta vía de degradación disminuye su actividad con la edad (López-Otín et al., 2013). Además, el cerebro es uno de los órganos más vulnerables ante la disminución o la desregulación de la vía autofágica no solo en ratones (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Komatsu et al., 2007) sino también en humanos. De hecho, la acumulación de autofagosomas se ha descrito en diversos trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson o de Huntington (Nixon, 2013). Se ha visto que el bulbo olfatorio, el hipocampo y la corteza cerebelosa son zonas del encéfalo muy propensas a sufrir la acumulación de autofagosomas, en comparación con otras. A su vez, debido a la implicación del hipocampo en la memoria, se ha demostrado que la desregulación de la autofagia puede afectar a este nivel (Soontornniyomkij et al., 2012).

### 3. El sistema nervioso

El sistema nervioso nos permite estar en constante conexión con el medio que nos rodea y con el medio interno. Captamos información a través de los receptores sensitivos y sensoriales, la cual viaja por diferentes vías hasta alcanzar los centros nerviosos donde se procesa, dando lugar a distintas percepciones, algunas de las cuales se almacenan en la memoria. A su vez, el sistema nervioso también está implicado en la realización de movimientos, coordinando la contracción de diversos grupos musculares, así como en la secreción endocrina, exocrina y paracrina de diversas células. Para que se lleven a cabo estas funciones es necesario el correcto funcionamiento de las células que integran este sistema, las neuronas y las células gliales, así como de las conexiones entre ellas (Cardinalli, 2010).

En una neurona se pueden distinguir cuatro regiones principales: el soma o cuerpo celular, las dendritas, el axón y los terminales sinápticos (Cardinalli, 2010). Estas estructuras permiten clasificar dos áreas en el sistema nervioso: la sustancia blanca y la sustancia gris. La sustancia blanca está integrada por axones recubiertos de mielina y se asocia con la transmisión de información. Las vainas de mielina que recubren las fibras poseen gran cantidad de material lipídico que les confiere el color blanco. Por otro lado, la sustancia gris está compuesta por agrupaciones de cuerpos neuronales y dendritas, y por ello se la relaciona con el procesamiento de la información. Tanto los cuerpos neuronales como las dendritas no están recubiertos de mielina, por lo que tiene color gris. En el cerebro la sustancia blanca se localiza en las regiones más internas, mientras que la sustancia gris se encuentra situada en la corteza y en los núcleos (Snell, 2007).

Existen tres tipos de corteza cerebral en los mamíferos: neocorteza, paleocorteza y archicorteza. La neocorteza es la más extensa y la que aparece en etapas más tardías de la evolución filogenética, mientras que las dos últimas son las regiones corticales filogenéticamente más antiguas: la paleocorteza se encuentra en zonas de la base del telencéfalo y la archicorteza corresponde a regiones del sistema límbico, entre las que se encuentra el hipocampo (Redolar-Ripoll, 2010).

### **3.1. El hipocampo**

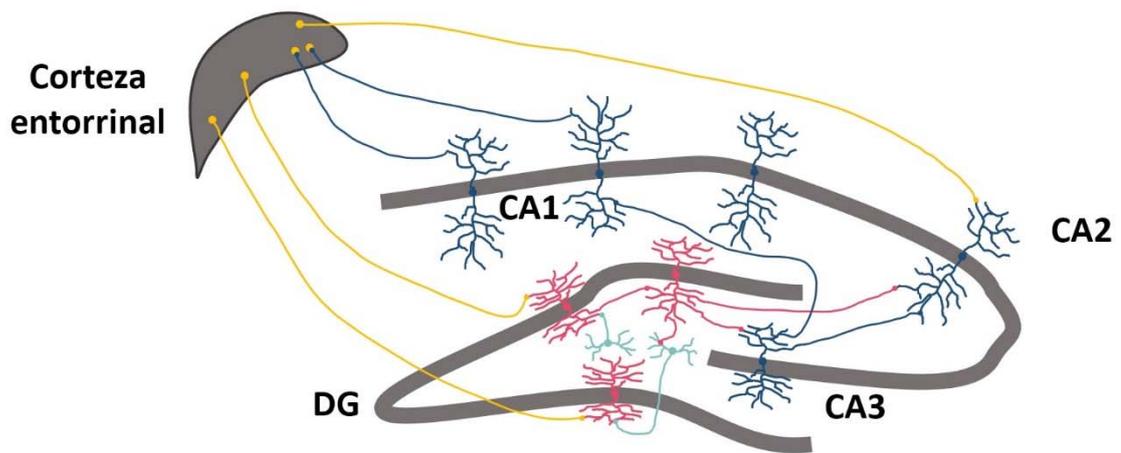
El hipocampo forma parte del sistema límbico, y es la estructura cerebral encargada de la memoria espacial (Kosaki et al., 2014), la memoria episódica (Burgess et al., 2002) y la discriminación (Schmidt et al., 2012). Se encuentra localizado en la región temporal medial, haciendo relieve en el ventrículo, y presenta forma alargada y curvada en mamíferos. En roedores se dispone a lo largo del eje dorso-ventral, mientras que en humanos lo hace en el eje antero-posterior (Strange et al., 2014). Recientemente, se ha observado que existen diferencias funcionales entre la región dorsal (o anterior) y la ventral (o posterior), así como la conexión con otras áreas cerebrales. Las regiones dorsales se han asociado, principalmente, a procesos de aprendizaje y memoria, mientras que las ventrales se relacionan con procesos emocionales, afectivos o de

## Introducción

ansiedad, lo que demuestra que existe una especialización en las diferentes regiones que forman esta estructura (Fanselow y Dong, 2010).

El hipocampo está formado por la capa CA, o cuerno de Ammon, y el giro dentado (DG, *dentate gyrus*). La capa CA tiene forma de “C” invertida y se puede dividir en las regiones CA1, CA2 y CA3, que están compuestas por células piramidales. Por otro lado, el DG se compone de tres capas diferentes: capa molecular, capa granular y capa polimórfica. La capa molecular es una zona relativamente libre de células, en la que se encuentran las dendritas de las células granulares y fibras que provienen de diferentes localizaciones del cerebro. En la capa granular destacan las células granulares, y en la polimórfica las células musgosas (Amaral et al., 2007; Aimone et al., 2014).

Se ha visto que existen conexiones neuronales entre las células que componen las diferentes regiones del hipocampo, así como entre otras áreas del cerebro, como la amígdala, el núcleo accumbens, la corteza prefrontal y la entorrinal, el hipotálamo y algunas áreas del cíngulo (Strange et al., 2014). A través de la corteza entorrinal llegan aferencias sensoriales al DG, convirtiéndose en la entrada principal de información en esta zona del hipocampo (Figura 8). Sin embargo, estas conexiones son unidireccionales y no parece que desde el DG se extiendan conexiones hacia la corteza entorrinal (Amaral et al., 2007). Por otro lado, las células granulares del DG conectan entre ellas mediante axones no mielinizados, así como con las células musgosas de la capa polimórfica y con las células piramidales de la capa CA3. A su vez, las células de la CA3 envían proyecciones, llamadas colaterales de Schaffer, hacia las células piramidales de la CA1, que comunican con la corteza entorrinal, cerrándose el circuito (Amaral et al., 2007; Aimone et al., 2014). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que este circuito trisináptico hipocampal (DG-CA3-CA1) presenta otras conexiones neuronales que involucran también a la capa CA2. Las neuronas granulares del DG, las células piramidales del área CA3 y las células de algunas regiones de la corteza entorrinal son capaces de enviar proyecciones a las células piramidales del área CA2 (Kohara et al., 2014; Llorens-Martín et al., 2015).



**Figura 8. Circuito del hipocampo.** Las neuronas de la corteza entorrinal envían proyecciones axonales de entrada hacia el DG y la CA2. Por otro lado, las células granulares del DG presentan conexiones entre ellas, así como con la capa polimórfica y las tres capas de la CA. Las células de la capa CA3 pueden enviar prolongaciones axonales hacia la CA2 y la CA1. Por último, las células piramidales de la CA1 devuelven proyecciones a la corteza entorrinal. Figura adaptada de Aimone et al., 2014.

### 3.1.1. La neurogénesis en el adulto

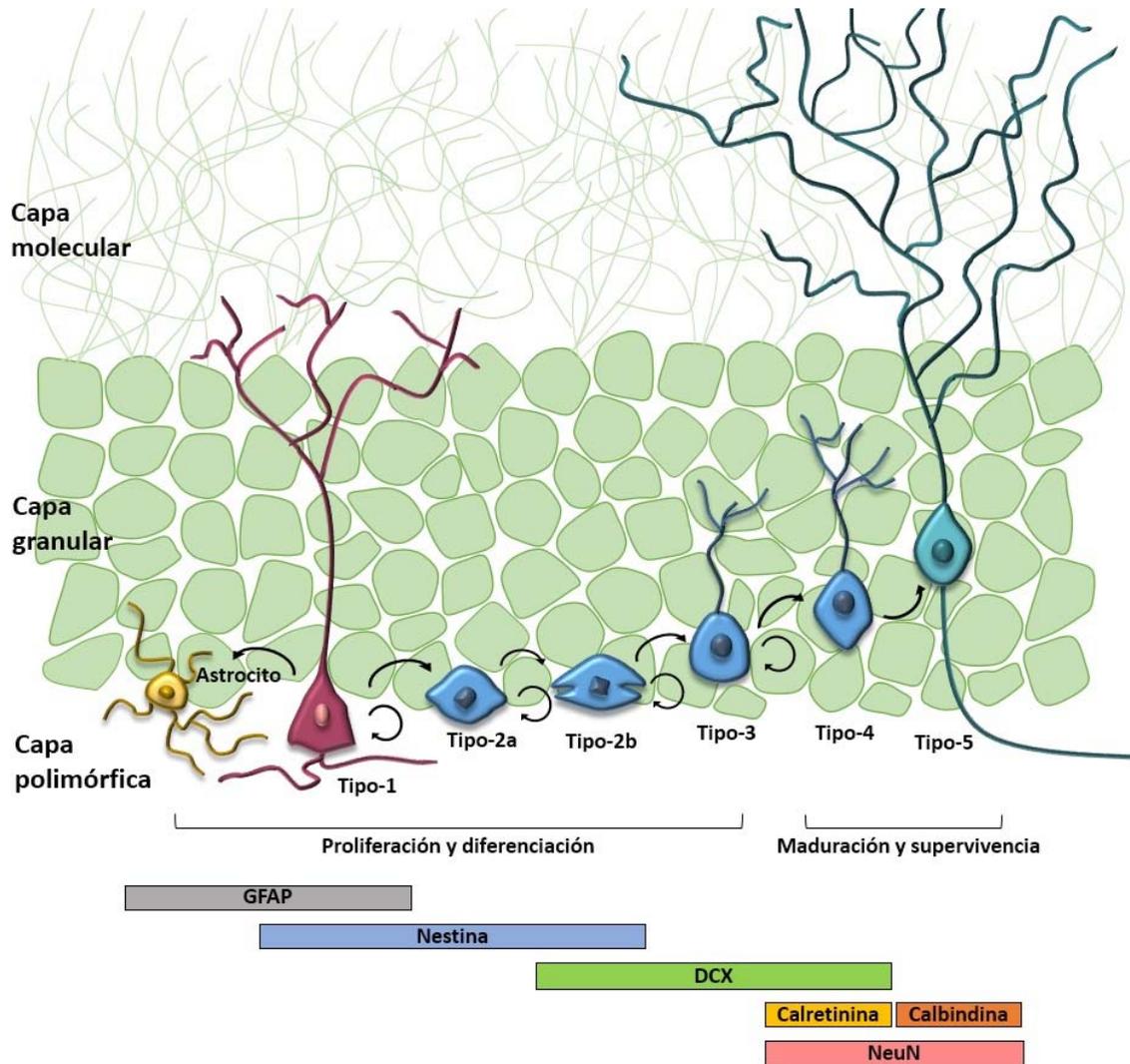
El proceso neurogénico está presente en el desarrollo del embrión y en el adulto. Mientras que la neurogénesis en el desarrollo embrionario era evidente, la neurogénesis adulta no se describió hasta mediados del siglo pasado (Messier et al., 1958; Altma y Gopal, 1965) y no fue aceptada firmemente por la comunidad científica hasta los años 90 (Kempermann, 2002). La proliferación de las células nerviosas se ha detectado en diferentes regiones del cerebro de diversas especies de peces, reptiles, aves y mamíferos, y se ha observado que disminuye según aumenta la complejidad del cerebro de los diferentes organismos (Lledo et al., 2006).

En mamíferos existen dos nichos neurogénicos principales: la zona subgranular (SGZ) del DG del hipocampo y la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales (Lledo et al., 2006; Kempermann, 2012; Aimone et al., 2014); aunque también se han encontrado otras zonas más polémicas como neocórtex (Gould, 2007), hipotálamo (Yuan y Arias-Carrión, 2011) y estriado (Kempermann, 2014). La neurogénesis, a nivel celular, ha sido ampliamente estudiada en roedores. Sin embargo, en el ser humano es difícil de analizar por causas obvias, por lo que el número de trabajos, en este caso, es

## Introducción

mucho más limitado. Aun así, Eriksson y colaboradores (1998) lograron observar por primera vez células nuevas en el DG, y desde entonces otros científicos han continuado sus pasos, existiendo un intenso debate al respecto, en el que algunos estaban a favor (Bergmann et al., 2015; Boldrini et al., 2018; Kempermann et al., 2018) y otros en contra (Sorrells et al., 2018). Finalmente, en un estudio muy reciente, Moreno-Jiménez y colaboradores (2019) han logrado describir por primera vez las etapas de diferenciación de la neurogénesis adulta en humanos.

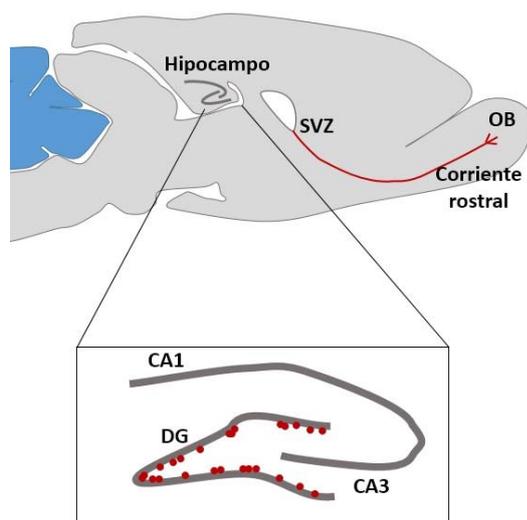
La neurogénesis es un proceso complejo en el que se pueden distinguir varias etapas: proliferación, diferenciación, maduración y supervivencia (Lledo et al., 2006; Aimone et al., 2014; Kempermann et al., 2015) (Figura 9). Tanto en la SGZ como en la SVZ se encuentra una subpoblación de células astrogliales que poseen la función de células madre neurales (NSC). Estas células madre neurales pueden generar nuevas NSC o dar lugar a células progenitoras intermedias (IPC), por lo que poseen la capacidad de autorrenovación y presentan función multipotente. A su vez, las IPC son más limitadas en proliferación y pueden diferenciarse en astrocitos o células neuronales (Lledo et al., 2006; Fuentealba et al., 2012; Kempermann et al., 2015). Tanto las NSC como las IPC son células progenitoras, denominadas progenitores primarios y secundarios respectivamente (Fuentealba et al., 2012). Las IPC se diferencian a lo largo de diferentes etapas hasta convertirse en células granulares inmaduras, que ya no son capaces de dividirse, y que, si sobreviven, llegarán a ser neuronas maduras, las cuales establecerán conexiones funcionales mediante el crecimiento dendrítico y axonal (Lledo et al., 2006; Aimone et al., 2014; Kempermann et al., 2015).



**Figura 9. Neurogénesis en el DG del hipocampo.** En la zona SGZ se encuentran las NSC, o células de tipo-1, que son capaces de autorrenovarse o dar lugar a astrocitos o nuevos progenitores. Durante las primeras etapas, las células progenitoras pueden proliferar o continuar diferenciándose hasta ser células de tipo-4, las cuales pierden la capacidad mitótica y deben sobrevivir para convertirse en neuronas maduras. Para ello, desarrollan largas dendritas y, posteriormente, un axón que les permite integrarse en el circuito neuronal y llegar a ser neuronas maduras (tipo-5). Dependiendo del estadio de diferenciación en el que se encuentren, las células expresan distintas proteínas que se utilizan como marcadores para diferenciarlas. Figura adaptada de Aimone et al., 2014.

## Introducción

Se ha visto en roedores que las IPC de la SVZ (localizada en las paredes de los ventrículos laterales) son capaces de migrar hacia el bulbo olfatorio para aumentar el suministro de células en esta zona, formando lo que se conoce como corriente migratoria rostral (Xie et al., 2018) (Figura 10). Para ello, las células se desplazan tangencialmente formando una cadena a través de estructuras tubulares, creadas por los astrocitos, sobre las que estas células gliales vierten factores de crecimiento para facilitar la migración hasta el bulbo olfatorio. Las estructuras tubulares funcionan como soporte direccional, evitando que los progenitores salgan de la ruta de forma prematura (Lledo et al., 2006). Por otro lado, se ha visto que algunas moléculas de adhesión y de la matriz extracelular, como las integrinas o PSA-NCAM, cumplen un papel fundamental en el establecimiento de contactos entre los progenitores y los astrocitos para que se produzca la migración (Lledo et al., 2006; Arias-Carrión et al., 2007).



**Figura 10. Existen dos nichos neurogénicos principales: la SVZ y la SGZ.** Las células recién nacidas en la SVZ migran hacia el bulbo olfatorio, formando la corriente rostral. Las células nacidas en la SGZ del DG presentan un desplazamiento menor, hacia zonas más distales del DG. Figura adaptada de von Bohlen Und Halbach, 2011.

Sin embargo, en la SGZ del DG del hipocampo las IPC recién nacidas presentan un desplazamiento menor. Según van diferenciándose migran hacia zonas más distales dentro de la capa granular del DG y acaban integrándose en dicha capa o en áreas adyacentes, dentro del propio hipocampo, donde primero extienden sus dendritas a través de la capa molecular y más tarde un axón que se extiende hasta las células piramidales de la capa CA (Aimone et al., 2014). Se cree que estas células granulares tardan entre 4 y 7 semanas en integrarse en el circuito neuronal y que la mayor parte de ellas (entre el 60 % y el 80 %) no serán capaces de sobrevivir un periodo largo de tiempo (Kempermann et al., 2004; Sahay et al., 2011).

### **Células tipo-1**

En el DG las NSC, o células progenitoras de tipo-1, se encuentran situadas en la SGZ y poseen un soma de gran tamaño y morfología triangular con largas ramificaciones apicales que se extienden a través de la capa granular. Además, también pueden presentar ramificaciones tangenciales más cortas en la base de la zona subgranular (von Bohlen Und Halbach, 2011). Estas células son abundantes en la SGZ, aunque su tasa de división es muy baja, y se les puede diferenciar del resto porque expresan las proteínas GFAP (marcador glial) y nestina (Kempermann et al., 2004).

### **Células tipo-2**

Las NSC dan lugar a las IPC, también denominadas progenitores tipo-2, que presentan una forma más redondeada y de menor tamaño. Algo que las hace destacar es que poseen un núcleo denso con forma irregular y ramificaciones cortas de orientación horizontal (von Bohlen Und Halbach, 2011). Las células de tipo-2 se dividen en dos subpoblaciones: progenitores de tipo-2a, que se distinguen por expresar nestina, pero no GFAP, y progenitores de tipo-2b, que son más maduras que las anteriores y son positivas para nestina y doblecortina (DCX) (Kempermann et al., 2004).

### **Células tipo-3**

Las células de tipo-2b se diferencian en neuroblastos o progenitores de tipo-3, que muestran un núcleo más redondeado, mayor variabilidad morfológica, debido a su transición evolutiva, y ramificaciones verticales de mayor complejidad y longitud. Con respecto a sus marcadores, estas células ya no son positivas para nestina, pero sí para DCX. Este estado de diferenciación celular es una etapa de transición entre las fases de proliferación y las postmitóticas (von Bohlen Und Halbach, 2011).

### **Células tipo-4**

Las células tipo-4 son células granulares inmaduras que se encuentran en la primera etapa postmitótica. Se trata de neuronas que aún expresan DCX y, además, los marcadores calretinina y proteína nuclear neuronal (NeuN) (Kempermann et al., 2004; von Bohlen Und Halbach, 2011). La mayoría de estas células no serán capaces de

sobrevivir y alcanzar el último estadio celular, pero las que lo logren madurarán desarrollando sus dendritas y axón a lo largo de la capa molecular, para establecer conexiones sinápticas con otras células maduras (Kempermann et al., 2015).

### **Células tipo-5**

Las neuronas maduras son capaces de recibir la entrada de información desde la corteza entorrinal y enviarla a otras células granulares o a las células piramidales de las capas CA2 y CA3. Estas neuronas son positivas para los marcadores NeuN y calbindina (Kempermann et al., 2004; von Bohlen Und Halbach, 2011).

El microambiente en el que se encuentran las NSC y los precursores neurales es muy importante en el proceso neurogénico. Tanto las células que se encuentran próximas a las NSC, por ejemplo, los astrocitos, como los metabolitos que estas vierten al medio o llegan a través de los vasos sanguíneos pueden inducir o inhibir su división y diferenciación. Diversos estudios han demostrado que los factores neurotróficos, como IGF-1, VEGF y BDNF, influyen sobre la neurogénesis en el DG, las conexiones neuronales y la cognición (Trejo et al., 2001; Licht y Keshet, 2015; von Bohlen Und Halbach y von Bohlen Und Halbach, 2018). Así, se ha observado que ratones deficientes en BDNF o IGF-1 presentan un descenso de la neurogénesis. Además, los niveles de estos factores neurotróficos disminuyen con el envejecimiento, por lo que se cree que existe una correlación entre la reducción de estos factores y la disminución de la neurogénesis con la edad (Aimone et al., 2014).

El DG presenta una vascularización que desciende verticalmente con respecto a él. De hecho, algunos capilares cruzan la capa molecular hasta alcanzar la zona hilar, en la que cambian de dirección, para continuar paralelos a la SGZ, con dirección rostro-caudal. Este tipo de vascularización permite que todas las células del DG consigan un gran aporte sanguíneo, mediante el cual reciben tanto nutrientes como hormonas y factores de crecimiento que les inducen a proliferar y madurar. De hecho, se ha demostrado que la estimulación de la angiogénesis con VEGF promueve la neurogénesis hipocampal (Licht y Keshet, 2015).

### 3.1.2. El ejercicio físico como regulador de la neurogénesis

Actualmente se sabe que la neurogénesis adulta está modulada no solo por factores intrínsecos, sino también por factores extrínsecos como el estrés, el ejercicio, la dieta, el enriquecimiento ambiental y el aprendizaje. Algunos, como el estrés, inhiben la proliferación de las células progenitoras neuronales, mientras que otros, como el ejercicio, la inducen. van Praag y colaboradores (1999) demostraron en ratones que la actividad de correr produce un aumento de la proliferación de las células progenitoras neuronales en el DG. Estudios posteriores comenzaron a demostrar que el ejercicio físico es un factor que está implicado en las primeras etapas de la neurogénesis (Steiner et al., 2008) y por eso se relaciona principalmente con la proliferación celular, mientras que otros, como el enriquecimiento ambiental, parecen tener mayor participación en la supervivencia de los precursores (Kempermann et al., 2010). A su vez, se ha podido demostrar que la actividad física induce un potencial neurogénico que puede ser utilizado ante estímulos adicionales apropiados, como el enriquecimiento ambiental o el aprendizaje (Fabel et al., 2009; Kemperman et al., 2010). De hecho, el ejercicio físico, junto con el enriquecimiento ambiental, producen un efecto aditivo sobre la neurogénesis adulta en el hipocampo (Fabel et al., 2009). Sin embargo, para que esto pueda suceder, es de gran importancia el número de precursores celulares previos (Encinas et al., 2011), ya que de él depende el tamaño de respuesta neurogénica posterior ante un estímulo proliferativo como es el ejercicio físico.

Aunque el ejercicio físico ha sido ligado principalmente a las primeras etapas de la neurogénesis, es decir, a la proliferación celular (van Praag et al., 1999), también se ha visto que cumple un papel importante en la supervivencia e integración, manteniendo la población de los precursores neuronales y su progenie, y ayudando a la incorporación de las nuevas neuronas, lo que le aporta una función aún mayor sobre el proceso neurogénico (Kronenberg et al., 2006; Castilla-Ortega et al., 2014).

Hasta hace pocos años, los estudios que analizaban la relación entre el ejercicio físico y la neurogénesis se centraban exclusivamente en el ejercicio de resistencia, utilizando ruedas de correr o tapices rodantes como aparatos de entrenamiento. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, existen diferentes tipos de ejercicio que ayudan a desarrollar distintas cualidades físicas del organismo. Además, también es

## Introducción

importante tanto la intensidad como la duración de los mismos. Por ello, se han comenzado a diseñar diferentes protocolos para roedores que tienen en cuenta todos estos factores (Novaes Gomes et al., 2014; Nokia et al., 2016).

Desde el punto de vista de la salud, el ejercicio de fuerza ayuda a mantener la masa muscular (Bruusgaard et al., 2010) y la densidad mineral ósea (Mosti et al., 2013). Además, tiene un efecto saludable en patologías relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, como la diabetes (Lumb, 2014). Sin embargo, aún no está claro el efecto del entrenamiento de fuerza sobre el proceso neurogénico. En algunos trabajos, como el de Novaes Gomes y colaboradores (2014), se ha demostrado que este tipo de ejercicio incluso podría ser capaz de inducir la proliferación de los progenitores neuronales. De hecho, se ha visto que el ejercicio de fuerza incrementa los niveles de IGF-1 tanto en el hipocampo como a nivel sérico (Cassilhas et al., 2012). Sin embargo, en otros estudios como el de Nokia y colaboradores (2016), no se ha logrado confirmar que el ejercicio de fuerza favorezca la neurogénesis, por lo que el efecto de este tipo de ejercicio es un tema controvertido aún, posiblemente por los diferentes modelos de entrenamiento propuestos en los distintos estudios.

Tampoco está claro el efecto real de la actividad de nadar. Se ha visto en algunos estudios que este tipo de entrenamiento induce la expresión de BDNF y ejerce efectos antidepresivos (Jiang et al., 2014), mientras que en otros no ejerce el papel neuroprotector típico del ejercicio (Zhao et al., 2012), posiblemente debido al efecto de estrés que causa en roedores. De hecho, se utiliza como inductor de estrés en estudios sobre depresión y ansiedad, y se ha demostrado que puede causar alteraciones en la maduración morfológica y sináptica de las células progenitoras. Esto es debido a que las situaciones de estrés pueden incrementar el nivel de un gran número de citoquinas que producen un efecto pro-inflamatorio en el hipocampo, lo que se relaciona con el estado de depresión (Llorens-Martín et al., 2016; Ashokan et al., 2018). Sin embargo, si se pudiese estudiar el efecto de este tipo de ejercicio sobre la neurogénesis adulta en humanos, quizá se obtendrían datos muy diferentes, ya que se podría eliminar este factor de estrés al ser un ejercicio de tipo voluntario.

En cuanto a la intensidad del entrenamiento, se ha observado que los entrenamientos muy intensos son menos adecuados para inducir la neurogénesis y

facilitar el desarrollo de circuitos neuronales que aquellos de intensidad más baja (Lou et al., 2008; Nokia et al., 2016). Por otro lado, la duración del entrenamiento también es importante. Se ha visto en ratones que el ejercicio continuado no es capaz de mantener la proliferación de los precursores celulares tras un cierto tiempo, pero sí de reducir la disminución de la neurogénesis relacionada con el envejecimiento (Kronenberg et al., 2006). A su vez, Babaei y colaboradores (2014) observaron que los niveles de BDNF en atletas retirados, y que se mantuvieron entrenando de forma regular, no se modificaban tras años de entrenamiento, aunque sí presentaron una mejora de la memoria con respecto a los sedentarios. Por lo que, aunque el entrenamiento crónico no sea capaz de mantener elevados los niveles de división celular o de BDNF, sí que permite revertir la disminución de la neurogénesis en el proceso de envejecimiento en ratones (Kronenberg et al., 2006), así como aportar grandes beneficios para la memoria en el cerebro humano (Babaei et al., 2014).

Todos estos datos demuestran que el ejercicio físico ejerce una gran influencia sobre la plasticidad del hipocampo y que los efectos que produce sobre esta región cerebral se deben, en parte, al papel regulador que tiene sobre los niveles de algunas neurotrofinas. Se ha visto que la actividad física regular es capaz de aumentar, a nivel periférico y cerebral, los niveles de algunos factores de crecimiento inductores de la neurogénesis, como el BDNF (Pedersen et al., 2009; Ramsbottom et al., 2010; Liu y Nusslock, 2018; von Bohlen Und Halbach y von Bohlen Und Halbach, 2018), IGF-1 (Trejo et al., 2001; Cassilhas et al., 2012) y VEGF (Licht y Keshet, 2015).

Sin embargo, el efecto del ejercicio físico en la neurogénesis adulta en humanos es un gran reto para el conocimiento, debido a que el estudio del cerebro en nuestra especie está muy limitado. A día de hoy, aún no se ha logrado demostrar la intervención de la actividad física en la inducción de la neurogénesis, aunque diversos estudios han conseguido percibir cambios en la perfusión y la volumetría del hipocampo y de otras zonas del lóbulo temporal del cerebro mediante diferentes técnicas (Erickson et al., 2011; Kleemeyer et al., 2016; Maass et al., 2016; Firth et al., 2018).

Por todo lo anteriormente descrito, el ejercicio desempeña una acción neuroprotectora tanto en individuos sanos como en aquellos que presentan algún tipo de patología a nivel cerebral; mientras que una vida sedentaria se asocia con el riesgo de

sufrir diferentes trastornos como demencia, depresión o enfermedades neurodegenerativas (Kempermann et al., 2010). Sin embargo, aún no están del todo claros los mecanismos que subyacen al efecto del ejercicio físico sobre el cerebro, ya que existe una gran variabilidad de tipos de ejercicio, de duraciones y de intensidades. Esto puede desencadenar la activación de distintas vías moleculares (Hawley et al., 2014; Rowe et al., 2015), modificando la morfología y la función del hipocampo y de las células que forman parte de él de forma diferente. Los entrenamientos que favorecen el aumento del flujo sanguíneo en el hipocampo, así como el aumento de los niveles de factores de crecimiento y neurotrofinas, ayudan a la proliferación y el desarrollo neuronal (Cassilhas et al., 2012; Lin et al., 2012; Licht y Keshet, 2015; von Bohlen Und Halbach y von Bohlen Und Halbach, 2018), lo que aporta modificaciones de la red neuronal que previenen y disminuyen la depresión y la ansiedad, además de mejorar la memoria y el aprendizaje (Vaynman et al., 2004; van Praag et al., 2005; O'Collaghan et al., 2007). A nivel sináptico, se ha observado que el ejercicio también puede aportar grandes beneficios (Lin et al., 2012). De hecho, después de un accidente cerebrovascular isquémico agudo el ejercicio puede causar cambios adaptativos en el número de sinapsis y en la fuerza de transmisión sináptica (Nie y Yang, 2017).

### **3.2. Las chaperonas SNARE en la sinapsis**

La palabra sinapsis proviene del griego *synapsis*, que significa unión o enlace, y hace referencia a la estructura responsable de la transmisión química o eléctrica entre dos células, en la que al menos una de ellas forma parte del sistema nervioso. En 1856, Claude Bernard describió por primera vez el sitio de unión entre un nervio y una fibra muscular. Posteriormente, a finales del siglo XIX, Santiago Ramón y Cajal demostró la existencia de los botones sinápticos, estructuras mediante las cuáles las neuronas establecen contactos funcionales entre ellas. Este científico español recibiría el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1906 por su trabajo sobre la estructura del sistema nervioso. En 1897, Charles Sherrington fue el primero en utilizar el término sinapsis para describir la entidad anatómica y fisiológica especializada en la transmisión de información a través del sistema nervioso. En 1932, recibiría el Premio Nobel en

Fisiología o Medicina por sus trabajos en el campo de la Neurofisiología (Caputo y Jaffe, 2010).

Para que se lleve a cabo la sinapsis es necesario que la membrana presináptica se despolarice, lo que produce la apertura de los canales de calcio y la entrada del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en el terminal nervioso. El aumento de la concentración de este ion acciona el mecanismo de exocitosis de las vesículas sinápticas, liberándose el neurotransmisor a la hendidura presináptica. Cuando cesa el potencial de acción, se inhibe la exocitosis y las vesículas son endocitadas y recicladas para ser rellenadas, de nuevo, con el neurotransmisor, o fusionadas con un endosoma temprano. Cada terminal sináptico contiene centenares de vesículas con neurotransmisores. Para ser liberados a la hendidura sináptica es necesario que se produzca la fusión entre la membrana de la vesícula que los contiene y la membrana plasmática de la neurona, estando implicadas diferentes proteínas en este proceso (Südhof y Rizo, 2011).

Gracias a tres trabajos independientes, pero sucesivos, se describieron las proteínas clave del proceso de exocitosis vesicular. La primera de ellas se aisló en un estudio sobre el transporte de vesículas en el aparato de Golgi y fue denominada NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor protein*) (Block et al., 1988). NSF es una ATPasa fundamental en el tráfico de membranas *in vitro*, que permitió descubrir un grupo de proteínas adaptadoras que interactuaban directamente con ella, a las que se les llamó proteínas solubles de unión a NSF o SNAP (*soluble NSF attachment proteins*) (Clary et al., 1990) y de las que hasta el momento se han identificado tres isoformas diferentes:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -SNAP. Los hallazgos de NSF y las SNAP permitieron identificar a un grupo de proteínas a las cuales NSF y las SNAP se unían, las proteínas receptoras de SNAP o SNARE. Estas proteínas SNARE fueron clasificadas en dos grupos: v-SNARE, incorporadas a la membrana de la vesícula, y t-SNARE, localizadas en la membrana diana (Söllner et al., 1993).

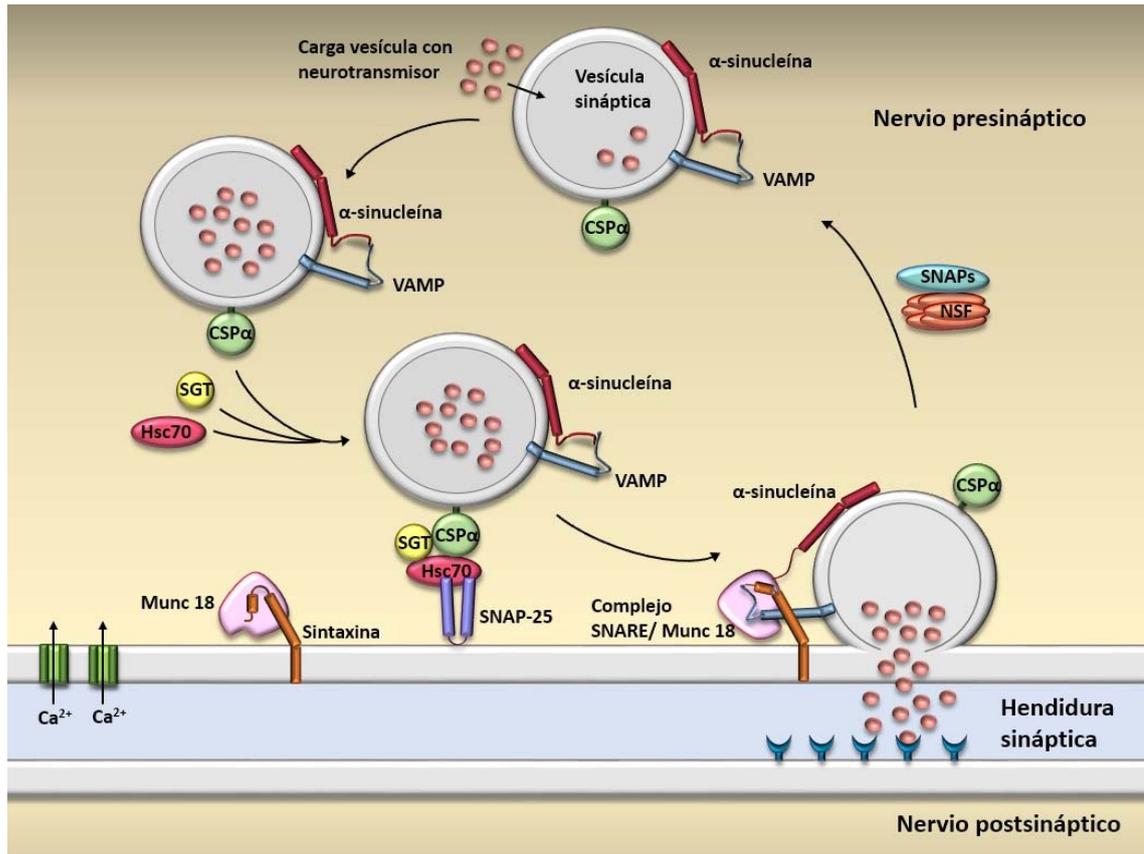
Las SNARE permiten el anclaje y la fusión de la membrana de la vesícula, que contiene el neurotransmisor, con la membrana presináptica. La implicación de estas proteínas en la sinapsis nerviosa se produjo gracias a la observación de que eran el blanco de las toxinas botulínica y tetánica. Se ha visto que estas neurotoxinas actúan como proteasas, uniéndose específicamente a tres de las principales SNARE

## Introducción

involucradas en la sinapsis: syntaxina, sinaptobrevina o VAMP2 (*vesicle-associated membrane protein-2*) y SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein of 25 K*), que no pertenece a la familia de las proteínas SNAP. De esta forma bloquean la liberación del neurotransmisor (Schiavo et al., 1992; Schiavo et al., 1993a, b). Gracias a estos trabajos se observó que las proteínas SNARE interactuaban con NSF y las SNAP y, además, eran necesarias para la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática.

Todas las proteínas SNARE poseen un motivo SNARE excepto la proteína SNAP-25 y sus homólogos (SNAP-23, -29 y -47) que presentan dos. Este motivo se ha conservado a lo largo de la evolución y les permite anclarse unas a otras formando un complejo proteico compuesto por un motivo SNARE de VAMP2, otro de syntaxina y dos de SNAP-25 (Ybe et al., 2000; Südhof y Rizo, 2011).

SNAP-25 es una t-SNARE localizada en la membrana presináptica que carece de segmentos transmembrana, de forma que sus extremos carboxi- y amino-terminal están localizados hacia el citoplasma celular. De esta manera, diversas SNARE pueden anclarse a ella para formar el complejo SNARE. Concretamente, el motivo SNARE, que se encuentra en el extremo amino-terminal de SNAP-25, se une a syntaxina, localizada en la zona activa de la membrana presináptica. Mientras que el extremo carboxi-terminal de SNAP-25 interactúa con VAMP2, una v-SNARE (Hayashi et al., 1994, 1995; Poirier et al., 1998). Momentos previos al montaje del complejo SNARE, la syntaxina se encuentra en una conformación cerrada que no le permite anclarse al complejo. La proteína Munc 18 se une inicialmente a la conformación cerrada de syntaxina, transformándola en su configuración abierta, para que sea capaz de interactuar con otras SNARE. Munc 18 y syntaxina permanecerán conjugadas durante la formación del complejo SNARE (Südhof, 2013) (Figura 11).



**Figura 11. Ciclo de la vesícula sináptica.** Para que se produzca la sinapsis nerviosa, primero debe despolarizarse la membrana presináptica, abriéndose los canales de  $Ca^{2+}$  y acumulándose este ion en el citoplasma. A continuación, se activa el mecanismo de exocitosis. Para ello, las proteínas SNARE (syntaxina, VAMP y SNAP-25), con la intervención de algunas chaperonas ( $CSP\alpha$ ,  $\alpha$ -sinucleína, SGT y Hsc70) se anclan y forman el complejo SNARE, produciéndose la fusión entre la membrana de la vesícula y la presináptica, para que se libere el neurotransmisor. Por último, las proteínas SNAP y NSF colaboran en el desensamblaje del complejo SNARE, y la vesícula es endocitada y reciclada, pudiendo ser cargada de nuevo con el neurotransmisor o enviada al retículo endoplasmático. Figura adaptada de Südhof y Rizo, 2011.

Una vez formado el complejo, las proteínas SNARE de ambas membranas crean un transcomplejo, similar a una cremallera progresiva, que desestabiliza las superficies hidrofílicas de las membranas, abriéndose un poro de fusión, a través del cual se libera el neurotransmisor a la hendidura sináptica. En ese momento, el complejo SNARE pasa de su conformación “trans” (el complejo está presente en las dos membranas) a “cis” (presente en una única membrana) (Südhof, 2013). Por último, se produce la disociación del complejo gracias a la acción de la ATPasa homohexamérica NSF y las SNAP.

## Introducción

Aunque aún no se conoce con exactitud este mecanismo, se sospecha que primero se unen una o varias SNAP al complejo SNARE y a continuación se asocia NSF. Posteriormente, NSF ejerce una fuerza que produce el giro, en sentido contrario, entre las SNAP y el complejo SNARE, desensamblándose las proteínas SNARE. Para que se lleve a cabo este proceso se requiere la hidrólisis de ATP (Vivona et al., 2013; Zhao et al., 2015).

Para el correcto plegamiento de las proteínas SNARE y su ensamblaje es necesaria la presencia de chaperonas como CSP $\alpha$  (acrónimo derivado del inglés *cysteine string protein  $\alpha$* ),  $\alpha$ -sinucleína, Hsc70 y SGT (*glutamate- and threonine- rich protein*). Estas proteínas promueven el correcto ensamblaje del complejo. De hecho, están asociadas con neurodegeneración debido a que, si su función no es correcta, se produce mal plegamiento o ensamblaje de las SNARE, lo que afecta a la supervivencia neuronal (Südhof y Rizo, 2011).

Las CSP son una familia de pequeñas proteínas abundantes en la sinapsis compuesta por tres homólogos: CSP $\alpha$ , CSP $\beta$  y CSP $\gamma$ . CSP $\alpha$  se expresa de forma abundante en el cerebro, mientras que CSP $\beta$  y CSP $\gamma$  son abundantes en testículos, aunque también se ha visto que CSP $\beta$  se encuentra en las células pilosas del oído (Burgoyne y Morgan, 2015). CSP $\alpha$  interviene en el ensamblaje del complejo SNARE y se encuentra situada en la cara citoplasmática de la vesícula sináptica. Es una proteína conservada evolutivamente que contiene un dominio ADN-J (Buchner y Gundersen, 1997), común en algunas chaperonas, y que es necesario para que se una a Hsc70 y SGT (Burgoyne y Morgan, 2015). El complejo CSP $\alpha$ -Hsc70-SGT interactúa con SNAP-25 para que adopte la conformación necesaria en el ensamblaje del complejo SNARE y se produzca la sinapsis (Sharma et al., 2010).

La importancia de estas proteínas para los procesos sinápticos quedó patente tras varios estudios utilizando modelos animales. Así, ratones CSP $\alpha^{-/-}$  entre las 2-4 semanas posteriores al nacimiento comenzaron a sufrir, de forma progresiva, desórdenes motores y neurodegeneración, que desembocaron en la muerte de estos animales cuando tenían entre 1-4 meses de edad (Fernandez-Chacon et al., 2004). En otro trabajo posterior, también con ratones, se demostró que la delección de CSP $\alpha$  produce acumulación de ubiquitina en el cerebro, asociada a SNAP-25 y Hsc70, así como degradación de estas

dos proteínas (SNAP-25 y Hsc70) y disminución de la formación del complejo SNARE (Sharma et al., 2010).

Otras chaperonas involucradas en el ensamblaje del complejo SNARE son las sinucleínas, una familia de proteínas que solo se han observado en vertebrados y que está compuesta por:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -sinucleína. Las dos primeras son muy abundantes en el cerebro, sobre todo en corteza cerebral, estriado, tálamo, hipocampo y cerebelo, mientras que  $\gamma$ -sinucleína se expresa no solo en cerebro, sino también en nervios periféricos y en epitelio olfativo. Además,  $\gamma$ -sinucleína está asociada también con el cáncer de mama, tumores cerebrales y de ovario (George, 2002).

Por otro lado, la  $\alpha$ -sinucleína está relacionada con la enfermedad de Parkinson, debido a que mutaciones de esta proteína, o su sobreexpresión, producen agregados e inclusiones, como los cuerpos de Lewy, típicos de esta enfermedad (Ross y Poirier, 2004; Cookson, 2009). Aunque esta proteína cumple un papel fundamental en la neurodegeneración, no se conocen con exactitud todas sus funciones. Parece que  $\alpha$ -sinucleína actúa momentos previos a la fusión de la membrana de la vesícula que transporta al neurotransmisor con la presináptica, ya que se ha visto que puede aumentar el número de complejos SNARE (Burré et al., 2010). Así mismo, Logan y colaboradores (2017) observaron que la  $\alpha$ -sinucleína es importante en la aceleración de la exocitosis del neurotransmisor, disminuyendo la dilatación del poro de fusión y previniendo el cierre del mismo. Por el contrario, la pérdida de ella provoca efectos inversos. Por lo tanto, parece que  $\alpha$ -sinucleína tiene, al menos, dos funciones: promover la acumulación de complejos SNARE y controlar la dilatación del poro de fusión.

Aunque, como se acaba de describir,  $\alpha$ -sinucleína cumple un papel fundamental en la liberación del neurotransmisor, diversos estudios demostraron que ratones *knockout* (KO) para  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -sinucleína, o doble KO para  $\alpha$ - y  $\beta$ -sinucleína, eran viables y fértiles, además de mostrar un fenotipo normal (Abeliovich et al., 2000; Ninkina et al., 2003; Chandra et al., 2004). Sin embargo, ratones triple KO para estas chaperonas murieron prematuramente al sufrir alteraciones neurológicas asociadas al envejecimiento (Burré et al., 2010). Por lo que parece que el déficit de alguna de estas proteínas podría ser compensado por las otras, y el déficit de las tres produce problemas neurodegenerativos graves en los animales.

## Introducción

Así mismo, las sinucleínas podrían compensar el déficit de otras chaperonas involucradas en la sinapsis. Aunque no hay indicios de que  $\alpha$ -sinucleína interactúe directamente con CSP $\alpha$ , parece que ambas proteínas colaboran y tratan de compensarse mutuamente ante el déficit de una de ellas, ya que Chandra y colaboradores (2005) vieron que la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína en ratones CSP $\alpha^{-/-}$  es capaz de rescatar la neurodegeneración letal de estos animales y el deterioro motor que sufren, mientras que la supresión de  $\alpha$ -sinucleína acelera dicha neurodegeneración (Chandra et al., 2005). Por otro lado, ratones triple KO para las sinucleínas presentaron aumento de los niveles de CSP $\alpha$  (Burré et al., 2010), por lo que parece que ambas chaperonas podrían compensar el déficit de la otra.

Sin embargo, estos datos no se observan en relación a otras proteínas SNARE. Los ratones CSP $\alpha^{-/-}$  mostraron los niveles de SNAP-25 y Hsc70 disminuidos, así como una reducción del ensamblaje del complejo SNARE. Además, a pesar de que la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína fue capaz de contrarrestar la disminución en los niveles de Hsc70 y la formación del complejo SNARE, no lo hizo en los de SNAP-25 (Chandra et al., 2005). En el caso de los ratones triple KO para las sinucleínas, también presentaron disminución de VAMP2 dependiente de la edad, lo cual puede deberse a que, durante el ensamblaje del complejo SNARE, el extremo carboxi-terminal de  $\alpha$ -sinucleína se une al amino terminal de VAMP2, interactuando entre sí. De hecho, ambas proteínas se encuentran ancladas en la superficie de la vesícula sináptica (Burré et al., 2010). Por lo tanto, la función de las proteínas SNARE y sus chaperonas, así como su actuación conjunta, es fundamental para evitar la neurodegeneración (Chandra et al., 2005; Burré et al., 2010).

La alta demanda proteica requerida en la región presináptica, para el mantenimiento de su estructura y función, necesita de una correcta regulación. Así mismo, el ciclo de la vesícula sináptica ocurre de forma muy rápida y puede ser necesaria su repetición con una frecuencia alta. Estas condiciones hacen que las proteínas presinápticas estén sometidas a un alto nivel de estrés que puede deteriorarlas funcionalmente, por lo que es necesario que sean eliminadas y recicladas cuando esto ocurre (Vijayan y Verstreken, 2017).

En la bibliografía se encuentran diversos trabajos que demuestran que el reciclaje de estas proteínas, como por ejemplo el de  $\alpha$ -sinucleína, se lleva a cabo gracias a diferentes sistemas proteolíticos como la autofagia o el sistema ubiquitina-proteosoma. El bloqueo o la disfunción de alguno de estos sistemas puede producir la acumulación y formación de agregados, típicos de las patologías neurodegenerativas como el Parkinson (Friedman et al., 2012; Xilouri et al., 2013). Además, es frecuente que las sinapsis se localicen lejos del soma celular, la zona principal de síntesis proteica, por lo que el reemplazo de las proteínas defectuosas es más difícil y requiere de mayor tiempo. Todos estos factores aumentan la probabilidad de que las proteínas dañadas se acumulen y se produzca la disfunción sináptica (Vijayan y Verstreken, 2017). Por eso, la sinapsis requiere una coordinación rápida y perfecta de diversos procesos celulares, entre los que se encuentra la autofagia, permitiendo mantener la homeostasis y el funcionamiento neuronal en perfecto estado (Son et al., 2012; Shen et al., 2015).



### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## Hipótesis y objetivos

El ejercicio físico es una actividad necesaria en la mejora de la calidad de vida, ya que es capaz de mitigar los efectos del envejecimiento, así como de prevenir y tratar un gran número de patologías. Su práctica produce la activación de múltiples rutas moleculares y celulares que, en conjunto, favorecen la salud sistémica (Hawley et al., 2014; Rowe et al., 2015). Es el caso de la autofagia, un sistema encargado de la digestión y el reciclaje de orgánulos y proteínas defectuosos, imprescindible en el mantenimiento de la homeostasis celular (Ravikumar et al., 2010). La autofagia disminuye a lo largo de la vida, y su detrimento juega un papel importante en el envejecimiento (López-Otín et al., 2016). Debido a que el déficit de esta vía de degradación impide la correcta eliminación de proteínas en el encéfalo, se forman agregados característicos de las enfermedades neurodegenerativas (Menzies et al., 2015). Diversos estudios han demostrado que el ejercicio de resistencia induce la autofagia en el cerebro (He et al., 2012b; Bayod, et al., 2014), lo que podría ser clave en la prevención y el tratamiento de patologías neurodegenerativas. Por otro lado, los entrenamientos que incrementan el flujo sanguíneo en el hipocampo, así como los niveles de factores de crecimiento y neurotrofinas, favorecen la proliferación y el desarrollo neuronal, mejorando la memoria y previniendo la depresión y la ansiedad (van Praag et al., 1999, 2005; Vaynman et al., 2004; Kronenberg et al., 2006; O'Collaghan et al., 2007; Cassilhas et al., 2012; Lin et al., 2012; Licht y Keshet, 2015; von Bohlen Und Halbach y von Bohlen Und Halbach, 2018). Así mismo, el ejercicio es capaz de aumentar el número de sinapsis y la fuerza de transmisión de estas, aportando grandes beneficios a la función neuronal (Lin et al., 2012; Nie y Yang, 2017).

Por todo ello, el ejercicio es fundamental en la neuroprotección; aunque no se conocen con exactitud sus mecanismos para inducir estas adaptaciones en el encéfalo, debido a que los diferentes tipos de entrenamiento, así como su intensidad y duración, pueden implicar la activación de distintas rutas a nivel molecular. Los trabajos previos sobre el efecto del ejercicio en el encéfalo se han centrado principalmente en el entrenamiento de resistencia, siendo casi inexistentes en el ejercicio de fuerza. A su vez, se ha demostrado que el ejercicio de resistencia induce la autofagia en el encéfalo, pero no se ha estudiado el efecto del ejercicio de fuerza en esta región.

## Hipótesis y objetivos

Por lo tanto, la **hipótesis** que se plantea en este trabajo es que *tanto el ejercicio de fuerza como el de resistencia producen efectos beneficiosos sobre los mecanismos de adaptación al ejercicio en el encéfalo a diferentes niveles: a nivel funcional, afectando a la conducta; a nivel celular, afectando a la neurogénesis y a nivel molecular, afectando a los niveles de proteínas presinápticas. Y para que estas adaptaciones tengan lugar es necesaria la participación de la vía autofágica.*

Para determinar si la hipótesis es cierta se ha propuesto el siguiente **objetivo general**:

*Estudiar el papel de la autofagia en las adaptaciones del encéfalo inducidas por el entrenamiento de fuerza y de resistencia.*

Para llevar a cabo el objetivo general, se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar el efecto del déficit de dos autofaginas (Atg4b y Atg4d) en el comportamiento de ratones.
2. Analizar las capacidades físicas, de fuerza y de resistencia, en ratones *atg4b<sup>-/-</sup>*.
3. Caracterizar el efecto del entrenamiento de fuerza y del entrenamiento de resistencia en el comportamiento de ratones silvestres y ratones con déficit de Atg4b.
4. Evaluar los efectos de los entrenamientos de fuerza y de resistencia sobre la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo de ratones salvajes y *atg4b<sup>-/-</sup>*, así como sobre los niveles de proteínas presinápticas en el hipocampo, la corteza cerebral, el estriado y el cerebelo de estos animales.
5. Estudiar el efecto del entrenamiento de fuerza y de resistencia sobre los niveles de autofagia en el hipocampo, la corteza cerebral, el estriado y el cerebelo de ratones salvajes y *atg4b<sup>-/-</sup>*.

## Hipótesis y objetivos

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Animales y diseño experimental

Se trabajó con dos modelos murinos de deficiencia parcial en autofagia: *atg4d<sup>-/-</sup>* y *atg4b<sup>-/-</sup>*.

Los ratones utilizados en este trabajo fueron mantenidos en el Bioterio de la Universidad de Oviedo. En cada jaula se alojaron entre ocho y diez animales con agua y comida *ad libitum*, bajo condiciones de temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) y ciclo de luz/oscuridad 12:12 (inicio del periodo de luz a las 08:00 horas). Los procedimientos experimentales con los animales fueron autorizados por el Comité de Ética en la Investigación de la Universidad de Oviedo (PROAE 30/2016, en el caso del estudio con los *atg4d<sup>-/-</sup>*, y PROAE 01/2017, para el estudio con los *atg4b<sup>-/-</sup>*).

### **Modelo *atg4d<sup>-/-</sup>***

Se utilizaron 10 ratones macho de 15 meses de edad con fondo genético puro C57BL6: 5 de tipo salvaje (*wild type*; Wt) y 5 deficientes en autofagina-4 (*atg4d<sup>-/-</sup>*). Los animales fueron cedidos por el Dr. Guillermo Mariño García.

Los ratones *atg4d<sup>-/-</sup>*, y sus correspondientes controles Wt, fueron sometidos a dos pruebas de comportamiento (test de campo abierto y test de reconocimiento de objetos) durante 3 días consecutivos. Dichas pruebas se realizaron siempre a primera hora de la mañana.

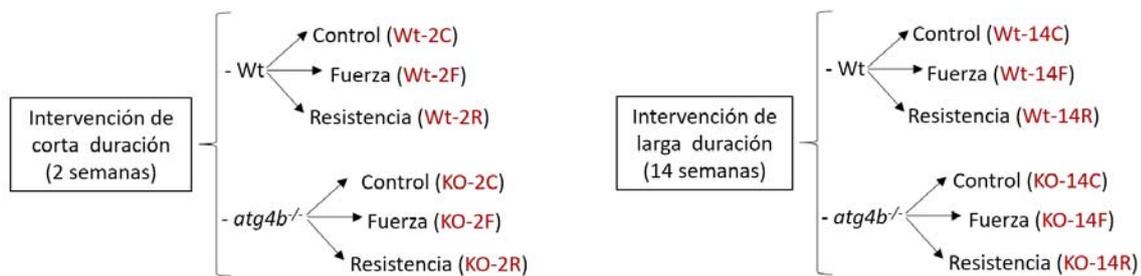
### **Modelo *atg4b<sup>-/-</sup>***

Se utilizaron 72 ratones de 2 meses de edad, todos ellos machos con fondo genético mixto C57BL6/129Sv: 36 de tipo salvaje y 36 deficientes en autofagina-1 (*atg4b<sup>-/-</sup>*; KO). Estos animales fueron cedidos por el Dr. Carlos López Otín.

Debido a que el 25 % de los *atg4b<sup>-/-</sup>* había presentado problemas motores previamente (Mariño et al., 2010), los 36 ratones utilizados en este estudio se eligieron entre el 75 % de los que no presentaban estas alteraciones.

## Material y métodos

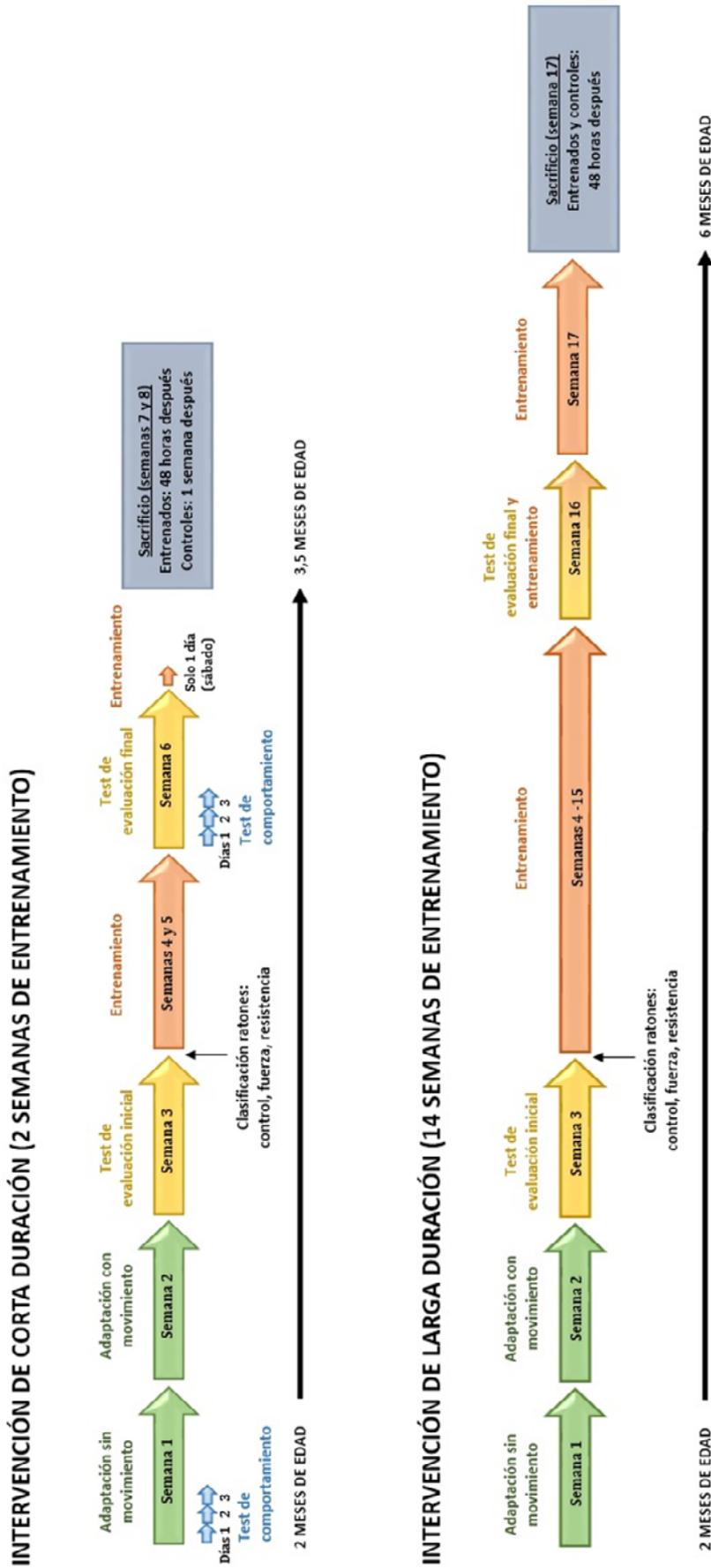
Los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> y sus correspondientes controles Wt fueron sometidos a diferentes entrenamientos en cuanto al tiempo de intervención y al tipo de ejercicio. Se llevaron a cabo dos intervenciones de diferente duración: intervención corta (2 semanas) e intervención larga (14 semanas). Se eligió la intervención de 2 semanas para asegurar la inducción de la neurogénesis en el DG del hipocampo (van Praag et al., 1999). Así mismo, la intervención de 14 semanas se diseñó para que fuera un entrenamiento a largo plazo. A su vez, dentro de cada intervención se distribuyó a los ratones en tres grupos, según el tipo de ejercicio que iban a realizar: control (C, no entrenados), fuerza (F) y resistencia (R) (Figura 12).



**Figura 12. Grupos de entrenamiento.** Se realizó una intervención de corta duración y otra de larga duración. Dentro de cada una de ellas se distribuyó a los ratones Wt y *atg4b*<sup>-/-</sup> en tres grupos según el tipo de ejercicio que iban a llevar a cabo: control (no entrenados), fuerza y resistencia.

Durante las dos primeras semanas todos los animales fueron adaptados a las estaciones de entrenamiento, y a lo largo de la tercera semana se les realizó un test de evaluación inicial para conocer sus capacidades físicas, tras el cual se distribuyó al azar a los animales en los grupos control, fuerza y resistencia. A partir de la cuarta semana se comenzó con el periodo de entrenamiento (Figura 13).

Todos los ratones incluidos en la **intervención de corta duración** realizaron un test de evaluación final durante la sexta semana, para determinar sus capacidades físicas. Además, para minimizar el efecto agudo del test final y obtener datos basales, los animales entrenados realizaron una sesión más de ejercicio y fueron sacrificados 48 horas después de la misma (semana 7). Los controles se sacrificaron una semana más tarde (semana 8), para asegurar la dilución del efecto que podría producir este test de evaluación final sobre el resto de los procedimientos.



**Figura 13. Intervenciones realizadas.** Durante las dos primeras semanas los ratones fueron adaptados a las diferentes estaciones en las que iban a realizar el entrenamiento. Se les realizó un test de evaluación inicial y otro final para conocer la capacidad física antes y después del entrenamiento. Antes de comenzar con los diferentes tipos de intervención, los ratones tenían 2 meses de edad. Los que realizaron la intervención de corta duración fueron sacrificados con 3 meses y medio, mientras que los que realizaron la intervención de larga duración se sacrificaron cuando tenían una edad de 6 meses. Además, los que fueron sometidos a la intervención de duración corta, realizaron dos test de comportamiento (test de reconocimiento de objetos y test de campo abierto), tanto antes como después del periodo de entrenamiento.

## Material y métodos

A su vez, todos los ratones que pertenecían a la intervención de corta duración realizaron dos pruebas de comportamiento: test de campo abierto, para analizar comportamientos relacionados con la ansiedad y test de reconocimiento de objetos, para estudiar la memoria a corto y largo plazo. Dichas pruebas tuvieron una duración de 3 días consecutivos y se llevaron a cabo durante los 3 primeros días de adaptación a las estaciones (semana 1) y durante los 3 primeros días del test de evaluación final (semana 6) (Figura 13). Las pruebas de comportamiento se realizaron siempre a primera hora de la mañana, antes de las sesiones de adaptación al ejercicio y del test de evaluación final, para que no se viese afectado el comportamiento.

Todos los animales pertenecientes a la **intervención de larga duración** realizaron un test de evaluación final durante la semana 16, para determinar sus capacidades físicas. Posteriormente, los que habían realizado ejercicio de fuerza y de resistencia continuaron entrenando 1 semana más (semana 17), para minimizar el efecto del test de evaluación final y mantener el efecto del entrenamiento específico (fuerza o resistencia). Los ratones entrenados fueron sacrificados 48 horas después de la finalización de la última sesión de entrenamiento (semana 17), para obtener datos basales y no la respuesta aguda del entrenamiento. En este caso, los controles también se sacrificaron el mismo día que los animales entrenados.

Por lo tanto, antes de comenzar con la intervención todos los animales tenían 2 meses de edad. Los pertenecientes a la intervención de corta duración fueron sacrificados con 3,5 meses, mientras que los que realizaron la intervención de larga duración se sacrificaron cuando tenían 6 meses de edad.

Tras el sacrificio de los ratones, se llevaron a cabo diferentes análisis bioquímicos e histológicos, que figuran en los siguientes apartados.

## 2. Test de comportamiento

Todos los test de comportamiento se llevaron a cabo en el mismo laboratorio del Bioterio, comenzándose siempre a primera hora de la mañana (08:30 AM). La habitación permaneció en todo momento cerrada para mantenerla insonorizada lo máximo posible. Además, el personal que manipuló a los animales lo hizo de forma cuidadosa y en silencio, evitando producir cualquier tipo de ruido que pudiese interferir en el comportamiento.

### 2.1. Test de campo abierto

El test de campo abierto permite analizar diferentes parámetros relacionados con la ansiedad o la hiperactividad, mediante el estudio del tiempo deambulatorio. La separación de cada ratón del grupo social en el que vive diariamente, así como su exposición ante un entorno de mayor área del habitual, conlleva que los animales se sientan desprotegidos, pudiendo mostrar un tiempo disminuido de exploración, asociado a un comportamiento ansioso (Seibenhener y Wooten, 2015). Por el contrario, tiempos de deambulación altos se relacionan con la hiperactividad (Krahe et al., 2015).

Para analizar la ansiedad y la actividad, se utilizó el protocolo descrito por de Lima y colaboradores (2005), con algunas modificaciones. Se colocó a los ratones en el centro de una jaula sin cubrir (60 x 38 x 19,5 cm) y se les dejó explorar libremente durante 5 minutos. Cada vez que se comenzó la prueba con un animal nuevo, se limpió la jaula con etanol al 30 %. Todo el test fue grabado con una cámara (HD Webcam C270, Logitech) colocada en posición cenital para su posterior visualización, cronometrándose el tiempo que permaneció cada ratón desplazándose por la jaula. Los vídeos fueron analizados por tres investigadores ciegos al experimento, aceptando un error de 3 segundos por cada 30 segundos de vídeo, y repitiéndose el análisis en caso de discrepancias.

## 2.2. Test de reconocimiento de objetos

El test de reconocimiento de objetos permite analizar la discriminación y la memoria a corto y largo plazo. Los roedores tienden a explorar aquellos objetos que son novedosos y no suponen una amenaza para ellos (Cohen y Stackman, 2015).

Para realizarlo, se utilizó el protocolo propuesto por de Lima y colaboradores (2005), con algunas modificaciones. El día antes de llevarlo a cabo, se adaptó a los ratones al espacio en el que iban a realizar el test: se les colocó en el centro de una jaula vacía (60 x 38 x 19,5 cm) y se les dejó explorar libremente durante 5 minutos.

La memoria a corto plazo se analizó 24 horas después de la adaptación. Para ello se colocó en la misma jaula dos objetos iguales en forma, color, tamaño y textura (bloques de construcción; A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>), y se dejó que cada ratón explorara durante 5 minutos. Los objetos que se utilizaron se situaron entre dos esquinas adyacentes de la jaula a una distancia de 10 cm de las paredes. Hora y media después, se cambió uno de los objetos (A<sub>2</sub>) por otro nuevo (B) que presentaba forma diferente, pero un tamaño similar y mismo color y textura, y se volvió a colocar a cada ratón en la jaula para que



**Figura 14. Test de reconocimiento de objetos.** Se observan dos ratones realizando el test de reconocimiento de objetos para analizar, en este caso, la memoria a corto plazo. En cada jaula hay dos objetos de diferente forma, pero mismo color y textura (objeto “A<sub>1</sub>” y objeto “B”).

explorara otros 5 minutos (Figura 14). 24 horas después se analizó la memoria a largo plazo. Para ello, se cambió el objeto “B” por otro objeto nuevo (C), de forma y color distintos, dejando que los ratones volviesen a explorar durante 5 minutos.

Cada ratón realizó el test siempre en la misma jaula y se siguió el mismo orden para cada uno de ellos. Cada vez que se comenzó una prueba se limpiaron la jaula y los objetos con etanol al 30 %. Los diferentes test se grabaron con una

cámara (HD Webcam C270, Logitech) colocada en posición cenital para su posterior análisis. Los vídeos fueron visualizados por tres investigadores ciegos al experimento y se contó el número de veces que cada ratón exploró cada uno de los objetos. Se consideró que el objeto estaba siendo explorado cuando el animal lo tocaba con sus patas o apuntaba al objeto con su hocico, con una separación máxima de 2 cm. Se aceptó un error de una exploración por cada 5 exploraciones al mismo objeto (a partir de las primeras 5 exploraciones). En caso de discrepancia, se visualizó el vídeo de nuevo por los tres investigadores. Por último, se calculó el índice de reconocimiento mediante las siguientes fórmulas:

- Índice de reconocimiento del objeto nuevo (B) en memoria a corto plazo:

$$\left[ \frac{N_B}{(N_{A1} + N_B)} \right] \times 100$$

Donde  $N_{A1}$  es el número de veces que el ratón exploró el objeto conocido "A1" y  $N_B$  el número de veces que exploró el objeto nuevo "B".

- Índice de reconocimiento del objeto nuevo (C) en memoria a largo plazo:

$$\left[ \frac{N_C}{(N_{A1} + N_C)} \right] \times 100$$

Donde  $N_{A1}$  es el número de veces que el ratón exploró el objeto conocido "A1" y  $N_C$  el número de veces que exploró el objeto nuevo "C".

### 3. Entrenamiento físico

Se llevaron a cabo dos tipos diferentes de intervenciones: de corta duración (2 semanas) y de larga duración (14 semanas). Dentro de cada una de ellas se realizaron dos tipos de entrenamiento distintos: fuerza y resistencia. Para el entrenamiento de fuerza se utilizó una escalera vertical, similar a la de otros estudios (Hornberger y Farrar, 2004), fabricada por el Dr. Benjamín Fernández García. La escalera consta de 40



**Figura 15. Ratones realizando entrenamiento de fuerza en la escalera vertical.**

escalones (varillas de 1,5 mm de diámetro separadas entre ellas 15 mm), con la posibilidad de regular el ángulo de inclinación entre 90° y 80°. En su parte superior hay un área de descanso de 20 x 20 cm para los animales (Figura 15). En el caso del entrenamiento de resistencia, se utilizó un tapiz rodante para rata (Panlab 8700). Este tapiz rodante (41,5 x 13 cm) permite regular tanto la inclinación de la cinta como la velocidad (Figura 16). Todos los protocolos utilizados para el entrenamiento fueron diseñados por el Dr. Benjamín Fernández García, con el objetivo de que fuesen progresivos (intercalando días de descanso para prevenir lesiones) y sin estímulos aversivos (evitando el uso de choques eléctricos u otros elementos agresivos).

#### 3.1. Adaptación

Antes de empezar el entrenamiento, todos los ratones fueron sometidos a una adaptación a la jaula control (jaula limpia en la que permanecen los controles mientras el resto entrena), así como a las estaciones de trabajo (escalera y tapiz rodante), para que se



**Figura 16. Ratones realizando entrenamiento de resistencia en el tapiz rodante.**

habituaran a ellas y aprendieran tanto a subir por la escalera como a correr en el tapiz. La adaptación se realizó de forma progresiva a lo largo de 10 días (5 días a la semana durante dos semanas). Además, los ratones fueron colocados de 4 en 4 en cada estación, para que estuvieran siempre acompañados y reducir el estrés a un lugar nuevo. Las adaptaciones a las estaciones de trabajo se realizaron siguiendo los siguientes protocolos (Tablas 1 y 2):

**Tabla 1. Protocolo de adaptación a la escalera.**

ADAPTACIÓN EN LA ESCALERA VERTICAL <sup>1</sup>	
Día	Metodología
1-5	Los ratones permanecen en la parte superior de la escalera durante 20 minutos.
6	Adaptación de 20 minutos. Cada 4 minutos se les pone a subir los últimos 5 escalones (ven la parte superior a la que deben llegar desde dicho escalón).
7	Adaptación de 20 minutos. Cada 4 minutos suben de 5 a 10 escalones (comienzan subiendo 5, y al final de la sesión deben saber alcanzar la parte superior desde el escalón número 10).
8	Adaptación de 20 minutos. Cada 4 minutos suben los últimos 10 escalones. Se les coloca esparadrapo en la cola para que se habitúen, ya que el peso, en futuras sesiones, se coloca con ayuda de este material.
9	Adaptación de 20 minutos. Cada 4 minutos suben 10 escalones con 5 g de peso en la cola.
10	Adaptación de 20 minutos. Cada 4 minutos suben 10 escalones con 20 g de peso en la cola.

<sup>1</sup> La adaptación a la escalera la realizaron todos los ratones durante los 10 días previos al comienzo del periodo de entrenamiento. En la escalera se pudo controlar el tiempo total de permanencia en la parte superior, el número de escalones a subir y la carga con la que ascendían. En la parte superior de la escalera se añadió serrín de la propia jaula de los ratones, para disminuir el estrés.

**Tabla 2. Protocolo de adaptación al tapiz rodante.**

ADAPTACIÓN EN EL TAPIZ RODANTE <sup>2</sup>				
Día	Tiempo total permanencia	Velocidad	Ángulo de inclinación	¿Serrín de la jaula?
1-3	20 minutos	0 cm/s	0°	Sí
4 y 5	20 minutos	0 cm/s	0°	No
6	20 minutos	12 cm/s	0°	No
7 y 8	20 minutos	10 cm/s	0°	No
9	20 minutos	10 cm/s	5°	No
10	20 minutos	10 cm/s	5° (los primeros 10 min) y 10° (los últimos 10 min)	No

<sup>2</sup> La adaptación al tapiz rodante la realizaron todos los ratones durante los 10 días previos al comienzo del periodo de entrenamiento. En el tapiz se pudo controlar el tiempo, la velocidad y el ángulo de inclinación. Además, se añadió serrín de la propia jaula de los ratones sobre la cinta de correr durante los primeros días, para disminuir el estrés.

### 3.2. Test de evaluación de la condición física

Todos los animales realizaron una prueba de evaluación de la fuerza y de la resistencia en la escalera y en el tapiz rodante, respectivamente. El test inicial se realizó después del periodo de adaptación y antes de comenzar el periodo de entrenamiento. Esta prueba permite determinar las capacidades físicas de cada ratón, a nivel de peso máximo levantado y de distancia máxima recorrida. De la misma forma, después de finalizar el periodo de entrenamiento se repitieron los test (test final) para determinar la efectividad y especificidad del entrenamiento. Además, tanto en el test inicial como en el final se pesó a cada animal.

El **test de evaluación inicial de fuerza** se llevó a cabo 72 horas después del último día de adaptación a las estaciones. Para ello, los ratones realizaron un calentamiento previo, sin peso, de diez series de diez escalones (10x10), tras el cual se les dejó descansar 2 minutos y se repitió una segunda vez.

El test de fuerza comenzó colocando a cada uno de los animales en el décimo escalón de la escalera vertical, ascendiendo con un peso de 10 g en la cola y un ángulo de inclinación de 85° con respecto a la horizontal. Cada vez que lograron alcanzar la parte superior de la estación, tras un descanso de 2 minutos, se les incrementó el peso en 5 g para el siguiente ascenso. Aquellos que no consiguieron ascender tuvieron una segunda oportunidad, cargando con el mismo peso, tras 2 minutos de recuperación. Si la segunda vez tampoco eran capaces de trepar, se les devolvía a su jaula, anotando el último peso con el que consiguieron subir los diez escalones y alcanzar la parte superior de la escalera. Una vez finalizado este test de evaluación, se esperó 72 horas antes de realizar el de resistencia, con el fin de que los ratones pudieran recuperarse del esfuerzo físico.

Para llevar a cabo el **test de evaluación inicial de resistencia**, los ratones hicieron un calentamiento de 3 minutos sobre el tapiz, a una velocidad de 10 cm/s y sin inclinación. El test comenzó con una velocidad de 10 cm/s y una inclinación de 10°. Posteriormente, se fue aumentando la velocidad 3,3 cm/s cada 3 minutos, manteniendo los grados de inclinación del tapiz. Cuando se observó que cada uno de los ratones comenzó a agotarse (no eran capaces de continuar corriendo a la velocidad del tapiz

rodante y chocaban con la pared trasera de la máquina), se les retiró de la estación, devolviéndoles a su jaula para descansar. A su vez, se apuntó el tiempo total que permanecieron corriendo y la velocidad con la que terminaron.

El **test de evaluación final** se realizó repitiendo exactamente el mismo protocolo que para el test inicial. También se dejaron 72 horas entre el test de evaluación final de fuerza y el de resistencia, para que los ratones pudieran recuperarse del esfuerzo físico (Anexo 1; Tablas suplementarias 1, 2, 3 y 4).

### **3.3. Entrenamiento**

Tras realizar el test inicial de condición física, se llevó a cabo un sorteo (adjudicando un número a cada ratón) para distribuir a los animales, al azar, en tres grupos: grupo control (no entrenados), grupo de fuerza (entrenados en la escalera vertical) y grupo de resistencia (entrenados en el tapiz rodante) (Figuras 15 y 16). Este sorteo se llevó a cabo tanto en la intervención de corta duración como en la de larga duración.

Ambas intervenciones fueron diseñadas para que los animales entrenasen 5 días por semana: durante 2 semanas (intervención de corta duración) o durante 14 semanas (intervención de larga duración).

Para calcular tanto la carga inicial, en el entrenamiento de fuerza, como la velocidad inicial, en el entrenamiento de resistencia, se tomaron los valores de fuerza máxima y de velocidad máxima, del ratón más débil de cada grupo, recogidos durante el test inicial. Posteriormente, se calculó el 50 % de dichos valores.

Durante las sesiones de entrenamiento los controles permanecieron en la misma habitación que los ratones entrenados y se les colocó en una jaula nueva a la que se le añadía serrín de su propia jaula, permaneciendo en ella mientras el resto de los animales estaban entrenando. Para los entrenamientos de fuerza y resistencia se siguieron los protocolos de las tablas de los anexos (Anexo 1; Figuras suplementarias 1, 2, 3 y 4).

## Material y métodos

Los animales del grupo de entrenamiento de 2 semanas (incluidos los controles), realizaron el test de evaluación final durante la sexta semana para determinar sus capacidades físicas. Posteriormente, llevaron a cabo una única sesión de entrenamiento más para diluir los efectos del test final antes del sacrificio (Anexo 1; Figuras suplementarias 1 y 2).

Todos los ratones pertenecientes al grupo de entrenamiento de 14 semanas de duración realizaron un test de evaluación final de fuerza y de resistencia en la semana 16 repitiendo la misma metodología que en el test inicial. Los que habían sido entrenados continuaron realizando ejercicio 1 semana más (semana 17), para minimizar el efecto del test de evaluación final (Anexo 1; Figuras suplementarias 3 y 4).

### 4. Obtención de tejidos

Todos los ratones se sacrificaron, por inhalación de CO<sub>2</sub>, 48 horas después de la última sesión de entrenamiento, a excepción de los controles pertenecientes a la intervención de 2 semanas, que se sacrificaron una semana más tarde. Inmediatamente después, se les extrajo el encéfalo realizando un corte sagital por la línea media para separar ambos hemisferios. El hemisferio derecho se fijó en paraformaldehído al 4 % (88047330; LCH Chimie) durante toda la noche a 4 °C para, posteriormente, ser procesado para los estudios histológicos. El hemisferio izquierdo se diseccionó, obteniendo por separado la corteza cerebral, el estriado, el hipocampo y el cerebelo, que fueron preservados a -80 °C para los correspondientes análisis bioquímicos.

### 5. Análisis histológicos

El procesamiento de las muestras para histología, correspondientes a los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> y sus respectivos Wt, fue realizado por la Unidad de Histopatología Molecular del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA). El hemisferio derecho, fijado en paraformaldehído al 4 %, se deshidrató en una batería de etanoles a diferentes concentraciones (50, 70, 80 y 96 %) durante 1 hora, seguido de 5

horas en etanol al 100 % y 5,5 horas en xilol. Posteriormente, se embebió en parafina durante 4 horas. Para realizar los análisis histológicos se realizaron cortes sagitales seriados de 4 µm de grosor, con ayuda del micrótopo (HM 350 S; Microm), que se introdujeron en una estufa a 55 °C durante 1 hora.

Mediante inmunohistoquímica se determinó el número de células que se encontraban en las diferentes fases de proliferación (con el anticuerpo anti-Ki-67) y de diferenciación (con el anticuerpo anti-DCX) en el DG del hipocampo.

Se desenmascararon los epítomos de las muestras en el PT Link (Dako) a pH 9 y 95 °C durante 20 minutos utilizando EnVision Flex Target Retrieval Solution High pH (K800421-2, Dako). A continuación, se incubaron las secciones con la solución de bloqueo Protein Block Serum-Free (X0909, Dako) durante 20 minutos y, después, con el anticuerpo primario correspondiente diluido en Envision FLEX antibody diluent (K8006, Dako), durante 30 minutos (Tabla 3). Posteriormente, se trataron las secciones con el anticuerpo secundario pertinente a temperatura ambiente durante 30 minutos (Tabla 4), y se revelaron con Liquid DAB (K34671, Dako) durante 5 minutos. Finalmente, se contratiñeron con hematoxilina (K8008, Dako) durante 10 minutos y se montaron los portaobjetos con medio de montaje (1.07961.0500, Entellán Nuevo, Merck).

**Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.**

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-Ki-67 clone SP6 monoclonal	1:150	DCS	KI681C01
Anti-DCX E-6 monoclonal	1:400	Santa Cruz Biotechnologies	sc-271390

**Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.**

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia
Anti-rabbit (Kit EnVision +/HRP)	Dako	K400211-2
Anti-mouse (Kit EnVision FLEX/HRP)	Dako	K8000

Para realizar el conteo de células positivas para Ki-67 y DCX, se visualizaron las muestras en un microscopio óptico (Nikon eclipse 80i), utilizando el programa informático NIS-Elements Basic Research. Las áreas del DG se midieron con el *software* ImageJ 2.0.0-rc-30.

## 6. Análisis bioquímicos

Para identificar y cuantificar los niveles de proteínas, se llevaron a cabo varios análisis mediante *Western blot* (WB) de la corteza cerebral, el estriado, el hipocampo y el cerebelo.

### 6.1. Homogeneización y cuantificación de proteínas

Cada estructura cerebral se disgregó, con ayuda de un homogeneizador Potter-Elvehjem de 2 ml (432-0200; VWR), en 200  $\mu$ l de tampón de homogeneización compuesto por: HEPES 20mM a pH 7,4; NaCl 100 mM; NaF 50 mM; EDTA 5 mM; Tritón X-100 1 %; ortovanadato 1 mM, pirofosfato 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas (11 873 580 001; Roche Diagnostics). A continuación, se centrifugó a 12000 g, a 4 °C durante 10 minutos utilizando una centrífuga MICRO STAR 17R (521-1647; VWR), y se recogieron los sobrenadantes, que fueron guardados a -80 °C hasta su utilización.

La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo mediante el ensayo del ácido bicinonínico (BCA), utilizando el kit comercial Pierce BCA Protein Assay (23227; Pierce Biothecnology Inc.) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para calcular la concentración de proteínas totales de cada muestra se midió la absorbancia a 562 nm, mediante un lector de placas (Varioskan<sup>®</sup> Flash; Thermo Fisher SCIENTIFIC) y el programa informático SKanIt RE for Varioskan Flash.

## 6.2. Western blot

Tanto la preparación de los geles como la electroforesis y la transferencia a las membranas se realizaron utilizando los soportes y las cubetas de Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad) y las fuentes de alimentación PowerPac™ Basic (Bio-Rad).

Se tomaron 15 µg de proteína de cada muestra homogeneizada y se les añadió tampón de carga (Tris/HCl 300 mM, a pH 6,8; SDS 10 %; glicerol 50 %; 2-mercaptoetanol 20 %, EDTA 40 mM y bromofenol 0,05 %). Después, se hirvieron en un baño durante 7 minutos y se cargaron en geles de SDS-poliacrilamida al 15 %. En los geles también se cargó el marcador Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (#161-0374; BioRad), que presenta un rango de peso molecular de 200 kDa-10 kDa.

Para el análisis específico de pro-LC3, se utilizó un tampón de carga con urea 8 M y tiourea 3 M (Tris/HCl 300 mM, a pH 6,8; SDS 2 %; glicerol 50 %; EDTA 8 mM, bromofenol 0,01 %, urea 8 M y tiourea 3 M). Las muestras se cargaron en geles de SDS-poliacrilamida al 16 %, con urea 6 M.

La electroforesis se realizó cubriendo todo el sistema con un tampón de electroforesis (Tris 248 mM; glicina 1,92 M y SDS 1 %) a un voltaje constante de 120 V. A continuación, se equilibraron los geles en el tampón de transferencia (Tris/HCl 248 mM, a pH 8,3, glicina 1,92 M y metanol al 20 %), y se colocaron sobre membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (10600021; GE Healthcare Life Sciences), previamente activadas con metanol. La transferencia se llevó a cabo en húmedo con el tampón de transferencia a un amperaje constante de 250 mA durante 1 hora, en agitación suave y en frío. Tras el tiempo de transferencia, se incubó las membranas con solución de bloqueo compuesta por BSA al 5 % disuelta en tampón TBS-T (Tris/HCl 200 mM a pH 7,6; NaCl 1,5 M y Tween-20 al 1 %).

Después de la fase de bloqueo se incubó cada membrana, durante toda la noche a 4 °C, con el correspondiente anticuerpo primario disuelto en solución de bloqueo (Tabla 5).

**Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de WB.**

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-LC3B	1:1000	Novus Biologicals	NB600-1384
Anti-p62/ SQSTM1 clone 2C11	1:1000	Abnova	H00008878-M01
Anti-ubiquitina (FK2)	1:1000	Millipore	04-263
Anti-fosfo-AMPK $\alpha$	1:1000	Cell Signaling	2535
Anti-AMPK $\alpha$ total	1:1000	Cell Signaling	2532
Anti-fosfo-p70 S6K	1:1000	Cell Signaling	9234
Anti-p70 S6K	1:1000	Cell Signaling	2708
Anti-CSP $\alpha$	1:750	Synaptic Systems	14003
Anti- $\alpha$ -sinucleína	1:1000	BD Transduction Laboratories	610787
Anti-SNAP-25	1:1000	Abcam	Ab5666
Anti- $\beta$ -actina conjugada con HRP	1:5000	Santa Cruz Biotechnologies	sc-47778

Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T y se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 6). A continuación, se volvieron a hacer otros tres lavados de 10 minutos con TBS-T y se revelaron las membranas con el sustrato Luminata<sup>TM</sup> Forte (WBLUF0500; Millipore). Las imágenes se capturaron en una cámara (ChemiDoc-It<sup>®</sup> BioChemi HR Camera; UVP) con ayuda del programa informático VisionWorksLs (UVP).

**Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de WB.**

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-rabbit IgG H&L	1:8000	Abnova	PAB10822
Anti-mouse	1:5000	Santa Cruz Biotechnologies	sc-2005

Después de incubar las membranas con los anticuerpos anti-fosfo-AMPK $\alpha$  y anti-fosfo-p70 (formas activas de la proteína) fue necesario medir la cantidad total de proteína, incubando con anti-AMPK $\alpha$  total y anti-p70 S6K. Para ello, se realizó la técnica de *stripping*, que permite eliminar los anticuerpos, previamente unidos a la membrana, manteniendo la integridad de los epítomos. Se incubó las membranas con la solución de *stripping* (Glicina 199,8 mM y Tween-20 al 30 %; a pH 2,5) durante 35 minutos a 65 °C. Posteriormente, se hicieron varios lavados con TBS-T (Tris/HCl 200

mM a pH 7,6; NaCl 1,5 M y Tween-20 al 1 %) y se incubaron con solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5 % disuelta en TBS-T) durante 1 hora. Por último, se incubaron de nuevo las membranas con el anticuerpo primario correspondiente, a 4 °C durante toda la noche, y se continuó con el protocolo anteriormente explicado.

Para la normalización de las muestras, se incubaron todas las membranas con anticuerpo frente a  $\beta$ -actina conjugada con el enzima peroxidasa de rábano (HRP) (sc-47778; Santa Cruz Biotechnologies).

La densitometría se realizó con el programa ImageJ 2.0.0-rc-30, a partir del cual se obtuvo la densidad óptica de cada proteína estudiada en las diferentes muestras.

## 7. Estadística

La normalidad de las variables se ha determinado a partir del test de Shapiro-Wilks. A los datos de la capacidad de fuerza y resistencia, así como los de las proteínas presinápticas (CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína), proteínas autofágicas (LC3-I, LC3-II, p62 y ubiquitina), AMPK y p70 S6K se les ha realizado la transformación log<sub>2</sub> para llevar a cabo su análisis.

Para comparar los valores iniciales y finales, dentro del mismo genotipo y del mismo tipo de entrenamiento, se utilizó la prueba t de Student para muestras dependientes. A su vez, para las comparaciones entre los tres tipos de entrenamiento (control, fuerza y resistencia) se utilizó, en el caso de las variables normales, una prueba ANOVA de un factor seguida del test *post hoc* de Tukey, y en el caso de las variables no normales la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test *post hoc* de Dunn. La comparación entre los genotipos (Wt vs. *atg4b*<sup>-/-</sup> y Wt vs. *atg4d*<sup>-/-</sup>), así como entre la edad de los ratones (3,5 meses vs. 6 meses), se hizo mediante la prueba t de Student para muestras independientes, en el caso de las variables normales, y el test U de Mann-Whitney para las variables no normales.

Para el análisis de las correlaciones se ha llevado a cabo el coeficiente de correlación Rho de Spearman.

## Material y métodos

En todos los casos se tuvo en cuenta un valor de significación de  $p \leq 0,05$ . Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa informático GraphPad Prism 7.

## **V. RESULTADOS**

## Resultados

## 1. Comportamiento en dos modelos de ratón con déficit de autofagia

Debido a que en otros estudios se ha observado que ratones con déficit total de autofagia presentaban cambios en el comportamiento (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Glatigny et al., 2019), en este trabajo quisimos analizar si el déficit parcial de autofagia también afecta a este nivel. Para ello se realizaron dos test de comportamiento a ratones *atg4d<sup>-/-</sup>*, de 15 meses de edad, y *atg4b<sup>-/-</sup>*, de 2 meses, y a sus respectivos Wt.

### 1.1. El déficit de Atg4d afecta a la conducta relacionada con la ansiedad y la memoria a corto plazo

El test de campo abierto permite evaluar diferentes factores de la conducta de los animales, como la hiperactividad o el estado de ansiedad (Krahe et al., 2015; Seibenhener y Wooten, 2015), cuando se encuentran en una zona abierta en la que no pueden esconderse. Este tipo de conductas están relacionadas con la región del hipocampo ventral, implicada en las emociones, el afecto o el estrés (Fanselow y Dong, 2010). Los ratones que sufren ansiedad permanecen más tiempo parados, presentando un tiempo deambulatorio menor, mientras que una mayor actividad produce justo el efecto contrario.

En el test de campo abierto, los ratones *atg4d<sup>-/-</sup>* permanecieron explorando más tiempo que los Wt ( $193,00 \pm 19,93$  s vs.  $133,88 \pm 11,10$  s;  $p = 0,032$ ), por lo que presentan mayor actividad (Figura 17).

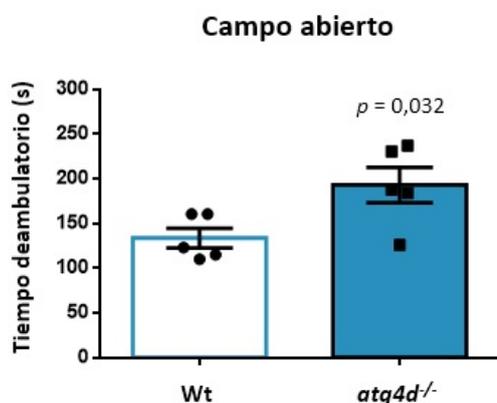


Figura 17. Tiempo de exploración de los ratones *atg4d<sup>-/-</sup>* y sus respectivos Wt en el test de campo abierto. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM;  $n = 5$  para cada grupo.

## Resultados

A la región dorsal del hipocampo se la relaciona con la cognición y la memoria (Fanselow y Dong, 2010). El test de reconocimiento de objetos ayuda a evaluar la capacidad de discriminación de los ratones entre dos objetos diferentes, permitiendo además analizar la memoria a corto y a largo plazo (Cohen y Stackman, 2015). Para ello, se calcularon los índices de reconocimiento de objetos,  $[N_B/(N_{A1}+N_B)] \times 100$  y  $[N_C/(N_{A1}+N_C)] \times 100$ , analizando el número de veces (N) que los ratones interactuaron con el objeto conocido A y con los objetos nuevos B y C.

Al estudiar la memoria a corto plazo, se observó que los ratones *atg4d*<sup>-/-</sup> presentaron un índice de reconocimiento mayor que sus respectivos Wt ( $0,65 \pm 0,052$  vs.  $0,44 \pm 0,080$ ), casi alcanzando la significación ( $p = 0,055$ ) (Figura 18, A). Sin embargo, no hubo diferencias entre genotipos en la memoria a largo plazo (Figura 18, B). Por lo tanto, el déficit de Atg4d podría aumentar la memoria a corto, pero no a largo plazo.

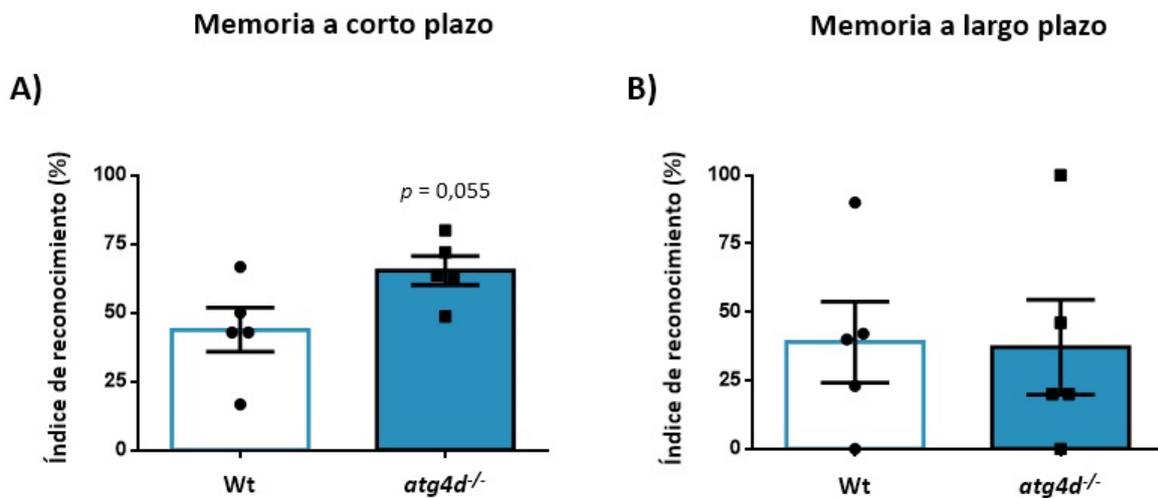


Figura 18. Índice de reconocimiento de los ratones *atg4d*<sup>-/-</sup> y sus respectivos Wt en los test de memoria a corto (A) y a largo plazo (B). Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; n = 5 para cada grupo.

## 1.2. Los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> podrían tener afectada la memoria a corto plazo

Los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> presentaron el mismo tiempo de deambulaci3n que los Wt (Figura 19).

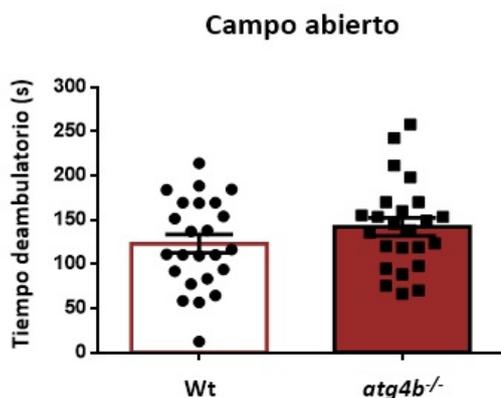


Figura 19. Tiempo de exploraci3n de los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> y sus respectivos Wt en el test de campo abierto. Los datos se representan como media ± SEM; n = 24 para cada grupo.

Al estudiar la memoria a corto plazo en los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> se observ3 que tendieron a presentar un índice de reconocimiento mayor que los Wt ( $141,25 \pm 10,39$  vs.  $123,10 \pm 10,36$ ;  $p = 0,074$ ) (Figura 20, A y B), mientras que no se detectaron diferencias entre ambos genotipos en la memoria a largo plazo. Por lo tanto, el déficit de Atg4b podrí afectar a la memoria a corto, pero no a largo plazo.

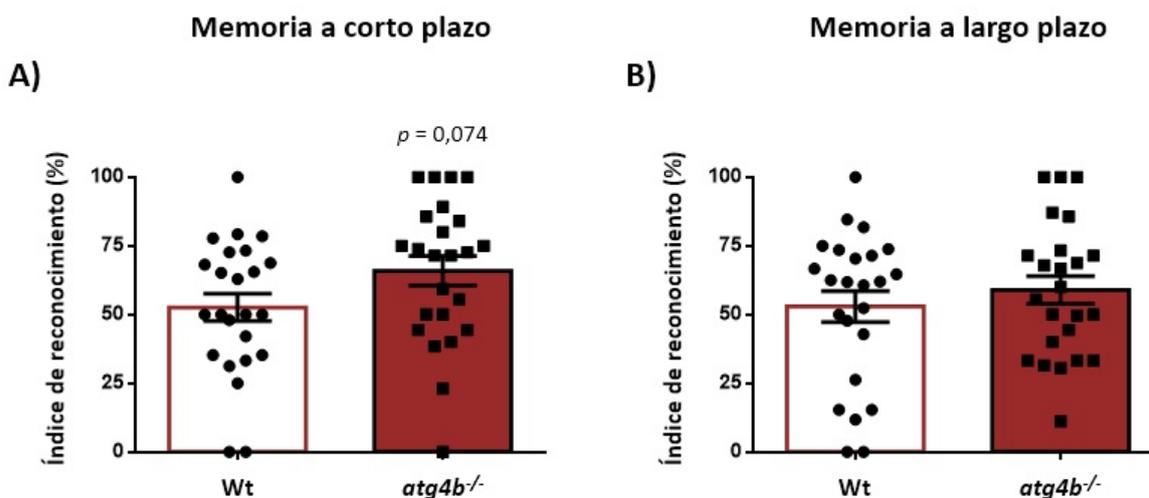


Figura 20. Índice de reconocimiento de los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> y sus respectivos Wt en los test de memoria a corto (A) y a largo plazo (B). Los datos se representan como media ± SEM; n = 24 para cada grupo.

## **2. Capacidad física en un modelo deficiente en autofagia tras el entrenamiento de fuerza y de resistencia**

Como observamos que el déficit parcial de autofagia podría producir alteraciones a nivel de comportamiento, nos propusimos evaluar si una intervención de ejercicio podría contrarrestar los efectos de dicho déficit, ya que se ha demostrado que el ejercicio de resistencia es un inductor de esta vía de degradación en el encéfalo (He et al., 2012b; Bayod, et al., 2014). Para ello, decidimos trabajar con el modelo *atg4b<sup>-/-</sup>* (al que también nos referiremos como KO) porque es el que está mejor caracterizado (Mariño et al., 2010). Así mismo, como no existen estudios previos que analicen el efecto del ejercicio de fuerza sobre la autofagia en el encéfalo, decidimos realizar, además de un entrenamiento de resistencia, otro de fuerza.

Todos los animales fueron capaces de llevar a cabo las intervenciones. Al finalizar los periodos de entrenamiento, los animales del estudio de corta duración realizaron 11 sesiones de entrenamiento con una frecuencia semanal media de 5,5 días por semana, mientras que los ratones de la intervención de larga duración realizaron 61 sesiones con una frecuencia semanal media de 4,4 días por semana.

### **2.1. El déficit parcial de autofagia afecta a la capacidad de fuerza, pero no a la de resistencia**

En primer lugar, fue necesario evaluar la capacidad física de los ratones de ambos genotipos antes del entrenamiento, para verificar si los animales eran capaces de llevar a cabo una intervención de ejercicio, así como determinar si los protocolos eran efectivos y mejoraban la cualidad entrenada tras la intervención. Para ello, se realizaron dos pruebas iniciales: un test para evaluar la capacidad de fuerza y otro para evaluar la capacidad de resistencia.

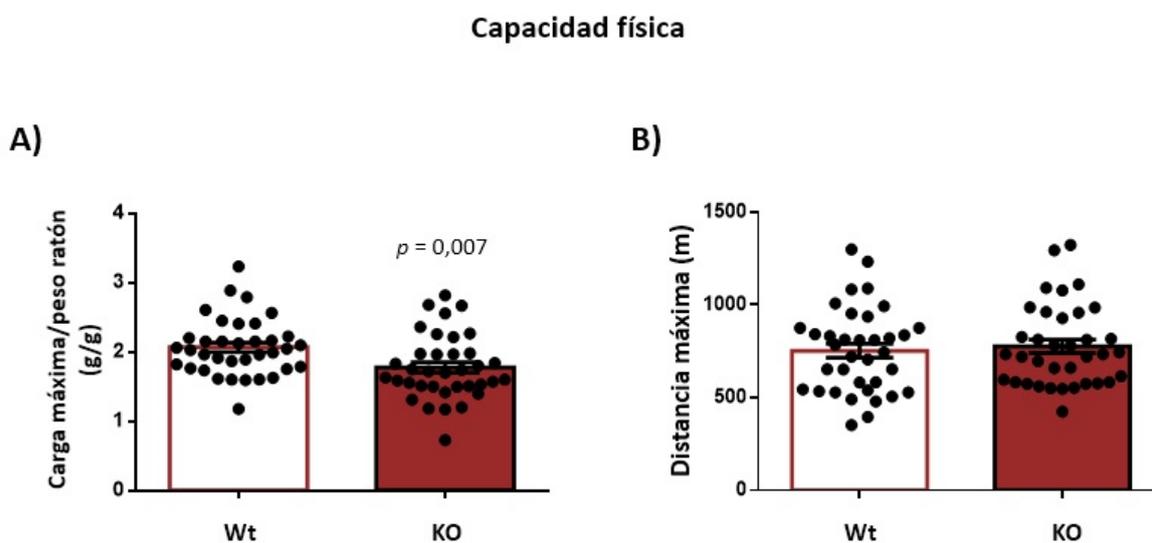
Todos los ratones fueron capaces de llevar a cabo los test de evaluación iniciales, lo que indicó que el periodo de adaptación a las estaciones fue eficaz y que los ratones eran aptos para realizar las intervenciones de ejercicio posteriores.

El test de evaluación de fuerza permite determinar la carga máxima con la que cada ratón es capaz de ascender por la escalera vertical, como representación de su fuerza máxima. Para analizarla se tomaron los valores de la carga máxima y del peso corporal de cada ratón, y se calculó la relación entre ambos factores (carga máxima/peso ratón). De esta forma se evita que el peso influya sobre el valor de la fuerza máxima.

Mediante el test de evaluación de resistencia se puede determinar la velocidad máxima que puede soportar un ratón al correr sobre el tapiz rodante mientras se le incrementa la velocidad de forma escalonada. En este caso se tomó la distancia que recorrió cada animal durante el test de evaluación.

Al analizar la capacidad inicial de fuerza y de resistencia de ambos genotipos, se observa que los ratones KO presentaron menor capacidad de fuerza que los Wt ( $1,78 \text{ g/g} \pm 0,078 \text{ g/g}$  vs.  $2,07 \text{ g/g} \pm 0,069 \text{ g/g}$ ;  $p = 0,007$ ) (Figura 21, A), mientras que ambos genotipos mostraron una capacidad de resistencia similar (Figura 21, B).

Por consiguiente, el déficit parcial de autofagia afecta a la capacidad de fuerza, pero no a la de resistencia.



**Figura 21. Capacidad física de los ratones Wt y KO.** A) Capacidad de fuerza en el test inicial de evaluación de la condición física. B) Capacidad de resistencia en el test inicial de evaluación de la condición física. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM;  $n = 36$  para cada grupo.

## 2.2. El entrenamiento de fuerza evita la pérdida de dicha calidad asociada al déficit parcial de autofagia

Una vez realizado el test de evaluación inicial, se llevaron a cabo las intervenciones de ejercicio, tras las cuales se volvió a repetir el test de evaluación (final), para determinar la capacidad física de los ratones después del entrenamiento y verificar la eficacia de los protocolos aplicados.

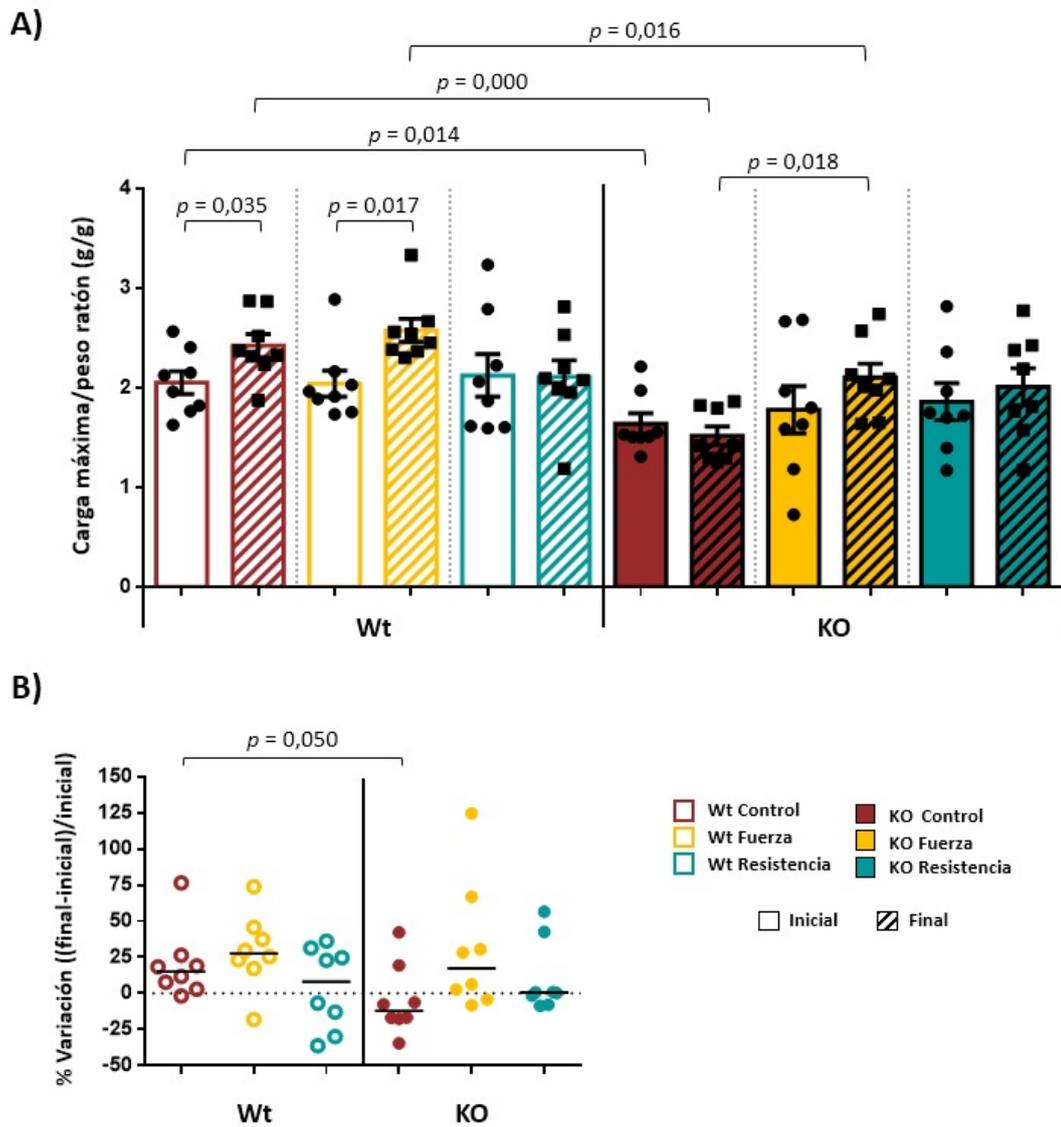
Cuando se compara la capacidad de fuerza antes y después de la intervención de 2 semanas, se observa que los Wt-2C presentaron mayor capacidad de fuerza en el test final con respecto al inicial ( $2,05 \pm 0,11$  g/g vs.  $2,42 \pm 0,12$  g/g;  $p = 0,035$ ), al igual que los Wt-2F ( $2,04 \pm 0,13$  g/g vs.  $2,58 \pm 0,12$  g/g;  $p = 0,017$ ); mientras que esto no se observa en los Wt-2R (Figura 22, A). Sin embargo, en el genotipo *atg4b*<sup>-/-</sup>, aunque no se vieron diferencias significativas entre la capacidad de fuerza inicial y final en ninguno de los grupos de entrenamiento, los KO-2F presentaron mayor capacidad de fuerza que los KO-2C al final del periodo de entrenamiento ( $2,10 \pm 0,14$  g/g vs.  $1,52 \pm 0,09$  g/g;  $p = 0,018$ ) (Figura 22, A).

Al comparar la capacidad de fuerza de ambos genotipos entre sí, se observa que los animales Wt-2C presentaron una mayor capacidad de fuerza que los KO-2C, tanto al inicio del entrenamiento ( $2,05 \pm 0,11$  g/g vs.  $1,64 \pm 0,11$  g/g;  $p = 0,014$ ) como al final del mismo ( $2,42 \pm 0,12$  g/g vs.  $1,52 \pm 0,09$  g/g;  $p = 0,000$ ) (Figura 22, A). Al expresar los datos como porcentaje de variación, se muestra que los ratones KO que no entrenaron sufrieron una pérdida de fuerza, mientras que los Wt la aumentaron ( $-12,14$  % vs.  $15,09$  %;  $p = 0,050$ ) (Figura 22, B). A su vez, tras el entrenamiento, los Wt-2F también tenían una capacidad de fuerza mayor que los KO-2F ( $2,58 \pm 0,12$  g/g vs.  $2,10 \pm 0,14$  g/g;  $p = 0,016$ ) (Figura 22, A), aunque no hubo diferencias entre los genotipos en cuanto al porcentaje de variación.

Por lo tanto, el protocolo de entrenamiento de fuerza aplicado no permitió ver diferencias de la calidad entrenada en los Wt. Sin embargo, el déficit parcial de autofagia favorece la pérdida progresiva de fuerza en ratones jóvenes, y el entrenamiento de dicha calidad podría frenar su pérdida.

## Capacidad de fuerza

2 semanas



**Figura 22.** Capacidad de fuerza de los ratones Wt y KO entrenados durante 2 semanas. **A)** Capacidad de fuerza en el test inicial y final de evaluación de la condición física. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM. **B)** Porcentaje de variación de la capacidad de fuerza. Los datos se representan como mediana. Para cada grupo  $n = 8$ .

## Resultados

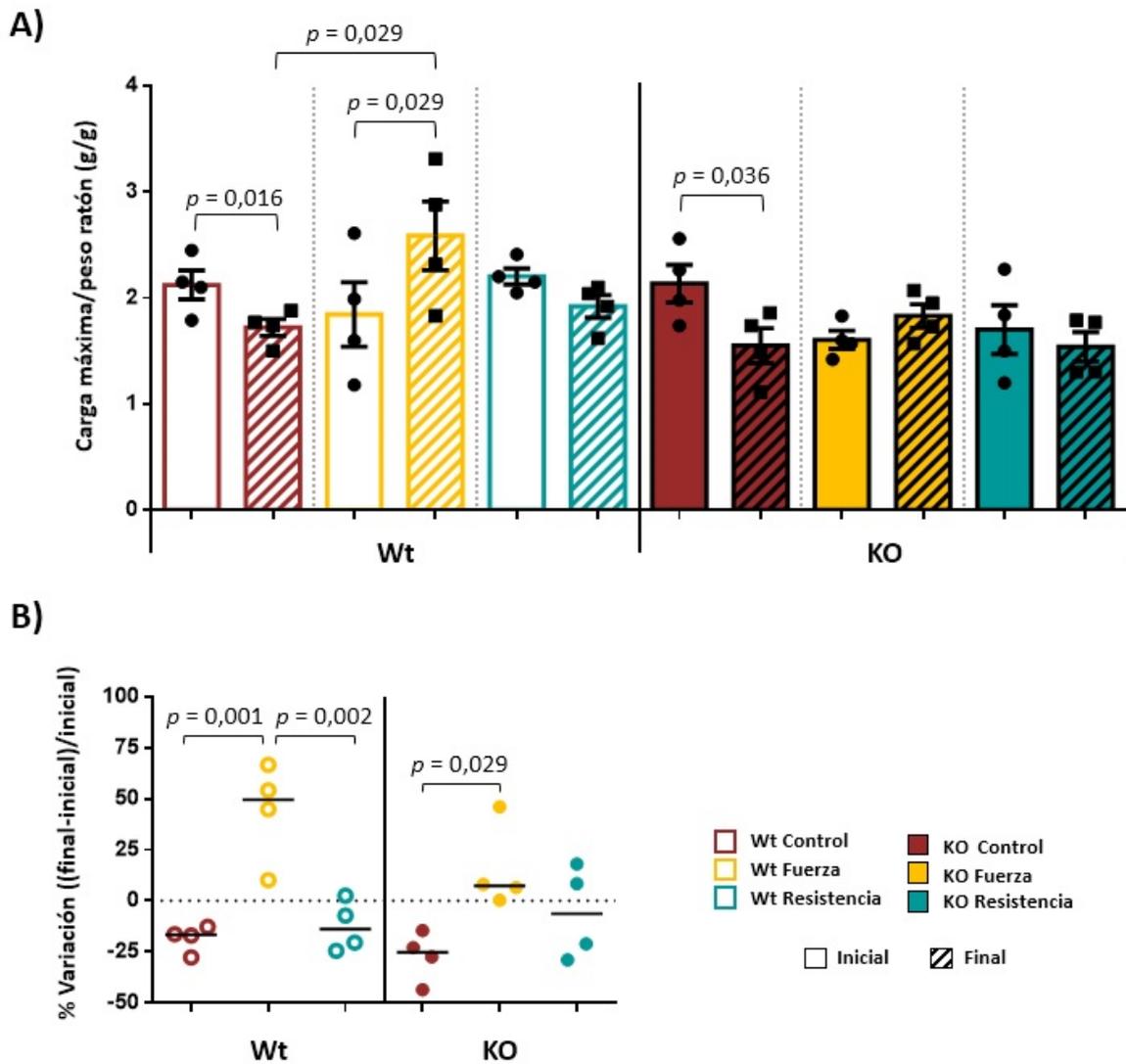
Al analizar los resultados de los ratones que llevaron a cabo la intervención durante 14 semanas, se observa que los Wt-14C presentaron menor capacidad de fuerza en el test de evaluación final frente al inicial ( $1,72 \pm 0,08$  g/g vs.  $2,12 \pm 0,14$  g/g;  $p = 0,016$ ). Sin embargo, los Wt-14F aumentaron esta capacidad después del entrenamiento ( $1,85 \pm 0,31$  g/g vs.  $2,59 \pm 0,32$  g/g;  $p = 0,029$ ), presentando mayor fuerza que los Wt-14C en el test final ( $2,59 \pm 0,32$  g/g vs.  $1,72 \pm 0,08$  g/g;  $p = 0,029$ ) (Figura 23, A). El porcentaje de variación de la capacidad de fuerza indicó que Wt-14F mejoraron dicha capacidad frente a los Wt-14C (49,55 % vs. -16,60 %;  $p = 0,001$ ) y los Wt-14R (49,55 % vs. -13,80 %;  $p = 0,002$ ) (Figura 23, B). Estos resultados demuestran que los animales Wt que no entrenaron disminuyeron su capacidad de fuerza a lo largo del periodo de intervención. En este caso, el protocolo de entrenamiento aplicado fue eficaz, permitiendo revertir la pérdida de fuerza, e incluso aumentarla, tras 14 semanas de entrenamiento.

En el caso de los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> solo se observan diferencias significativas en la capacidad de fuerza de los ratones que no entrenaron; los KO-14C disminuyeron su fuerza desde el inicio de la intervención hasta la finalización de la misma ( $2,14 \pm 0,18$  g/g vs.  $1,55 \pm 0,17$  g/g;  $p = 0,036$ ) (Figura 23, A). De hecho, presentaron un porcentaje de variación negativo, mientras que los KO-14F mantuvieron la capacidad de fuerza (-25,15 % vs. 7,35 %;  $p = 0,029$ ) (Figura 23, B). Este resultado confirma que el déficit parcial de autofagia afecta negativamente a la capacidad de fuerza a largo plazo. Sin embargo, el entrenamiento de esta cualidad impide el deterioro de la misma.

Tomando todos estos datos en conjunto, se puede afirmar que los Wt necesitan más de 2 semanas de entrenamiento para mejorar la capacidad de fuerza, mientras que la intervención de 14 semanas resulta eficaz y específica de la cualidad entrenada. En el caso de los KO, tanto la intervención de 2 semanas como la de 14 semanas permiten frenar el deterioro de la capacidad de fuerza que sufren estos animales.

## Capacidad de fuerza

14 semanas



**Figura 23.** Capacidad de fuerza de los ratones Wt y KO entrenados durante 14 semanas. **A)** Capacidad de fuerza en el test inicial y final de evaluación de la condición física. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM. **B)** Porcentaje de variación de la capacidad de fuerza. Los datos se representan como mediana. Para cada grupo  $n = 4$ .

### **2.3. El déficit parcial de autofagia a largo plazo podría afectar a la respuesta adaptativa al entrenamiento de resistencia**

El ejercicio de resistencia es el entrenamiento más estudiado en la bibliografía, en el caso de los modelos murinos con déficit de autofagia. Al igual que se evaluó la capacidad de fuerza de los ratones tras el entrenamiento, para verificar la eficacia de los protocolos, también se analizó la capacidad de resistencia.

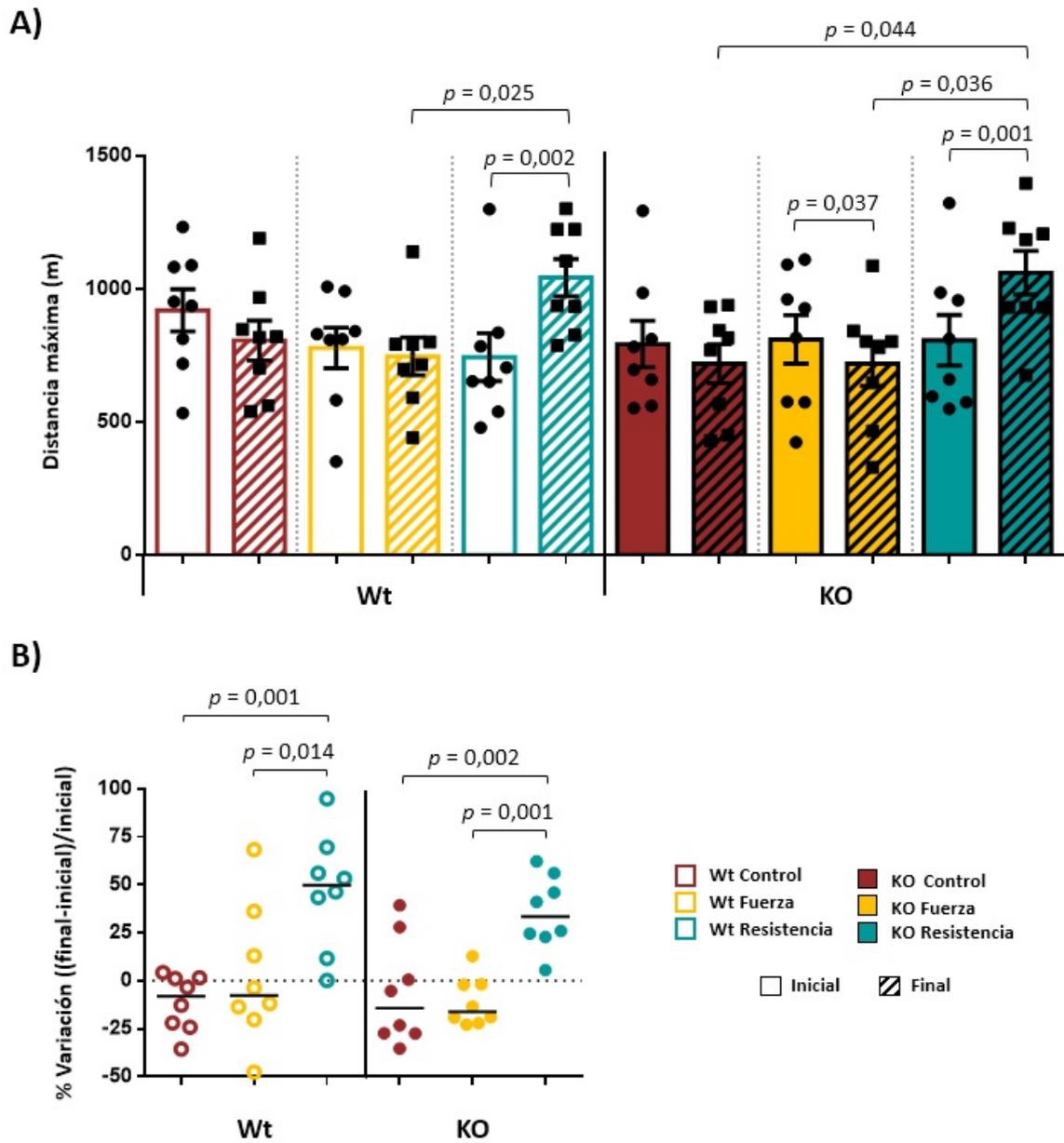
Al comparar la capacidad de resistencia antes y después de la intervención de 2 semanas, se observa que los ratones Wt-2R corrieron más distancia tras la intervención ( $1042,81 \pm 69,60$  m vs.  $743,85 \pm 89,58$  m;  $p = 0,002$ ) (Figura 24, A), siendo su porcentaje de variación mayor que el de los Wt-2C ( $49,81$  % vs.  $-8,05$  %;  $p = 0,001$ ) y los Wt-2F ( $49,81$  % vs.  $-7,71$  %;  $p = 0,014$ ) (Figura 24, B). Lo mismo se observa en los KO-2R, que presentaron ganancia de resistencia al final del entrenamiento ( $1061,20 \pm 82,02$  m vs.  $807,87 \pm 95,17$  m;  $p = 0,001$ ) y mayor porcentaje de variación de la resistencia respecto a los KO-2C ( $33,49$  % vs.  $-14,26$  %;  $p = 0,002$ ) y los KO-2F ( $33,49$  % vs.  $-16,22$  %;  $p = 0,001$ ) (Figuras 24, A y B). Los ratones KO-2F corrieron menos distancia en el test final frente al inicial ( $719,95 \pm 83,32$  m vs.  $810,64 \pm 91,22$  m;  $p = 0,037$ ).

Después del entrenamiento, los Wt-2R corrieron una distancia mayor que los Wt-2F ( $1042,81 \pm 69,60$  m vs.  $747,00 \pm 70,97$  m;  $p = 0,025$ ), al igual que en el genotipo *atg4b*<sup>-/-</sup>, donde los KO-2R corrieron mayor distancia que los KO-2F ( $1061,20 \pm 82,02$  m vs.  $719,95 \pm 83,32$  m;  $p = 0,036$ ) y que los KO-2C ( $1061,20 \pm 82,02$  m vs.  $719,45 \pm 73,21$  m;  $p = 0,044$ ) (Figura 24, A).

Por lo tanto, el protocolo de resistencia en la intervención de 2 semanas fue eficaz y específico de la cualidad entrenada. Además, no solo los animales del genotipo Wt aumentaron la capacidad de resistencia después de la intervención, sino que también se observó en los ratones que presentaban déficit parcial de autofagia.

## Capacidad de resistencia

2 semanas



**Figura 24.** Capacidad de resistencia de los ratones Wt y KO entrenados durante 2 semanas. **A)** Capacidad de resistencia en el test inicial y final de evaluación de la condición física. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM. **B)** Porcentaje de variación de la capacidad de resistencia. Los datos se representan como mediana. Para cada grupo n = 8.

## Resultados

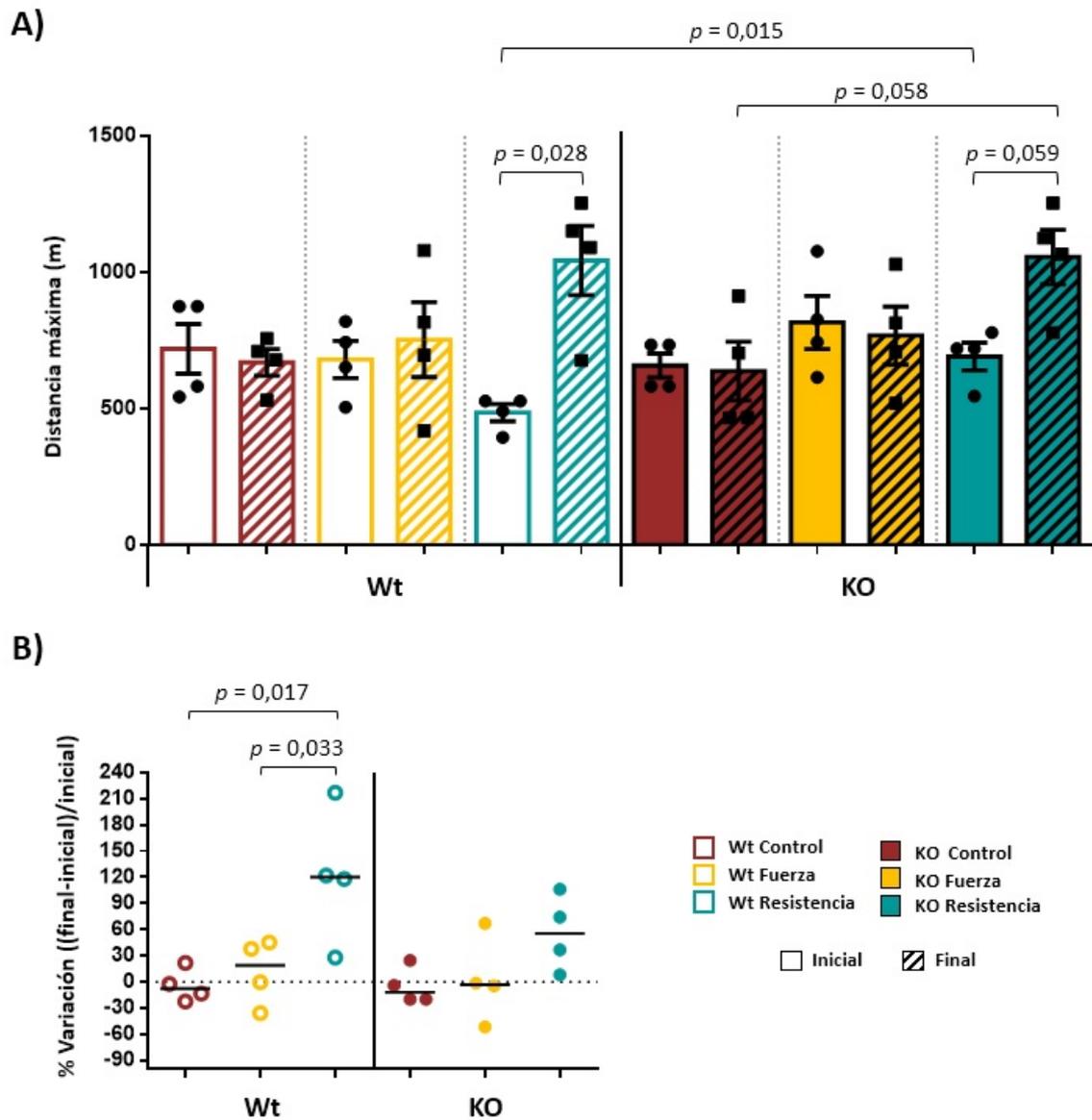
En el caso de los ratones que realizaron la intervención durante 14 semanas, se observa la misma tendencia que en la de 2 semanas. Los Wt-14R corrieron mayor distancia en el test de evaluación final que en el inicial ( $1043,31 \pm 126,71$  m vs.  $485,88 \pm 31,41$  m;  $p = 0,028$ ) y mostraron un porcentaje de variación de la resistencia mayor que los Wt-14F ( $120,05$  % vs.  $18,73$  %;  $p = 0,033$ ) y los Wt-14C ( $120,05$  % vs.  $-7,89$  %;  $p = 0,017$ ) (Figuras 25, A y B). Los KO-14R también presentaron mayor resistencia en el test final frente al inicial ( $1056,27 \pm 100,23$  m vs.  $691,60 \pm 50,34$  m), casi alcanzando la significación ( $p = 0,059$ ), siendo su capacidad de resistencia al final de la intervención mayor que la de los KO-14C ( $1056,27 \pm 100,23$  m vs.  $638,05 \pm 107,62$  m;  $p = 0,058$ ) (Figura 25, A). Sin embargo, esto no se reflejó en el porcentaje de variación del genotipo *atg4b*<sup>-/-</sup>, ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos de entrenamiento. Este resultado indicaría que el déficit de autofagia podría afectar a la capacidad de resistencia a largo plazo.

Por otro lado, al inicio de la intervención, los ratones Wt-14R corrieron menor distancia que los KO-14R ( $485,88 \pm 31,41$  m vs.  $691,60 \pm 50,34$  m;  $p = 0,015$ ), aunque la mejora de la capacidad de resistencia tras el entrenamiento fue mayor en los Wt frente a los *atg4b*<sup>-/-</sup> ( $557,43$  m vs.  $364,67$  m).

Todos estos datos muestran que el protocolo del entrenamiento de resistencia durante 14 semanas fue eficaz y específico de la cualidad entrenada.

## Capacidad de resistencia

14 semanas



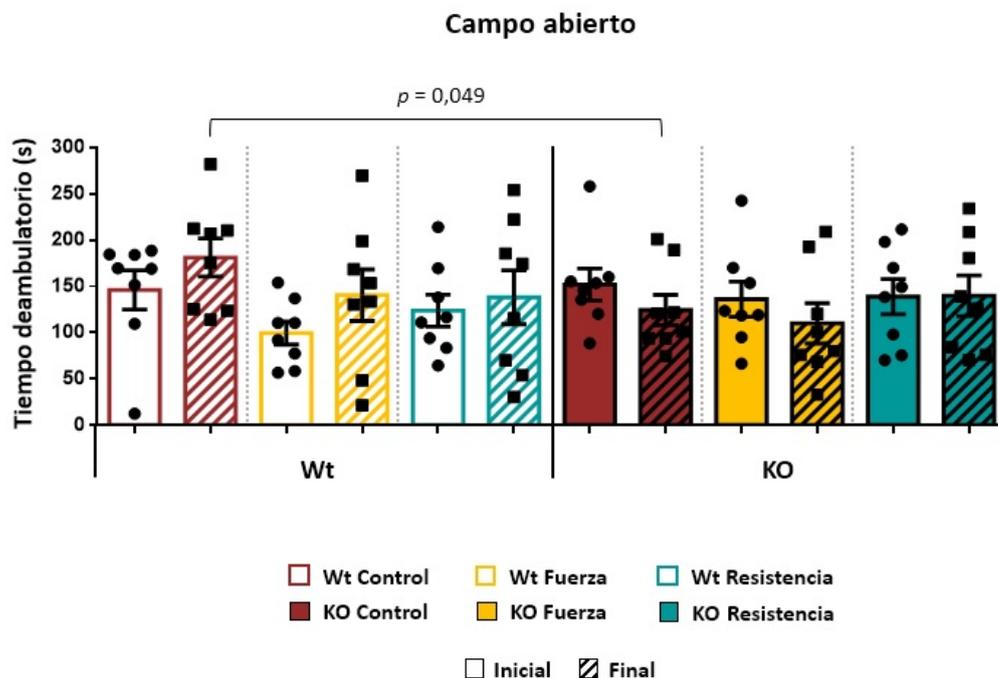
**Figura 25.** Capacidad de resistencia de los ratones Wt y KO entrenados durante 14 semanas. **A)** Capacidad de resistencia en el test inicial y final de evaluación de la condición física. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM. **B)** Porcentaje de variación de la capacidad de resistencia. Los datos se representan como mediana. Para cada grupo  $n = 4$ .

### 3. Efecto del entrenamiento en el comportamiento de ratones *atg4b*<sup>-/-</sup>

Para determinar si el ejercicio produce adaptaciones a nivel de conducta, se les volvió a realizar el test de campo abierto y el test de reconocimiento de objetos a los ratones pertenecientes al entrenamiento de 2 semanas.

#### 3.1. El déficit parcial de autofagia podría estar relacionado con la ansiedad

Como se mostró previamente, los ratones de ambos genotipos no presentaron diferencias en el tiempo deambulatorio a los 2 meses de edad (Figura 19). Así mismo, al comparar el tiempo de exploración antes y después de la intervención, no se encontraron diferencias en ninguno de los grupos. Sin embargo, los Wt-2C de 3,5 meses de edad exploraron más tiempo que los KO-2C de la misma edad ( $181,23 \pm 20,55$  s vs.  $124,44 \pm 16,38$  s;  $p = 0,049$ ) (Figura 26). Por otro lado, el entrenamiento, independientemente del tipo de ejercicio, no afectó al tiempo deambulatorio en ninguno de los dos genotipos.



**Figura 26. Tiempo de exploración de los ratones Wt y KO entrenados durante 2 semanas, en los test inicial y final.** Tiempo de exploración entre los diferentes grupos de entrenamiento. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM;  $n = 8$  para cada grupo de entrenamiento.

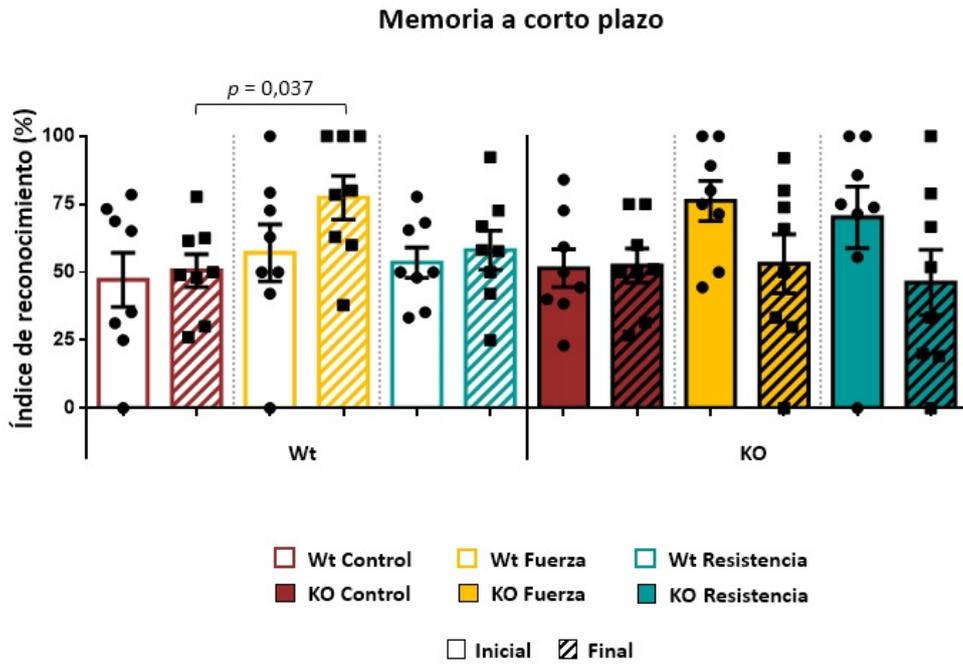
Por lo tanto, aunque 2 semanas de entrenamiento no parecen afectar a la actividad, el déficit parcial de autofagia podría influir sobre el tiempo de exploración.

### **3.2. El ejercicio de fuerza mejora la memoria a corto plazo, y el déficit parcial de autofagia impide este efecto**

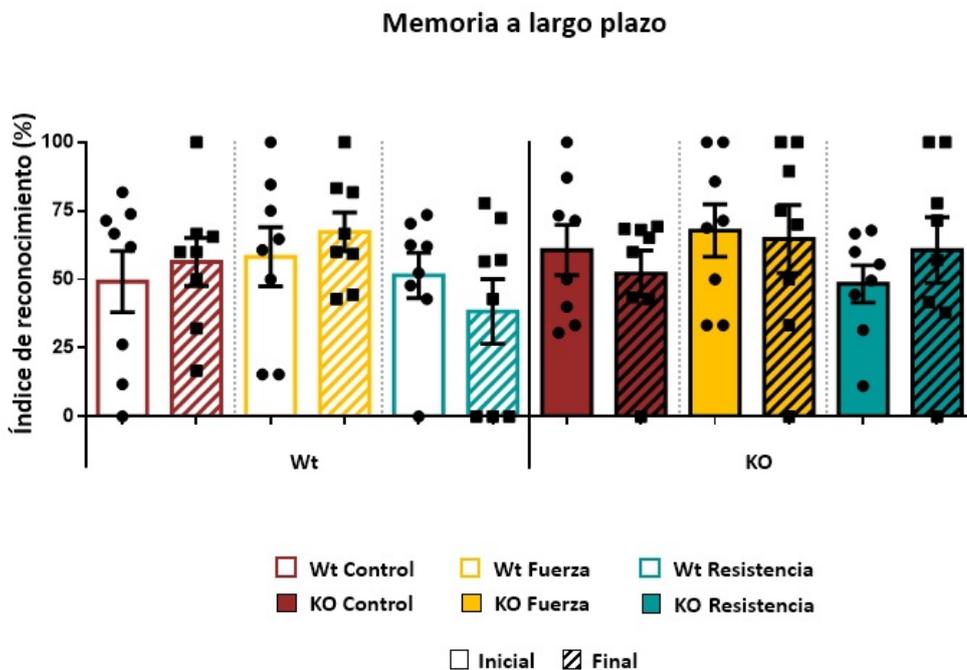
Como se vio inicialmente, a los 2 meses de edad los ratones Wt y *atg4b*<sup>-/-</sup> no mostraron diferencias significativas en la memoria, tanto a corto plazo como a largo plazo (Figura 20). Posteriormente, al comparar el índice de reconocimiento antes y después de la intervención de 2 semanas, no se encontraron diferencias en ninguno de los grupos de entrenamiento. Sin embargo, a los 3,5 meses de edad, los Wt-2F presentaron un índice de reconocimiento mayor que los Wt-2C ( $77,42 \pm 8,04$  % vs.  $50,61 \pm 6,03$  %;  $p = 0,037$ ), no observándose diferencias entre los grupos de entrenamiento en los *atg4b*<sup>-/-</sup> (Figura 27).

Al analizar la memoria a largo plazo no se observó ninguna diferencia significativa entre los genotipos y grupos de entrenamiento (Figura 28).

Por lo que parece que, aunque 2 semanas de entrenamiento no afectan a la memoria, el entrenamiento de fuerza podría mejorarla a corto plazo.



**Figura 27.** Índice de reconocimiento de los ratones Wt y KO entrenados durante 2 semanas, en los test de memoria a corto plazo (inicial y final). Comparación de la memoria a corto plazo entre los diferentes grupos de entrenamiento. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM;  $n= 8$  para cada grupo de entrenamiento.



**Figura 28.** Índice de reconocimiento de los ratones Wt y KO entrenados durante 2 semanas, en los test de memoria a largo plazo (inicial y final). Comparación de la memoria a largo plazo entre los diferentes grupos de entrenamiento. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM;  $n= 8$  para cada grupo de entrenamiento.

## 4. Adaptaciones neuronales al entrenamiento

### 4.1. Análisis de la neurogénesis

Una de las principales regiones cerebrales en la que se ha detectado la presencia de neurogénesis adulta es el DG del hipocampo (Aimone et al., 2014), y el ejercicio de resistencia es un factor extrínseco muy importante en su inducción (van Praag et al., 1999). Para estudiar el proceso neurogénico en esta región del cerebro, se analizó el número de células con potencial proliferativo, mediante el marcador nuclear Ki-67, y los precursores neuronales, utilizando el marcador citoplasmático DCX. Se realizaron inmunohistoquímicas para ambos marcadores en muestras de cerebro de los ratones Wt y *atg4b*<sup>-/-</sup> entrenados durante 2 y 14 semanas.

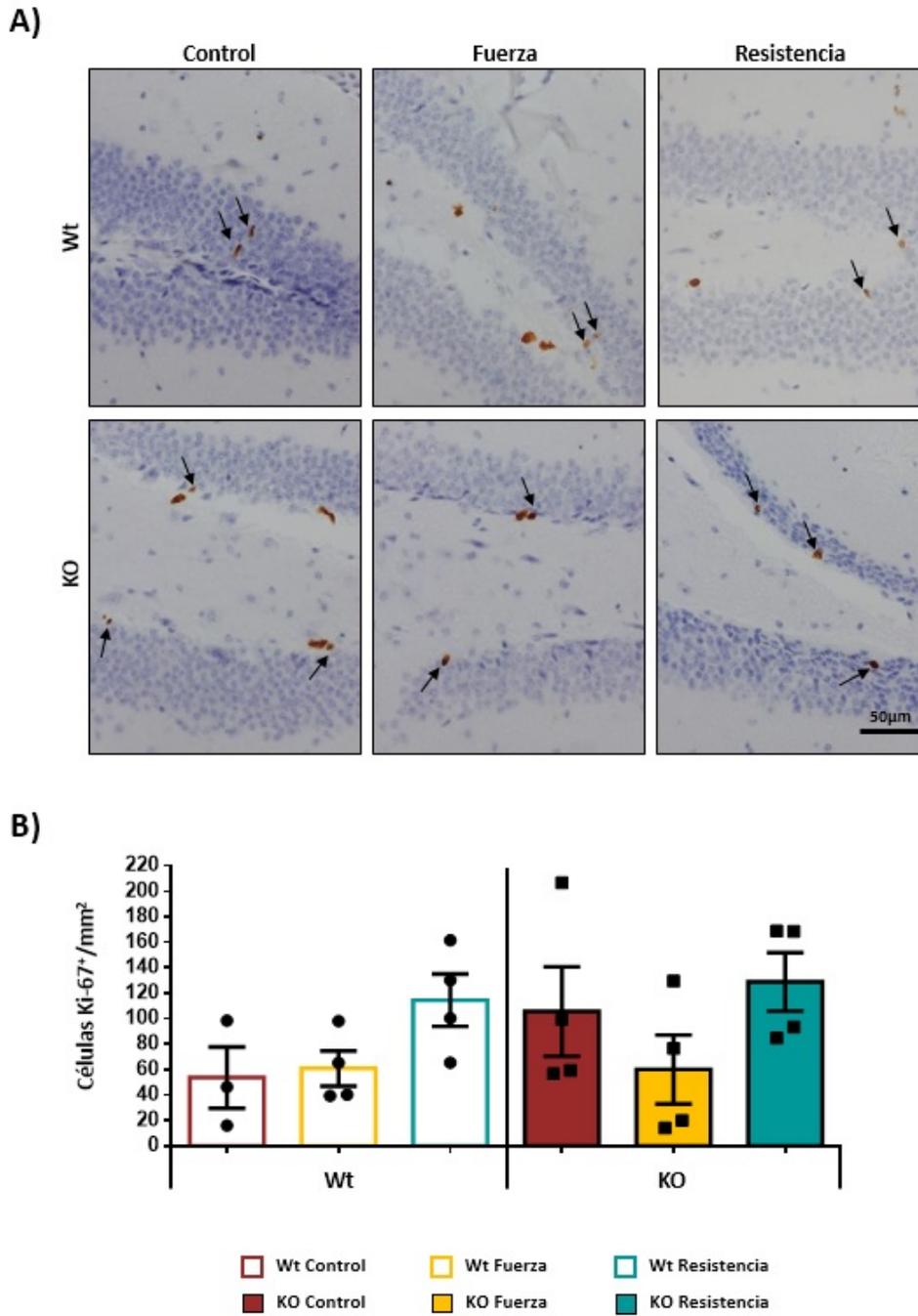
#### 4.1.1. El potencial proliferativo de los progenitores neuronales disminuye drásticamente antes de los 6 meses de edad

Los ratones pertenecientes a la intervención de 2 semanas comenzaron el estudio con 2 meses de edad y lo finalizaron cuando tenían 3,5 meses. En ese momento, los animales de ambos genotipos no presentaron diferencias significativas entre los grupos de entrenamiento en el número de células positivas para Ki-67 (Figura 29).

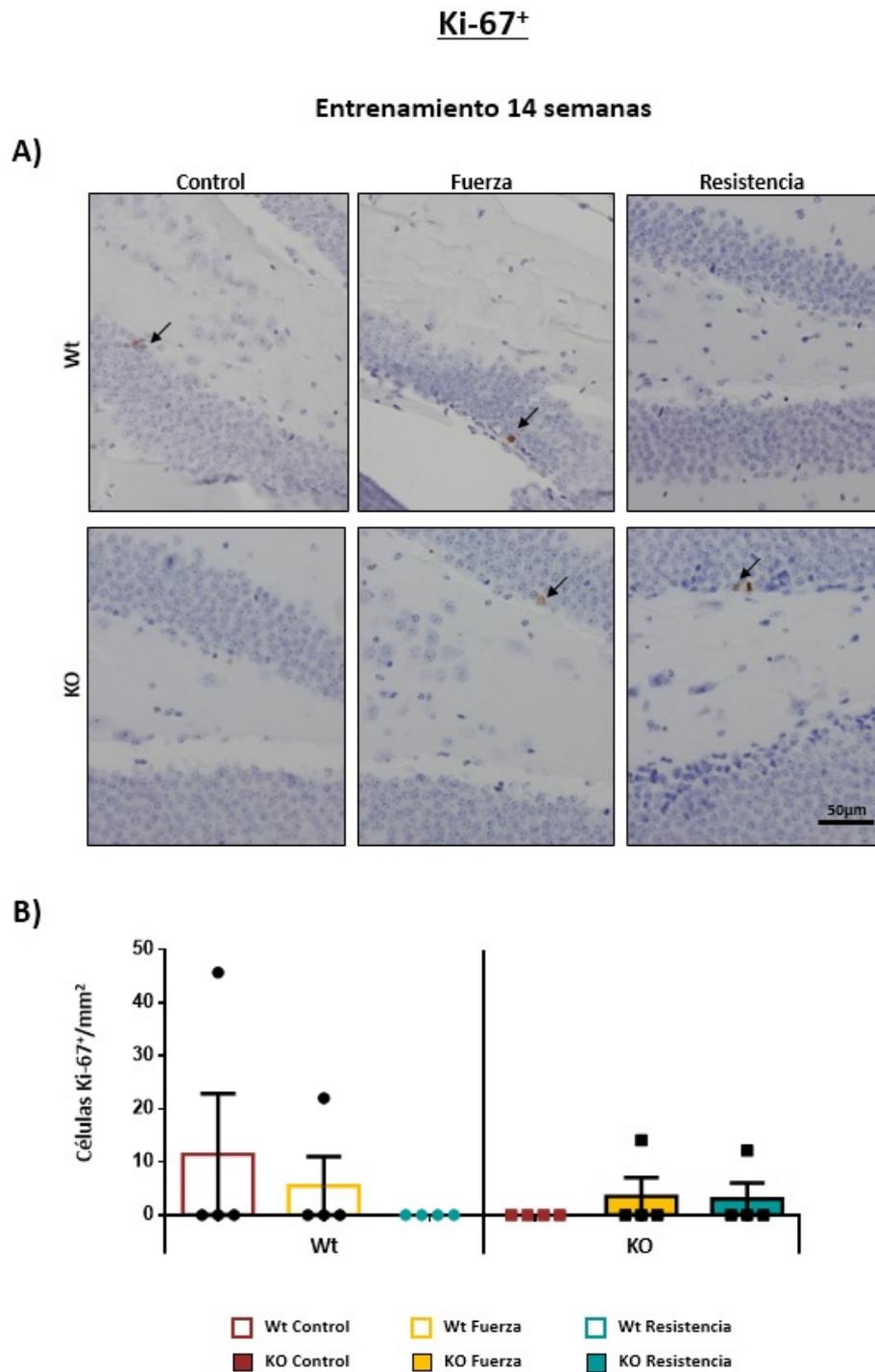
En el caso de los ratones que entrenaron durante 14 semanas también comenzaron el estudio con 2 meses de edad, pero finalizaron la intervención cuando tenían 6 meses. Al igual que observamos en los animales pertenecientes al entrenamiento de 2 semanas, no se encontraron diferencias significativas en el número de células Ki-67<sup>+</sup> entre los grupos de entrenamiento de ambos genotipos (Figura 30).

**Ki-67<sup>+</sup>**

**Entrenamiento 2 semanas**



**Figura 29. Células positivas para Ki-67 de los ratones Wt y KO entrenados durante 2 semanas.**  
**A)** Imágenes representativas del marcaje con Ki-67 (flechas). **B)** Cuantificación de células positivas para Ki-67. Los datos se representan como media ± SEM; n= 4 para cada grupo.



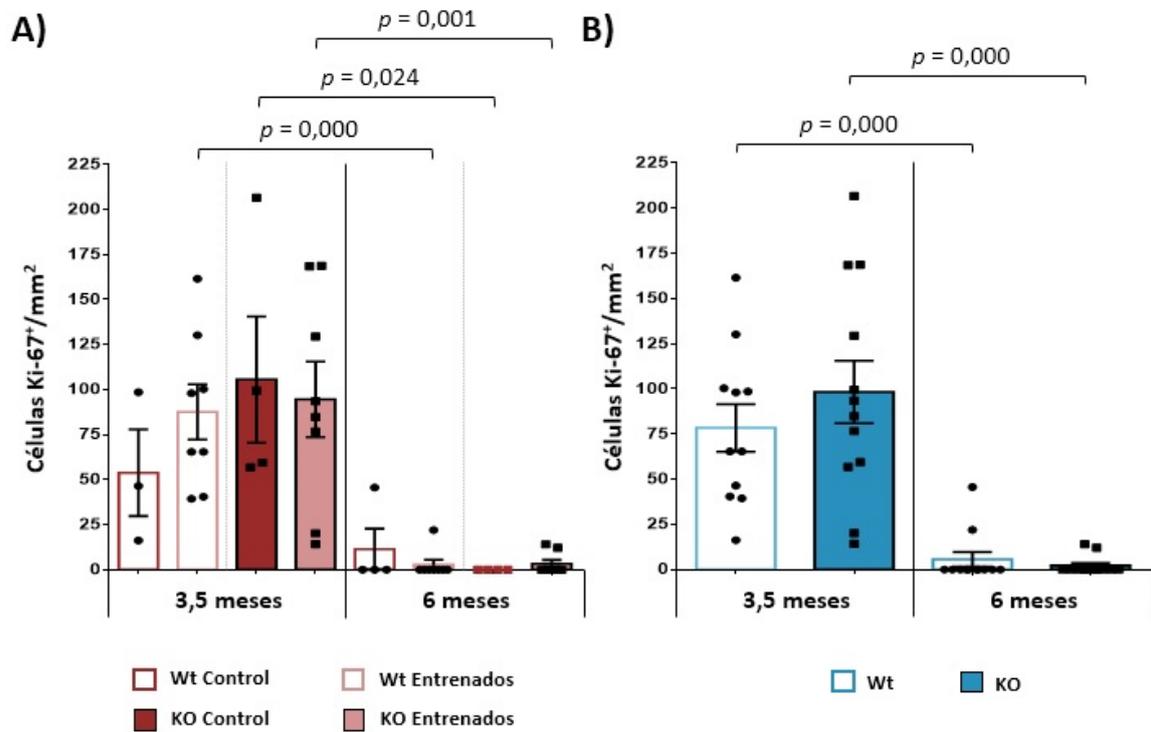
**Figura 30.** Células positivas para Ki-67 de los ratones Wt y KO entrenados durante 14 semanas. **A)** Imágenes representativas del marcaje con Ki-67 (flechas). **B)** Cuantificación de células positivas para Ki-67. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; n= 4 para cada grupo.

## Resultados

Debido a que no se encontraron diferencias en el número de células Ki-67<sup>+</sup> entre los grupos de entrenamiento de cada genotipo, se decidió comparar los animales controles frente a todos los que entrenaron (fuerza y resistencia) en cada uno de los genotipos. Así mismo, también se compararon todos los ratones de cada genotipo, independientemente de si entrenaron o no. Estas comparaciones se llevaron a cabo entre los ratones que tenían 3,5 meses de edad en el sacrificio, frente a los que tenían 6 meses.

Al analizar las células Ki-67<sup>+</sup> en los animales controles y en los que entrenaron se observa que los Wt entrenados de 3,5 meses de edad presentaron mayor número de células positivas que los de 6 meses ( $87,65 \pm 15,29$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $2,75 \pm 2,75$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,000$ ). En el caso de los *atg4b*<sup>-/-</sup>, los KO control de 3,5 meses de edad mostraron mayor número de células positivas que los de 6 meses ( $105,64 \pm 35,08$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $0,00 \pm 0,00$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,024$ ), al igual que los KO que entrenaron ( $94,57 \pm 20,96$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $3,28 \pm 2,16$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,001$ ) (Figura 31, A). Así mismo, al comparar todos los animales Wt frente a todos los KO, de ambas edades, se obtuvieron resultados similares; los Wt de 3,5 meses presentaron más células Ki-67<sup>+</sup> que los de 6 meses ( $78,42 \pm 13,16$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $5,64 \pm 4,07$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,000$ ), y lo mismo se observó en el genotipo KO ( $98,26 \pm 17,34$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $2,19 \pm 1,48$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,000$ ) (Figura 31, B). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas dentro de cada una de las edades, tanto entre los controles y los entrenados como entre los dos genotipos.

Por lo tanto, aunque la edad es un factor importante que disminuye el potencial proliferativo de las células del DG del hipocampo, ni el ejercicio ni el déficit de autofagia influyen en dicho potencial.

**Ki-67<sup>+</sup>**

**Figura 31. Células positivas para Ki-67.** A) Cuantificación de células positivas para Ki-67 en los ratones Wt y KO entrenados y no entrenados. B) Cuantificación de células positivas para Ki-67 en los ratones Wt y KO. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM;  $n = 3-4$  para los controles y  $n = 8$  para los entrenados en A) y  $n = 11-12$  para cada grupo en B).

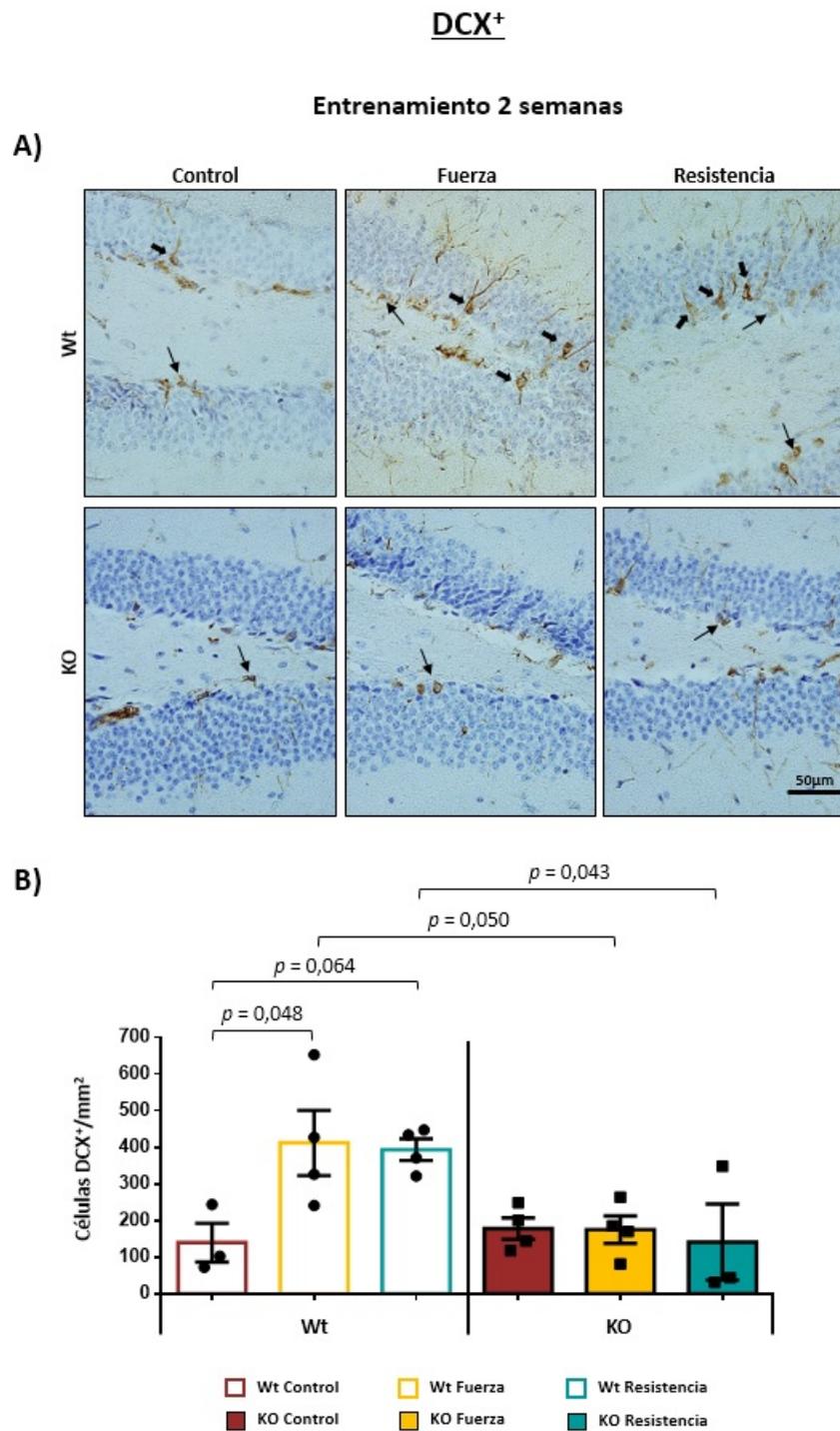
#### 4.1.2. La autofagia es necesaria para que el ejercicio induzca la neurogénesis

En el proceso neurogénico los progenitores neuronales expresan diferentes proteínas, dependiendo del estadio de maduración en el que se encuentran. Tras las primeras etapas de proliferación, dichos progenitores (células tipo-2, -3 y -4) comienzan a diferenciarse y a expresar el marcador DCX (Kempermann et al., 2004; von Bohlen Und Halbach, 2011).

Después de la intervención de 2 semanas, los ratones Wt-2F presentaron mayor número de células DCX<sup>+</sup> que los Wt-2C ( $412,02 \pm 88,95$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $139,82 \pm 52,81$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,048$ ), al igual que los Wt-2R ( $393,71 \pm 29,30$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $139,82 \pm 52,81$  células/mm<sup>2</sup>), alcanzando casi la significación ( $p = 0,064$ ). Sin embargo, los animales *atg4b*<sup>-/-</sup> no mostraron diferencias entre los diferentes grupos de entrenamiento (Figura 32, B). A su vez, aunque no se realizó una cuantificación específica del número de neuritas, se detectó que los animales Wt-2F y Wt-2R presentaban células con mayor número de ramificaciones en comparación con los controles del mismo genotipo, o con cualquiera de los grupos de los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> (Figura 32, A).

Al comparar los dos genotipos, se observa que los Wt-2C y los KO-2C tenían el mismo número de células DCX<sup>+</sup>, mientras que tanto los Wt-2F presentaron mayor número de células positivas para DCX con respecto a los KO-2F ( $412,02 \pm 88,95$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $175,43 \pm 37,40$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,050$ ), así como los Wt-2R frente a los KO-2R ( $393,71 \pm 29,30$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $141,47 \pm 103,63$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,043$ ) (Figuras 32, A y B).

A la vista de estos datos, los entrenamientos de fuerza y de resistencia, durante 2 semanas, favorecen la maduración de los precursores neurales en el DG del hipocampo, y la autofagia es necesaria para que ambos entrenamientos ejerzan este efecto.

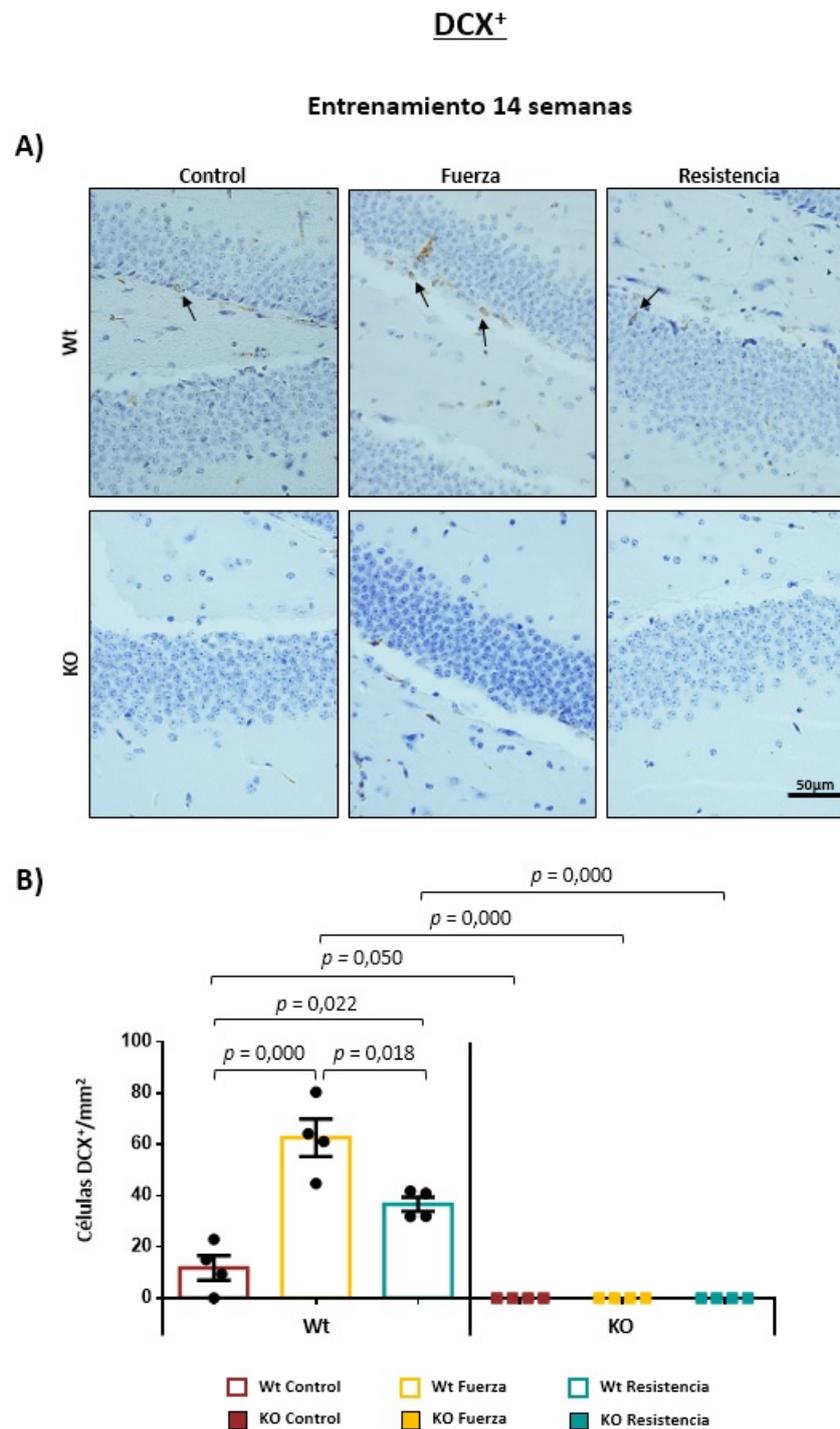


**Figura 32. Células positivas para DCX de los ratones Wt y KO entrenados durante 2 semanas. A)** Imágenes representativas del marcaje con DCX (flechas). **B)** Cuantificación de células positivas para DCX. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM;  $n = 3-4$  para cada grupo.

## Resultados

En la intervención de 14 semanas, los ratones Wt-14F presentaron el mayor número de células DCX<sup>+</sup> al compararlos con los Wt-14C ( $62,63 \pm 7,31$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $11,83 \pm 4,83$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,000$ ) y los Wt-14R ( $62,63 \pm 7,31$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $36,64 \pm 2,74$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,018$ ). No obstante, el entrenamiento de resistencia también produjo que los Wt-14R mostraran más células positivas para DCX que los Wt-14C ( $36,64 \pm 2,74$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $11,83 \pm 4,83$  células/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,022$ ) (Figura 33, A), aunque, a diferencia de lo observado en la intervención de 2 semanas, los progenitores neuronales no mostraron un número de neuritas destacable en los animales entrenados (Figura 33, B). Cabe destacar que, al analizar el genotipo *atg4b*<sup>-/-</sup>, ninguno de los ratones presentó células DCX<sup>+</sup>.

Analizando estos datos en conjunto, tanto el entrenamiento de fuerza como el de resistencia durante 14 semanas favorecen la neurogénesis en el DG del hipocampo, siendo más eficaz el primero de ellos. En cambio, el déficit parcial de autofagia influye negativamente sobre el proceso neurogénico, afectando a la diferenciación y maduración de los progenitores neuronales.



**Figura 33. Células positivas para DCX de los ratones Wt y KO entrenados durante 14 semanas. A)** Imágenes representativas del marcaje con DCX (flechas). **B)** Cuantificación de células positivas para DCX. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM;  $n = 4$  para cada grupo.

## 4.2. Niveles de CSP $\alpha$ y $\alpha$ -sinucleína

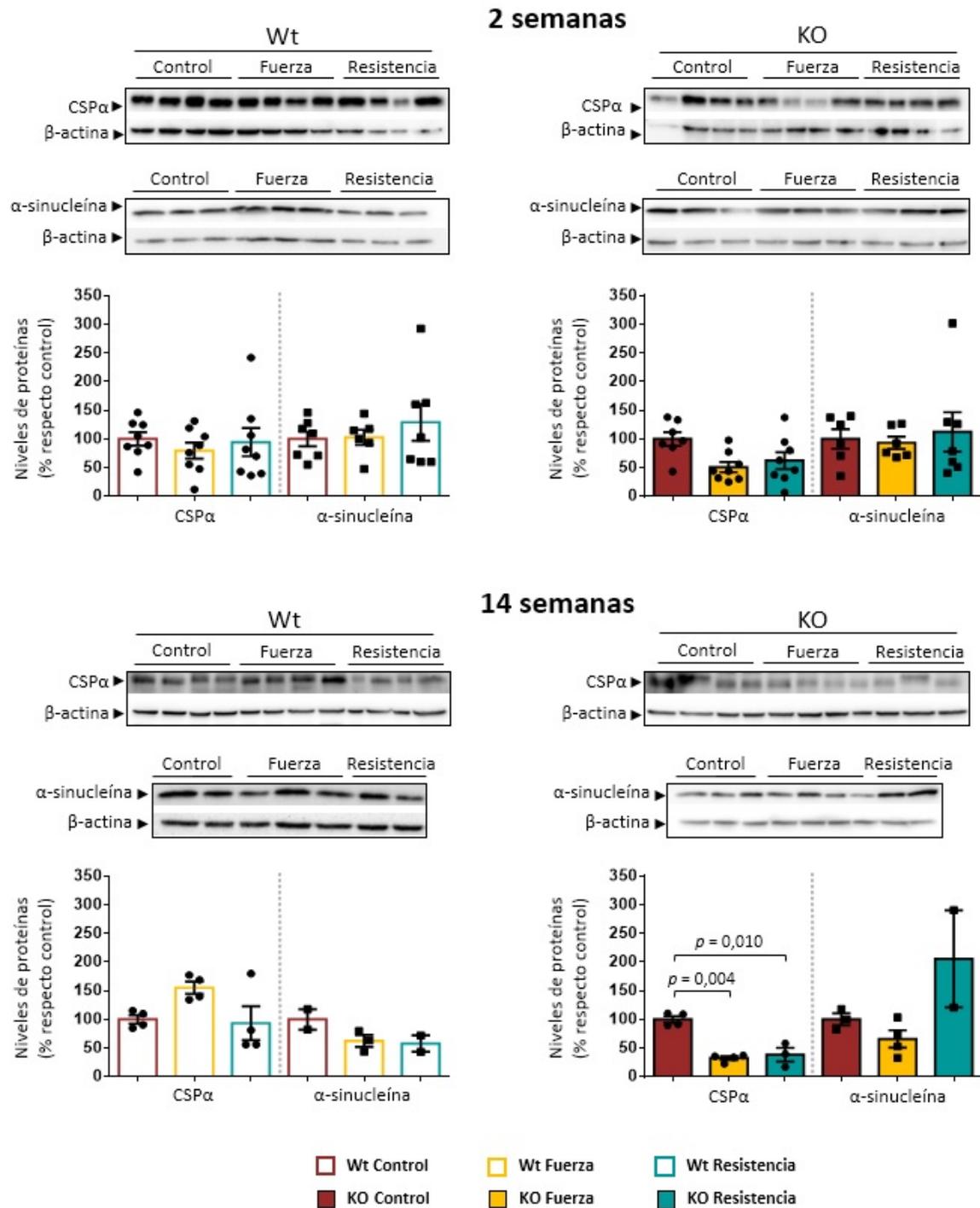
La autofagia es un proceso importante en la función sináptica, ya que elimina proteínas defectuosas que podrían acumularse y causar daños en la región presináptica de las neuronas (Vijayan y Verstreken, 2017). Para que se lleve a cabo la sinapsis es necesaria la presencia de diversas proteínas, entre las que se encuentran las chaperonas CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína, implicadas en la protección de los terminales nerviosos (Chandra et al., 2005; Burré et al., 2010; Sharma et al., 2010; Südhof y Rizo, 2011). Como vimos que la neurogénesis de los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> se encontraba comprometida, decidimos analizar los niveles de las chaperonas CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína para determinar si la autofagia también influye sobre los niveles de estas proteínas, así como estudiar el efecto del ejercicio de fuerza y resistencia sobre ellas. Para ello se examinaron, mediante WB, los niveles de CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína en el hipocampo y en tres regiones encefálicas implicadas en el movimiento (corteza, estriado y cerebelo), de los ratones Wt y *atg4b*<sup>-/-</sup> entrenados durante 2 y 14 semanas.

### 4.2.1. El ejercicio durante 14 semanas disminuye los niveles de CSP $\alpha$ en el hipocampo de los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup>

Los ratones de ambos genotipos, que habían realizado la intervención de 2 semanas, no presentaron cambios significativos en los niveles de CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína en el **hipocampo** (Figura 34). Así mismo, tras la intervención de 14 semanas, los Wt mostraron resultados similares, mientras que los KO-14F y KO-14R presentaron menores valores de CSP $\alpha$  que los KO-14C (68 % más bajos,  $p = 0,004$ ; 62 % menores,  $p = 0,010$ ). En el caso de  $\alpha$ -sinucleína, no se vieron diferencias significativas.

Por consiguiente, el ejercicio no influye sobre los niveles de CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína en el hipocampo de los ratones Wt. Sin embargo, en los animales con déficit parcial de autofagia, produce una disminución de los niveles de CSP $\alpha$  tras 14 semanas de entrenamiento, independientemente del tipo de ejercicio.

## Hipocampo



**Figura 34.** Niveles de CSPα y α-sinucleína en el hipocampo de ratones Wt y KO entrenados durante 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media ± SEM; n = 7-8 en cada grupo para CSPα y n = 6-7 en cada grupo para α-sinucleína en la intervención de 2 semanas; n = 3-4 en cada grupo para CSPα y n = 2-4 en cada grupo para α-sinucleína.

#### 4.2.2. El ejercicio induce cambios diferentes en los niveles de CSP $\alpha$ en el estriado y el cerebelo de los ratones con déficit parcial de autofagia

Tras estudiar los niveles de CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína en el hipocampo, quisimos analizar los niveles de ambas chaperonas en tres regiones encefálicas relacionadas con el movimiento. En la **corteza cerebral** de los ratones Wt y *atg4b*<sup>-/-</sup>, pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas, no se observaron diferencias significativas entre los animales entrenados y los controles (Figura 35).

Los niveles de CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína en el **estriado** de los ratones Wt y *atg4b*<sup>-/-</sup> de la intervención de 2 semanas también fueron iguales entre los grupos de entrenamiento y los controles (Figura 36), y lo mismo se observó en los Wt pertenecientes a la intervención de 14 semanas. En cambio, en el genotipo *atg4b*<sup>-/-</sup>, los niveles de CSP $\alpha$  fueron mayores en los KO-14R en comparación con los KO-14C (128 % más;  $p = 0,010$ ) y los KO-14F (144 % más;  $p = 0,002$ ). Sin embargo, en estos animales los niveles de  $\alpha$ -sinucleína no mostraron diferencias significativas entre los grupos de entrenamiento.

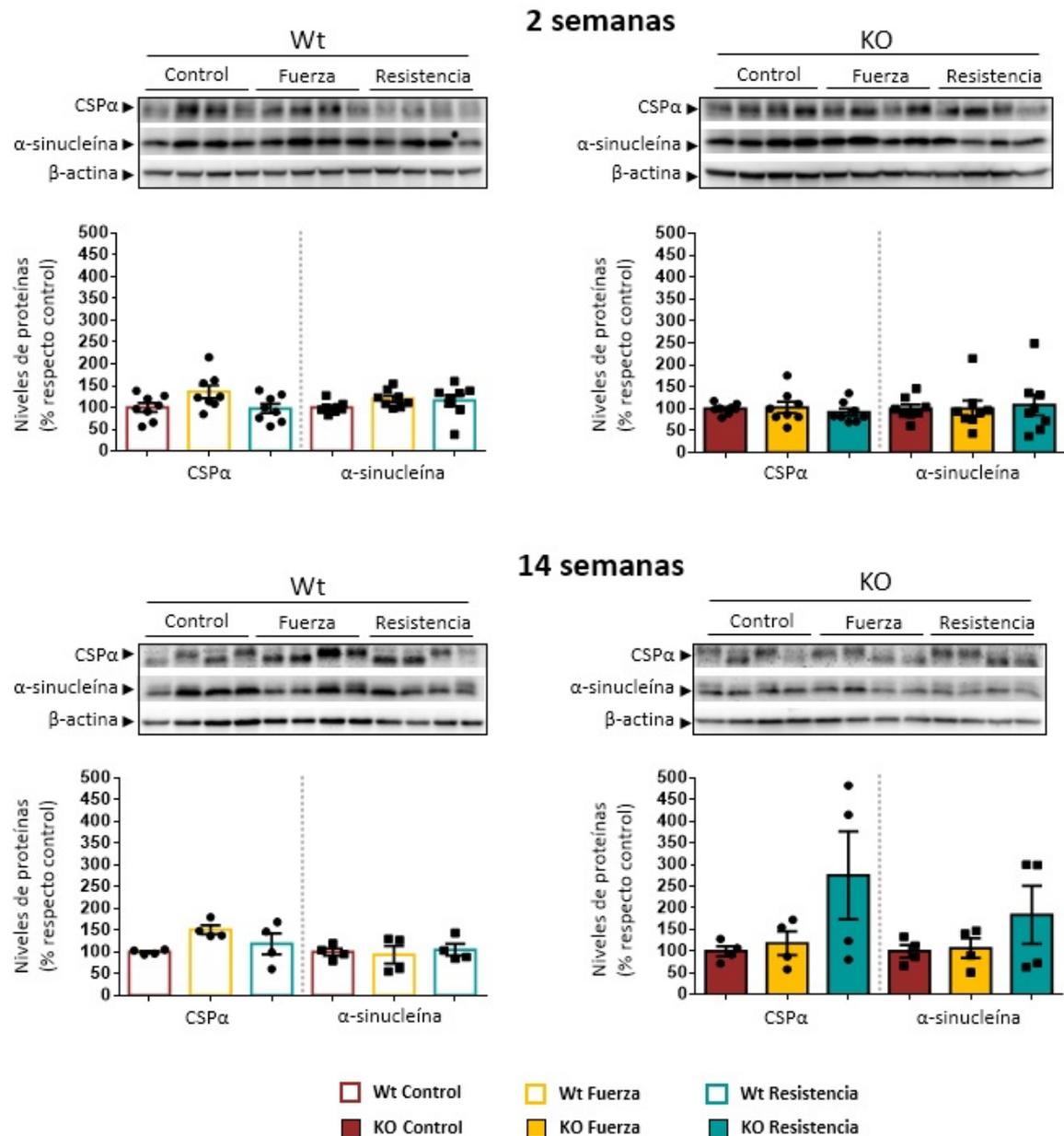
Con respecto al **cerebelo**, los niveles de CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína en los ratones Wt entrenados durante 2 semanas no mostraron diferencias significativas (Figura 37). Sin embargo, en el genotipo *atg4b*<sup>-/-</sup>, los valores de CSP $\alpha$  fueron menores en los KO-2F y KO-2R con respecto a los KO-2C (63 % más bajos,  $p = 0,042$ ; 58 % menores,  $p = 0,078$ , respectivamente); aunque en el caso de los KO-2R no llegaron a alcanzar la significación.

Cabe destacar que, tras la intervención de 14 semanas, los Wt-14R presentaron los niveles de CSP $\alpha$  un 77 % mayores que los Wt-14C ( $p = 0,035$ ), mientras que no se observaron diferencias entre los Wt-14F y los Wt-14C. Por otro lado, en el caso de los *atg4b*<sup>-/-</sup>, los resultados fueron similares a los observados en la intervención de corta duración, los KO-14F y KO-14R mostraron valores de CSP $\alpha$  menores que los KO-14C (61 % más bajos,  $p = 0,004$ ; 53 % menores,  $p = 0,018$ , respectivamente). En esta región encefálica tampoco se detectaron cambios en los niveles de  $\alpha$ -sinucleína.

Por lo tanto, ante el déficit de autofagia, solo los animales entrenados en resistencia durante 14 semanas presentan mayores niveles de CSP $\alpha$  en el estriado, mientras que en el

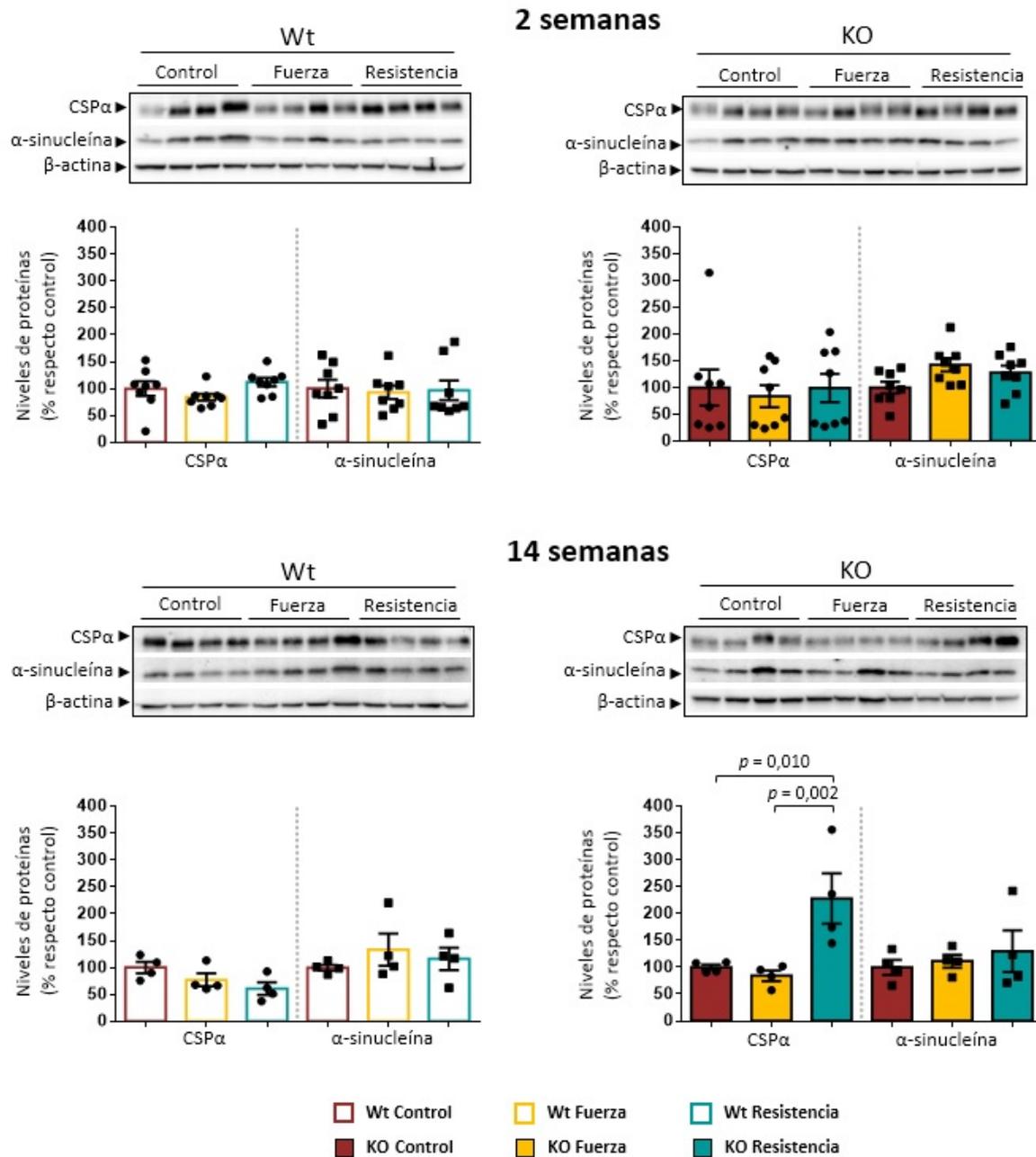
cerebelo el ejercicio los disminuye, independientemente del tipo y de la duración del entrenamiento.

### Corteza cerebral

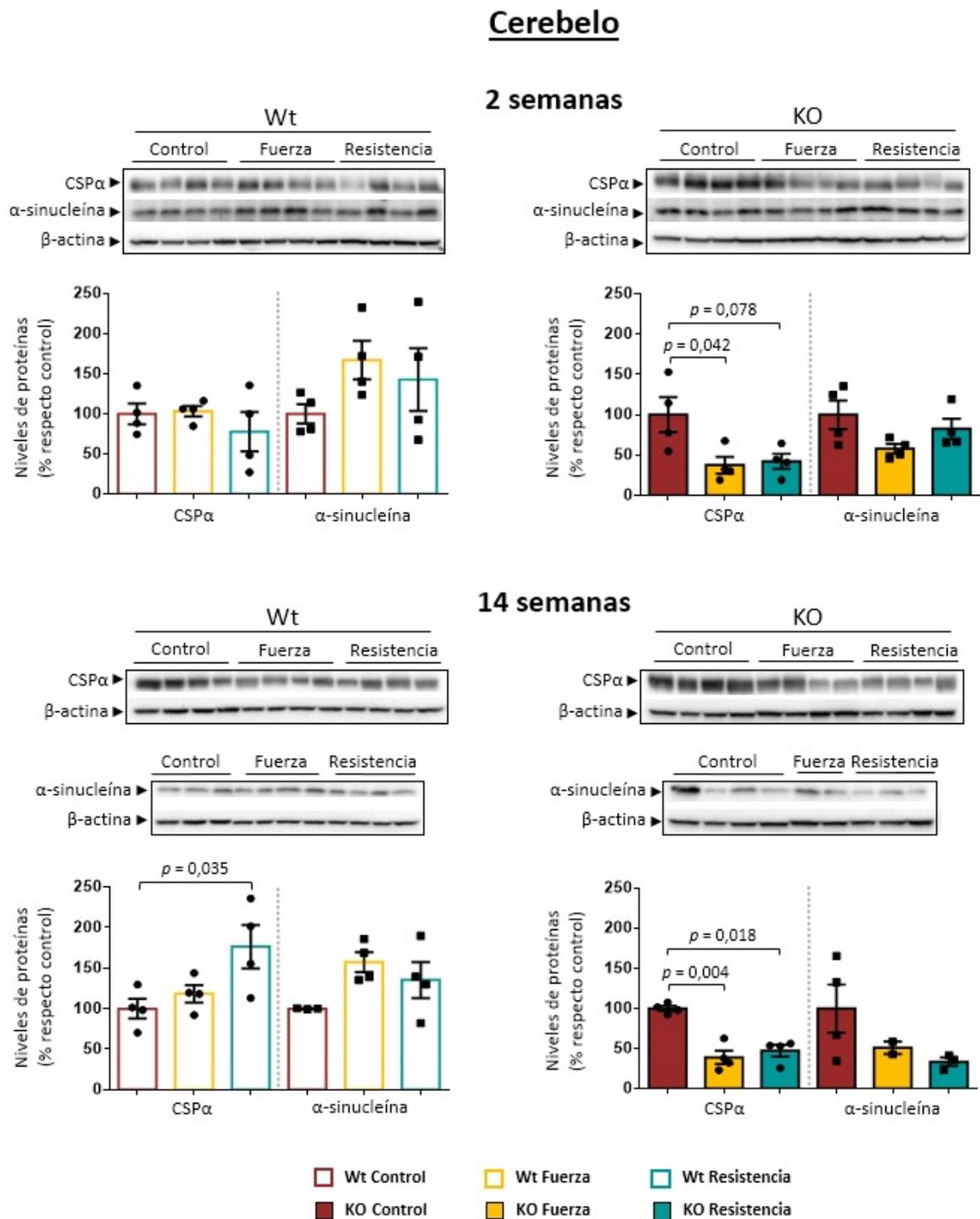


**Figura 35. Niveles de CSPα y α-sinucleína en la corteza cerebral de ratones Wt y KO entrenados durante 2 y 14 semanas.** Los datos se representan como media ± SEM; n = 8 para todos los grupos en la intervención de 2 semanas y n = 4 en cada grupo en la intervención de 14 semanas.

## Estriado



**Figura 36.** Niveles de CSPα y α-sinucleína en el estriado de ratones Wt y KO entrenados durante 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media ± SEM; n = 8 para todos los grupos en la intervención de 2 semanas; n = 4 en cada grupo en la intervención de 14 semanas.



**Figura 37.** Niveles de CSP $\alpha$  y  $\alpha$ -sinucleína en el cerebelo de ratones Wt y KO entrenados durante 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; n = 4 en cada grupo de la intervención de 2 semanas; n = 4 en cada grupo para CSP $\alpha$  y n = 2-4 en cada grupo para  $\alpha$ -sinucleína en la intervención de 14 semanas.

## 5. Análisis de los niveles de proteínas involucradas en autofagia

Estudios previos han demostrado que el ejercicio de resistencia induce la autofagia en el encéfalo (He et al., 2012b; Bayod, et al., 2014). Sin embargo, no se conoce el efecto del ejercicio de fuerza, por lo que decidimos estudiar el nivel de algunas proteínas autofágicas en el hipocampo y en las tres regiones encefálicas involucradas en el movimiento de los ratones Wt y *atg4b*<sup>-/-</sup> que realizaron las intervenciones de 2 y 14 semanas.

### 5.1. Niveles de las proteínas autofágicas LC3-I, LC3-II, p62 y ubiquitina

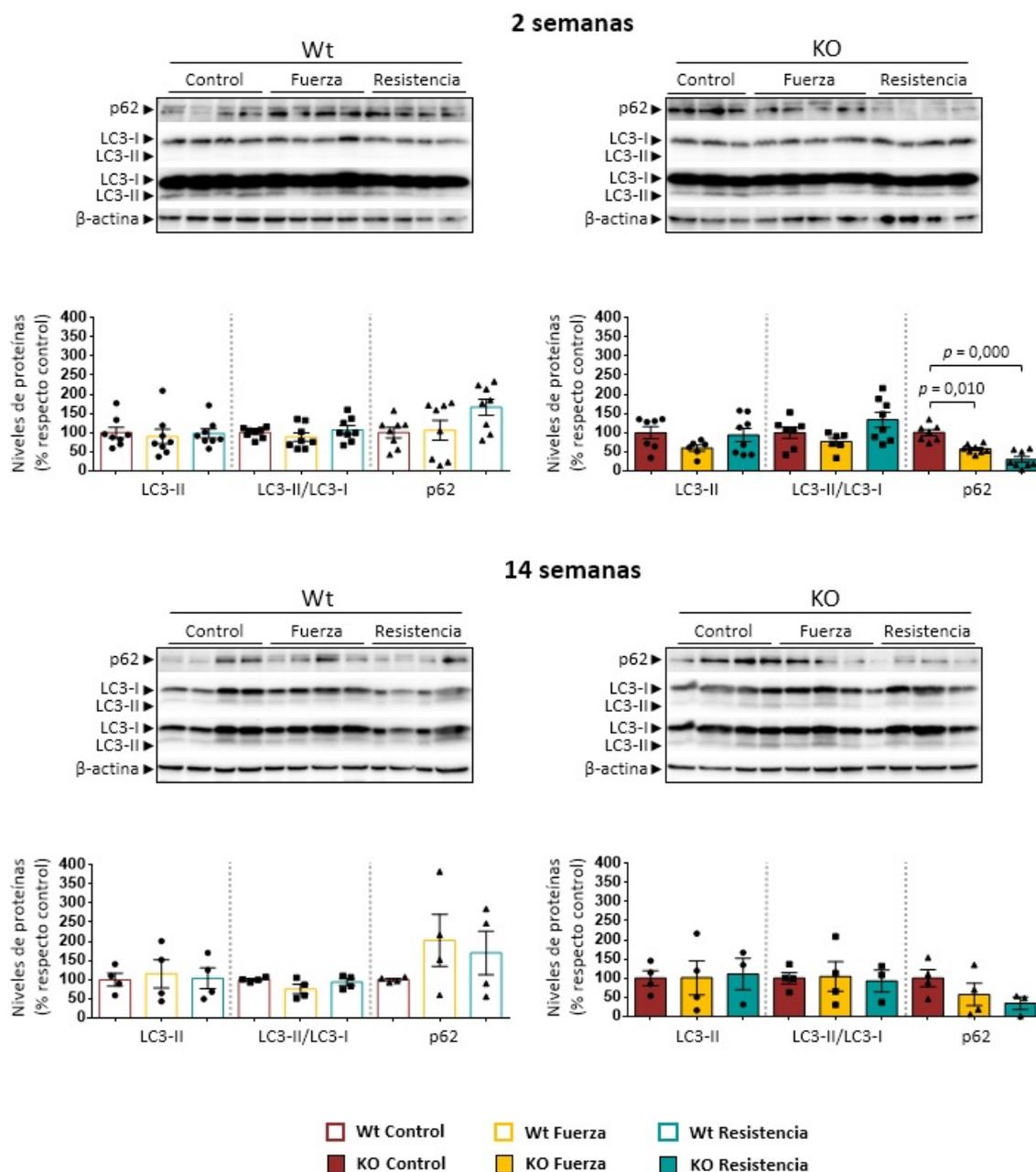
Se realizaron análisis de los niveles de las proteínas LC3-I, LC3-II y p62 involucradas en la vía autofágica, mediante WB. A su vez, también se analizaron los niveles de ubiquitina en la corteza cerebral, el estriado y el cerebelo para evaluar si existía un correcto procesamiento proteico.

#### 5.1.1. El ejercicio no influye sobre los niveles de LC3 en el hipocampo

Al comparar los niveles de LC3 en el **hipocampo** de los ratones Wt y *atg4b*<sup>-/-</sup> entrenados durante 2 semanas, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de entrenamiento y los controles (Figura 38). Sin embargo, en el caso de p62, tanto los KO-2F como los KO-2R mostraron menores niveles que los KO-2C (43 % más bajos,  $p = 0,010$ ; 70 % menos,  $p = 0,000$ , respectivamente). Por otro lado, tras la intervención de 14 semanas, no se observaron diferencias entre los grupos de entrenamiento en ninguno de los dos genotipos.

Por lo tanto, el ejercicio no modifica las proteínas autofágicas en el hipocampo de los Wt, en ninguna de las intervenciones realizadas, mientras que en el caso de los *atg4b*<sup>-/-</sup> entrenados durante 2 semanas solo afecta a los niveles de p62 (Figura 38).

### Hipocampo



**Figura 38.** Niveles de LC3-II, LC3-II/LC3-I y p62 en el hipocampo de ratones Wt y KO pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media ± SEM; n = 8 en cada grupo en la intervención de 2 semanas y n = 4 en la intervención de 14 semanas.

### 5.1.2. El entrenamiento de resistencia, pero no el de fuerza, modifica los niveles de LC3-II/LC3-I en la corteza cerebral de los ratones con déficit parcial de autofagia

Después de estudiar los niveles de estas proteínas autofágicas en el hipocampo, se analizaron también en las regiones cerebrales relacionadas con el movimiento.

En la **corteza cerebral** de los Wt, tras la intervención de 2 semanas, no se observaron diferencias en los niveles de LC3. Mientras que, con respecto a p62, los ratones Wt-2R presentaron menores valores que los Wt-2C y los Wt-2F (39 % más bajos,  $p = 0,004$ ; 37 % menores,  $p = 0,010$ , respectivamente) (Figura 39). Así mismo, no se detectaron diferencias en los niveles de ubiquitina entre los grupos de entrenamiento. Por otro lado, en el genotipo *atg4b*<sup>-/-</sup>, los KO-2R mostraron niveles de LC3-II/LC3-I un 82 % mayores que los de los KO-2C ( $p = 0,033$ ), mientras que p62 y ubiquitina no presentaron diferencias en los grupos de entrenamiento con respecto al grupo control.

Al analizar el efecto del ejercicio sobre la autofagia en los animales pertenecientes a la intervención de 14 semanas, solo se detectaron cambios en los niveles de LC3 de los ratones Wt. Los Wt-14R presentaron mayores niveles de LC3-II que los Wt-14C (un 74 % más altos;  $p = 0,037$ ) y, al considerar el cociente LC3-II/LC3-I, tanto los Wt-14R como los Wt-14F mostraron niveles más altos con respecto a los Wt-14C (35 % mayores,  $p = 0,024$ ; 30 % más;  $p = 0,040$ , respectivamente).

En el **estriado**, la intervención de 2 semanas no produjo cambios en los niveles de las proteínas autofágicas estudiadas entre los diferentes grupos de entrenamiento (Figura 40).

Por el contrario, aunque la intervención de 14 semanas tampoco afectó a los niveles de LC3 y de ubiquitina, sí que produjo cambios en los de p62. En concreto, los Wt-14F y los Wt-14R presentaron unos niveles mayores de p62 que los Wt-14C (83 % más altos,  $p = 0,022$ ; 138 % mayores,  $p = 0,003$ , respectivamente).

Por otro lado, en el **cerebelo**, los ratones entrenados durante 2 semanas tampoco mostraron diferencias en los niveles de LC3 en comparación con los controles. Sin

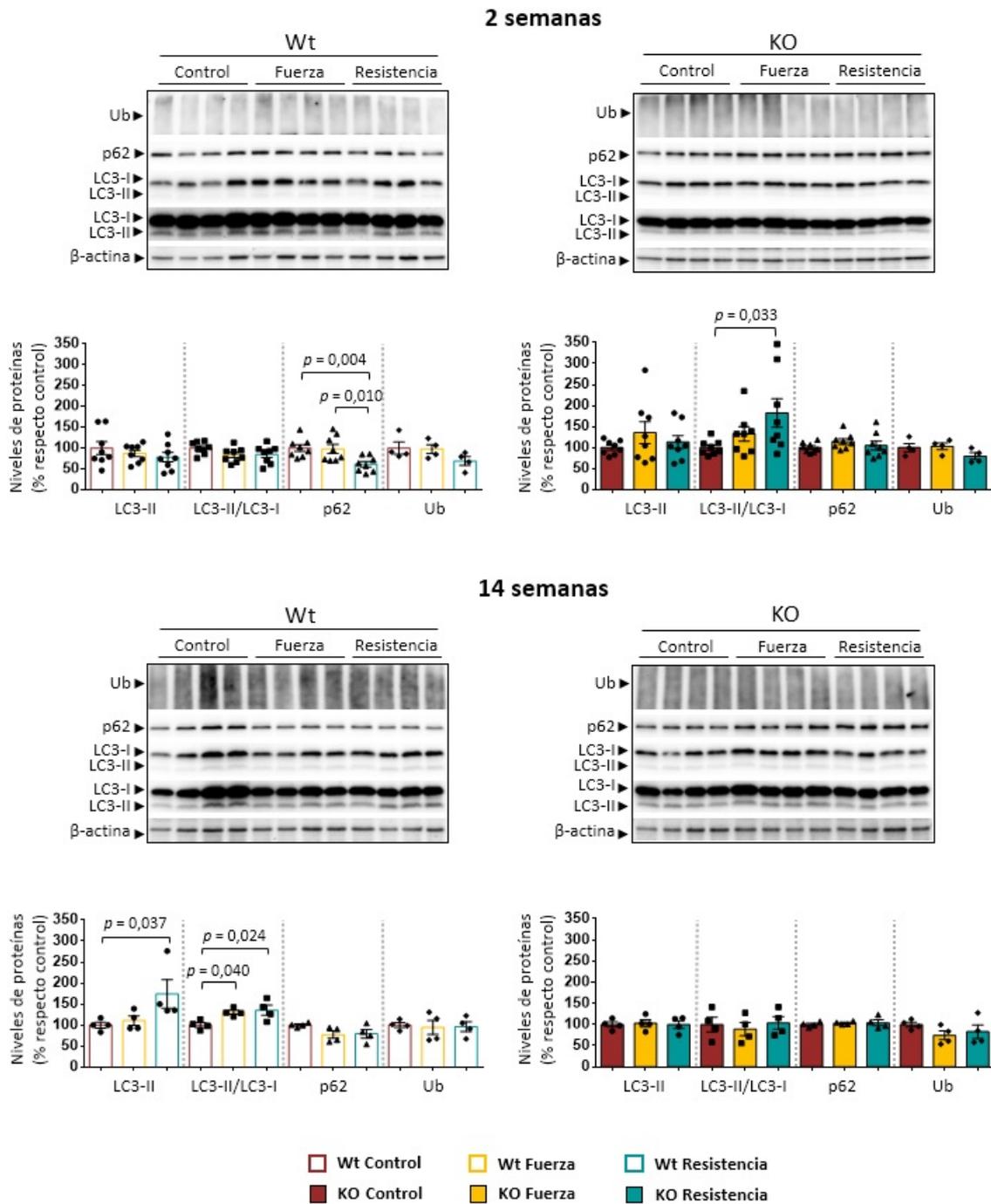
embargo, los niveles de p62 fueron un 58 % mayores en los Wt-2R con respecto a los Wt-2C, casi alcanzando la significación ( $p = 0,058$ ), y los Wt-2F presentaron unos niveles de ubiquitina un 17 % mayores que los Wt-2C ( $p = 0,042$ ) (Figura 41). En el genotipo *atg4b*<sup>-/-</sup> el ejercicio no influyó sobre los niveles de ninguna de estas proteínas autofágicas, ni tampoco se observaron diferencias significativas tras la intervención de 14 semanas en ninguno de los dos genotipos.

Tomando estos datos en conjunto, ambas intervenciones de ejercicio afectan a los niveles de LC3 en la corteza cerebral. Por el contrario, la respuesta es diferente en los dos genotipos estudiados ya que, mientras en los animales Wt se produce tras el entrenamiento de larga duración, independientemente del tipo de ejercicio, en los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> la respuesta se produce solo en la intervención a corto plazo, y solo tras el entrenamiento de resistencia.

Una vez analizados los niveles de autofagia, y debido a que, tras las intervenciones, solo se habían detectado cambios en los niveles de LC3 en la corteza cerebral, se quiso estudiar las posibles correlaciones entre los niveles de LC3-II/LC3-I en la corteza cerebral y el resto de las regiones encefálicas, para comprobar posibles similitudes entre ellas. No se observó correlación entre el hipocampo y la corteza cerebral en ninguno de los casos (Figura 42). Sin embargo, los ratones Wt-2R mostraron una relación positiva en el cociente LC3-II/LC3-I entre el estriado y el cerebelo con respecto a la corteza cerebral (Figuras 43 y 44).

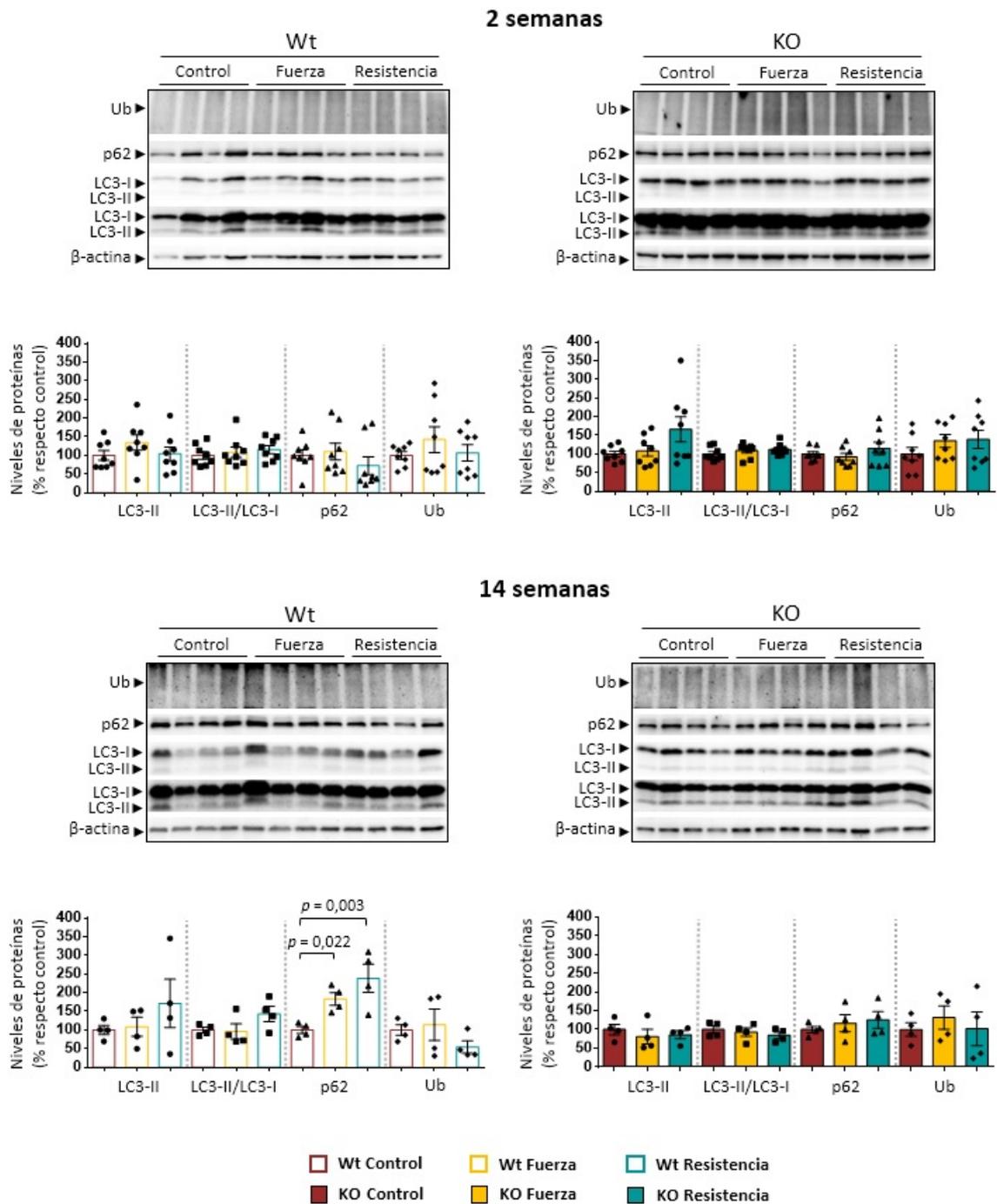
A la vista de estos resultados, los ratones Wt entrenados durante 2 semanas, que tienen incrementados los niveles de LC3-II/LC3-I en corteza cerebral, también los tienen en estriado y cerebelo. Sin embargo, tras la intervención de 14 semanas, no se encontró esta relación.

**Corteza cerebral**



**Figura 39.** Niveles de LC3-II, LC3-II/LC3-I, p62 y ubiquitina (Ub) en la corteza cerebral de ratones Wt y KO pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; n = 8 en cada grupo en la intervención de 2 semanas y n = 4 en la intervención de 14 semanas.

## Estriado



**Figura 40.** Niveles de LC3-II, LC3-II/LC3-I, p62 y ubiquitina (Ub) en el estriado de ratones Wt y KO pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; n = 8 en cada grupo en la intervención de 2 semanas y n = 4 en la intervención de 14 semanas.

## Cerebelo

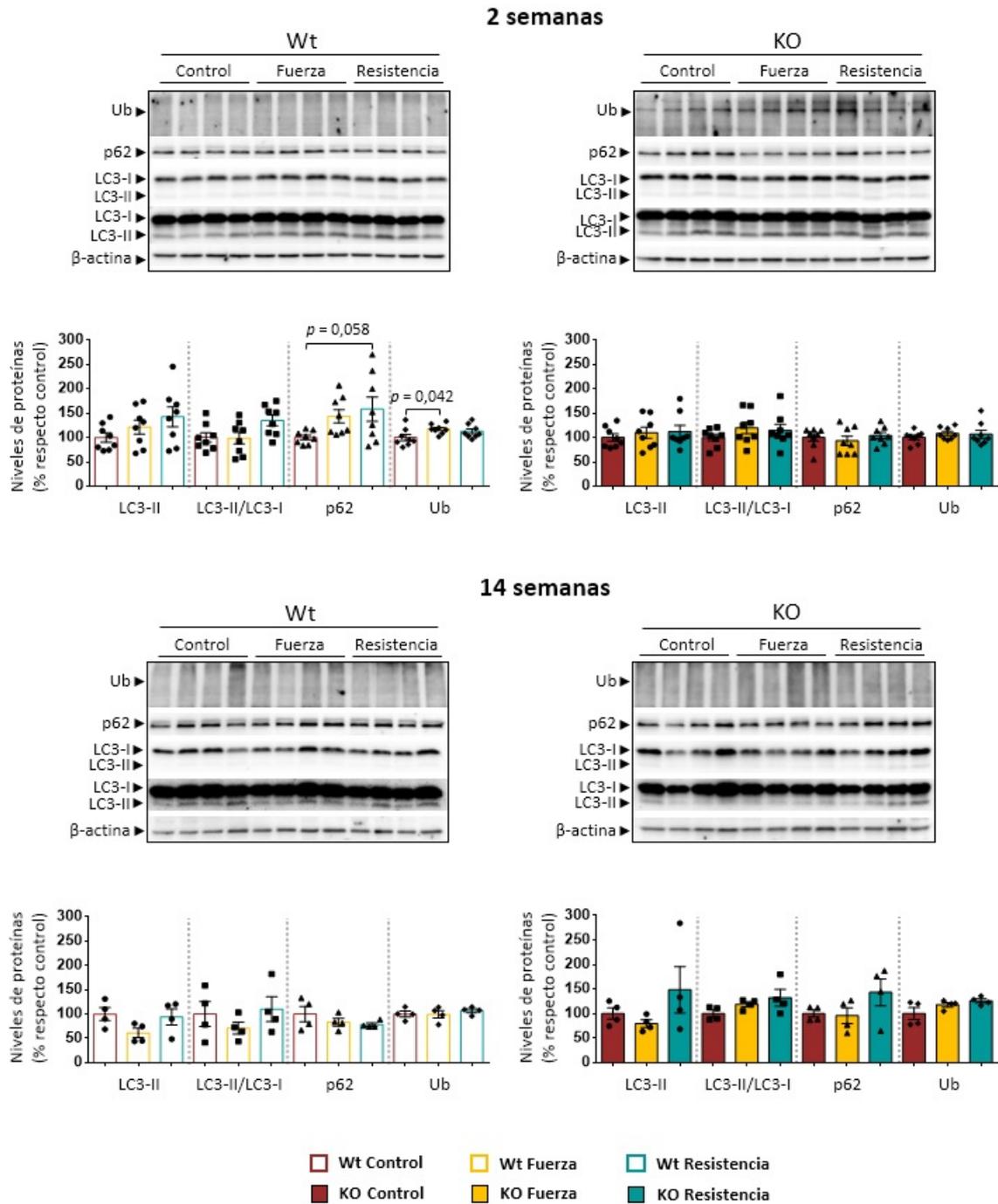
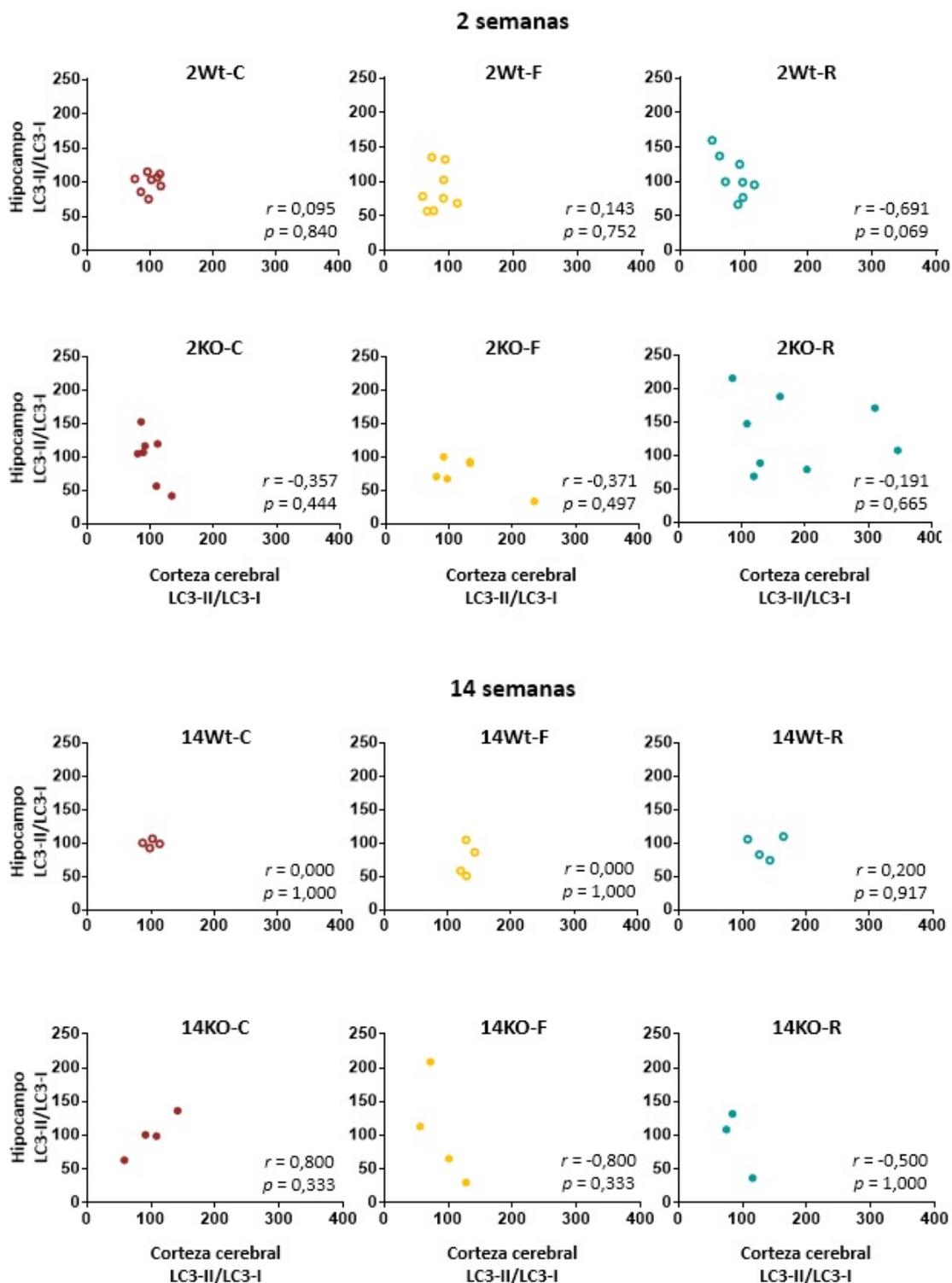


Figura 41. Niveles de LC3-II, LC3-II/LC3-I, p62 y ubiquitina (Ub) en el cerebelo de ratones Wt y KO pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; n = 8 en cada grupo en la intervención de 2 semanas y n = 4 en la intervención de 14 semanas.

**Hipocampo - Corteza cerebral**

**Figura 42. Correlación de los niveles de LC3-II/LC3-I entre la corteza y el hipocampo de ratones Wt y KO pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media; n = 8 en cada grupo en la intervención de 2 semanas y n = 3-4 en la intervención de 14 semanas.**

### Estriado - Corteza cerebral

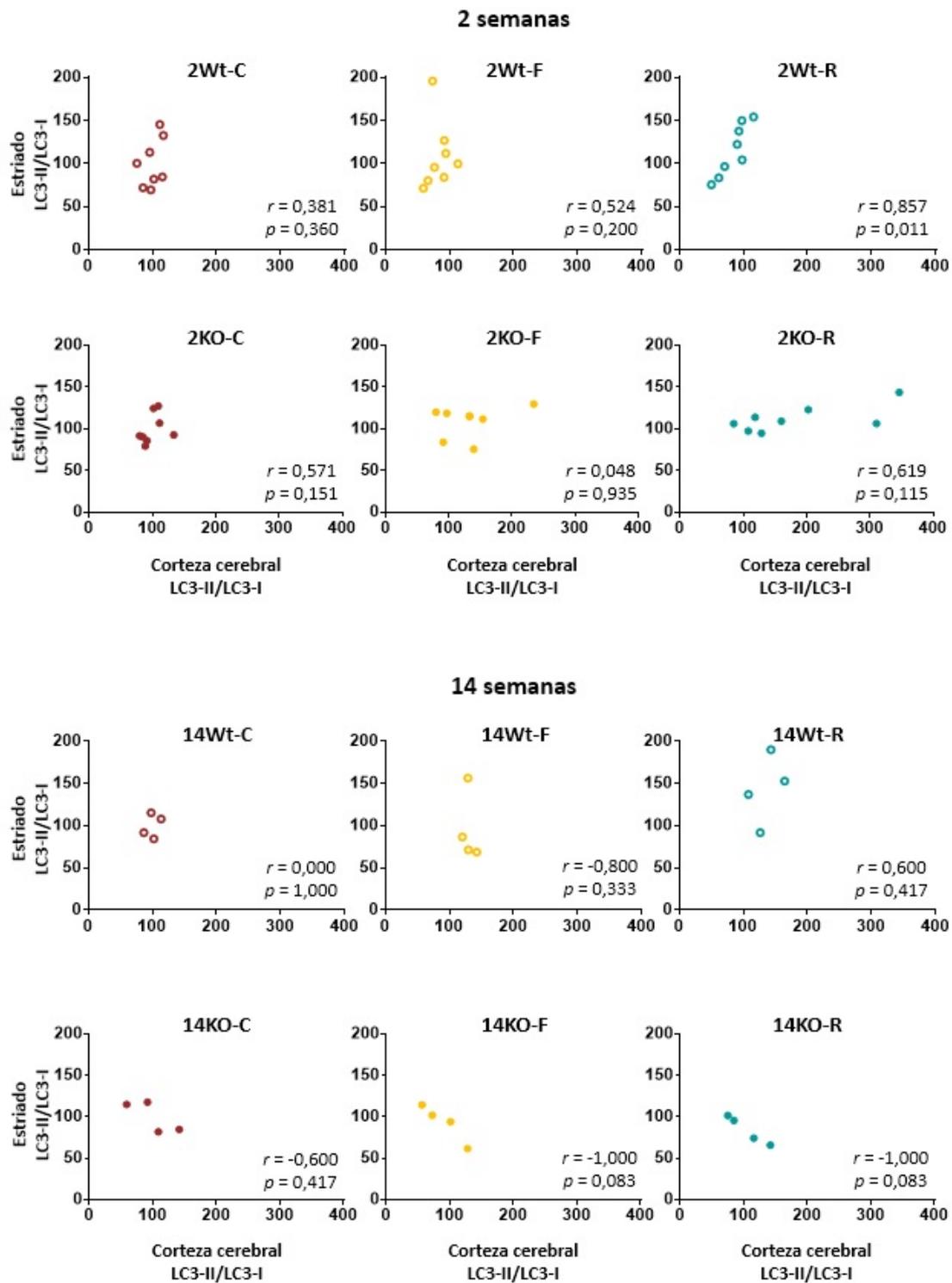
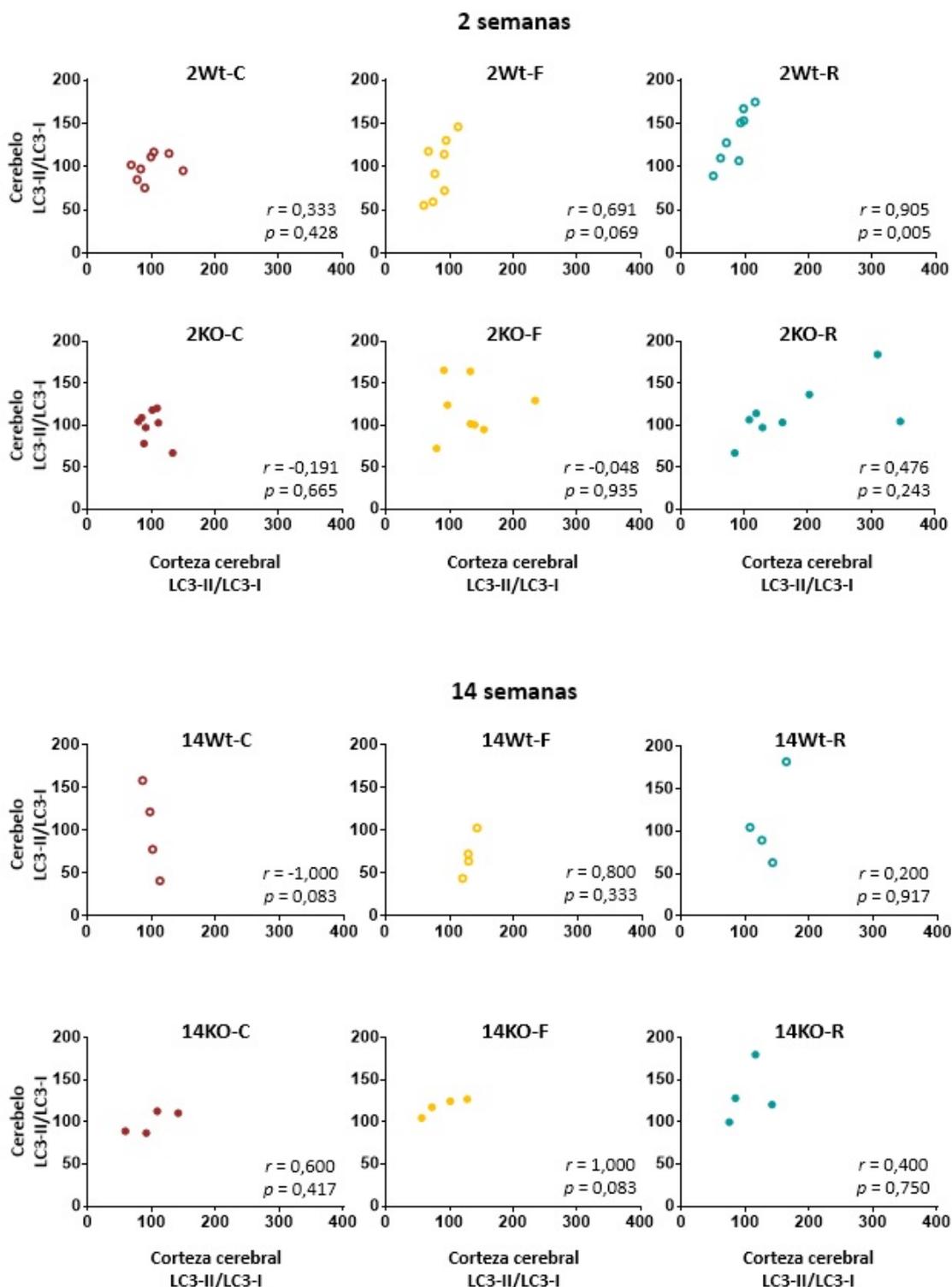


Figura 43. Correlación de los niveles de LC3-II/LC3-I entre la corteza y el estriado de ratones Wt y KO pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media; n = 8 en cada grupo en la intervención de 2 semanas y n = 4 en la intervención de 14 semanas.

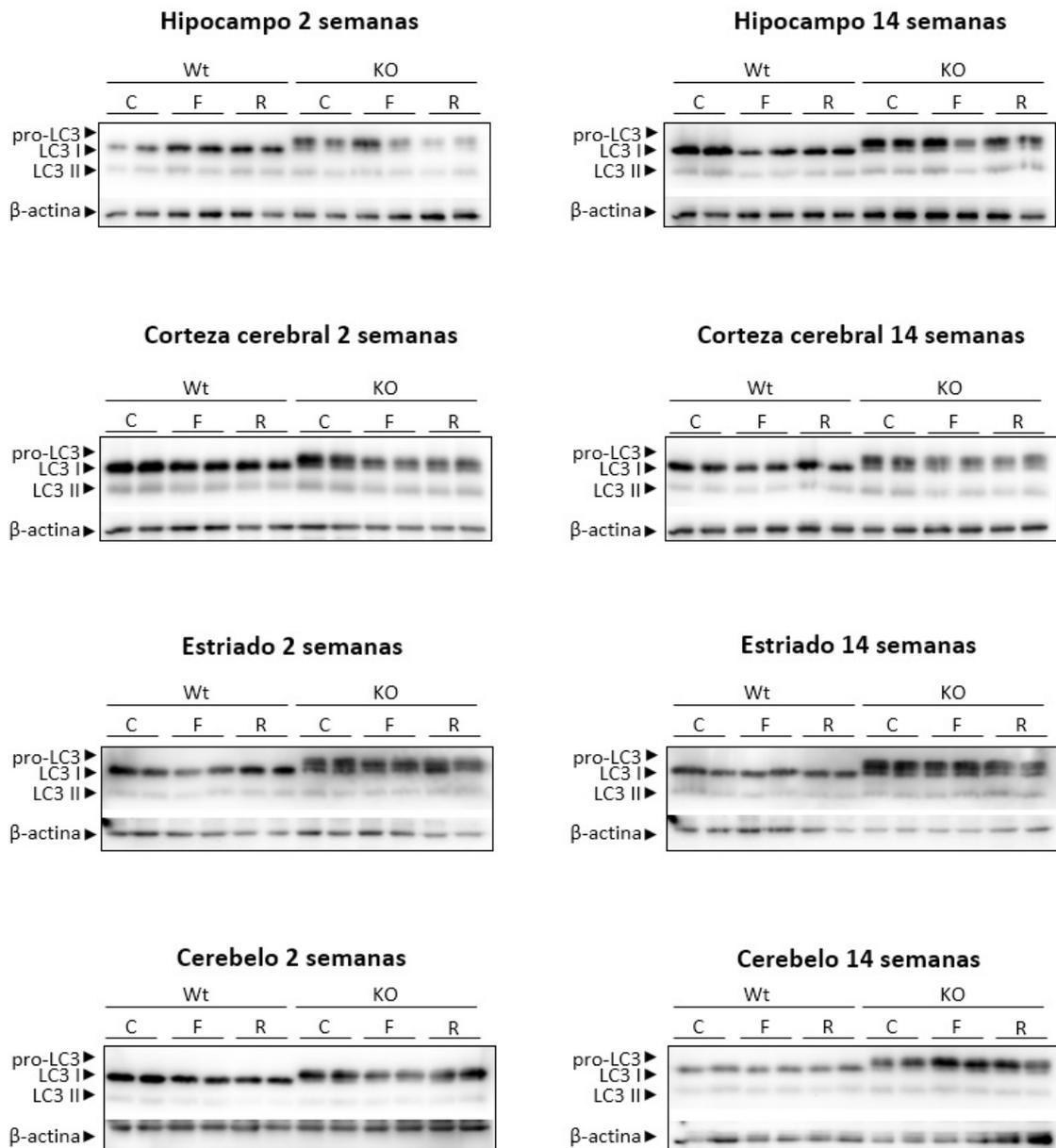
**Cerebelo - Corteza cerebral**

**Figura 44.** Correlación de los niveles de LC3-II/LC3-I entre la corteza y el cerebelo de ratones Wt y KO pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media; n = 8 en cada grupo en la intervención de 2 semanas y n = 4 en la intervención de 14 semanas.

### **5.1.3. El déficit de Atg4b produce acumulación de la isoforma pro-LC3 en todas las regiones encefálicas estudiadas, y el ejercicio no es capaz de favorecer su procesamiento**

Después de estudiar el nivel de LC3-I y LC3-II, nos pareció necesario analizar la isoforma pro-LC3 para determinar cómo afecta el déficit de Atg4b en el procesamiento de LC3 en diferentes regiones del encéfalo de estos ratones y si el ejercicio influye en dicho procesamiento. Para ello, se realizó una electroforesis con urea y tiourea de las muestras de las diferentes regiones del encéfalo, con el fin de separar las bandas pro-LC3 y LC3-I (Klionsky et al., 2016).

Al analizar las imágenes de los WB, se observó la isoforma pro-LC3 en todas las regiones encefálicas de todos los animales *atg4b*<sup>-/-</sup>, mientras que en ninguno de los Wt apareció la banda (Figura 45). Por lo que el déficit de la autofagina Atg4b produce la acumulación de pro-LC3 en todas las regiones encefálicas estudiadas, y el ejercicio no es capaz de favorecer su procesamiento.



**Figura 45.** *Western blot* representativos de pro-LC3, LC3-I, LC3-II y  $\beta$ -actina en el hipocampo, la corteza cerebral, el estriado y el cerebelo de los ratones Wt y KO controles (C), entrenados en fuerza (F) y entrenados en resistencia (R), durante 2 y 14 semanas.

## 5.2. El ejercicio de resistencia incrementa los niveles de AMPK en los ratones con déficit parcial de autofagia

Después de determinar que el ejercicio actúa de forma distinta en las diferentes áreas encefálicas estudiadas, analizamos los niveles de la proteína AMPK, ya que es una de las principales inductoras de la vía autofágica y también está asociada con el ejercicio de resistencia. Para ello, se realizaron WB de la corteza cerebral, del estriado y del cerebelo de los ratones Wt y *atg4b*<sup>-/-</sup> pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas. Para que AMPK esté activa debe estar fosforilada, por lo que, tras la densitometría, se calculó el cociente entre fosfo-AMPK y AMPK total.

Al comparar los niveles de AMPK en la **corteza cerebral** de los ratones Wt que entrenaron durante 2 semanas no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Por el contrario, en el genotipo *atg4b*<sup>-/-</sup> los animales entrenados tenían mayores niveles de esta proteína que los controles: los KO-2F presentaron un 58 % más que los KO-2C ( $p = 0,018$ ) y los KO-2R un 84 % mayores ( $p = 0,004$ ) (Figura 46). Sin embargo, después de la intervención de 14 semanas, ni los ratones Wt ni los *atg4b*<sup>-/-</sup> presentaron diferencias significativas en los niveles de AMPK entre los grupos de entrenamiento.

Por otro lado, en el **estriado**, el ejercicio durante 2 semanas no varió los niveles de AMPK de los ratones de ambos genotipos (Figura 47). Sin embargo, tras realizar el entrenamiento de resistencia durante 14 semanas, los KO-14R mostraron unos niveles un 115 % mayores de AMPK con respecto a los KO-14C ( $p = 0,002$ ) y un 13 % mayores que los KO-14F ( $p = 0,006$ ).

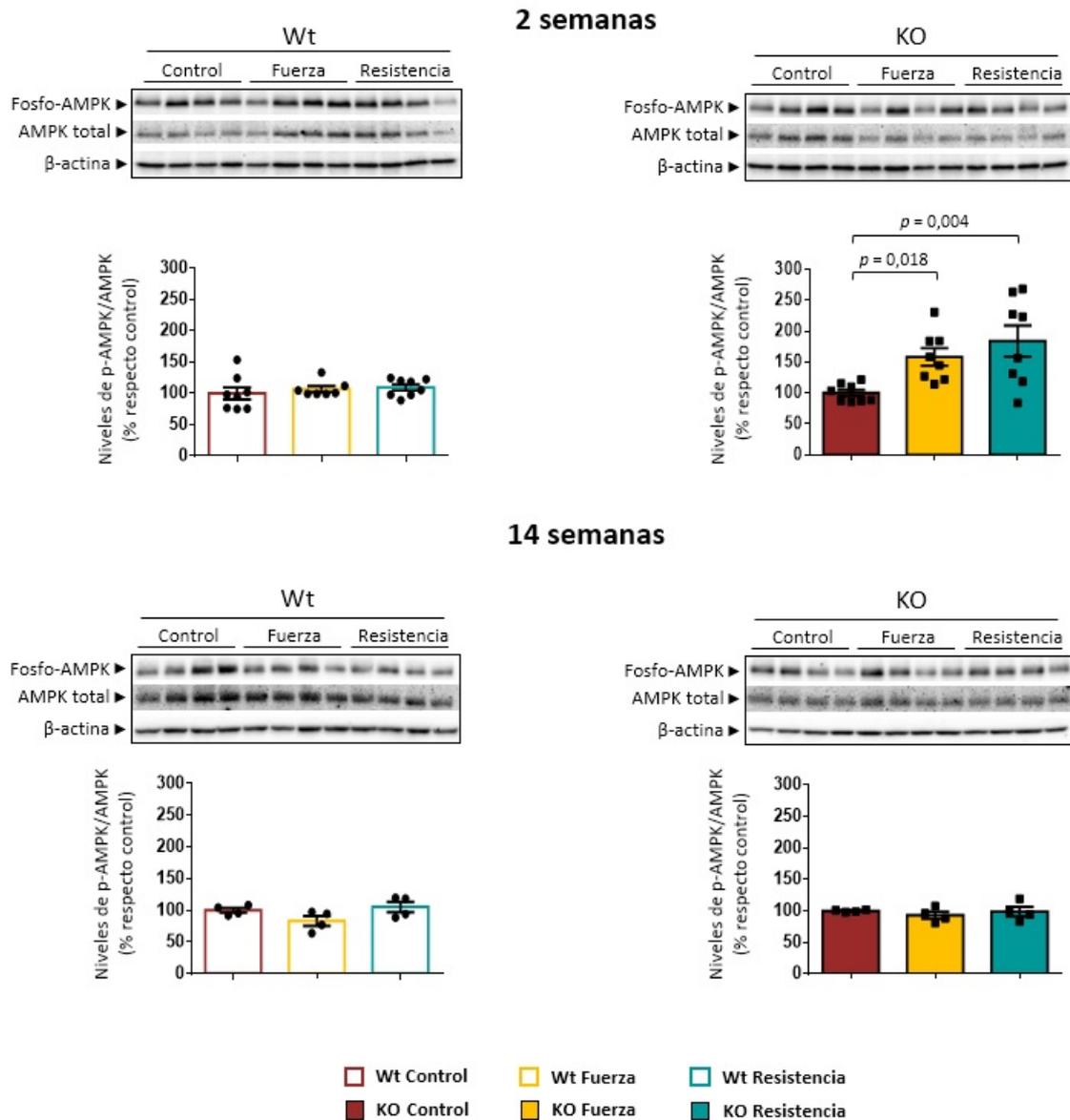
Por último, en el **cerebelo**, el ejercicio de resistencia indujo resultados diferentes en ambos genotipos (Figura 48). Tras la intervención de 2 semanas, los ratones Wt no presentaron diferencias significativas, mientras que los KO-2R mostraron los valores de AMPK un 15 % menores con respecto a los KO-2C ( $p = 0,033$ ). Después de la intervención de 14 semanas, los animales de ambos genotipos, que habían entrenado resistencia, presentaron mayores niveles de esta quinasa. En concreto, en el genotipo Wt, los niveles en los Wt-14R fueron mayores que los Wt-14C y que los Wt-14F (un 47 % más altos,  $p = 0,007$ ; un 58 % mayores,  $p = 0,001$ , respectivamente). Por otro lado,

en el genotipo *atg4b<sup>-/-</sup>*, los KO-14R presentaron más elevados los niveles de AMPK que los KO-14C y que los KO-14F (85 % más altos,  $p = 0,004$ ; 68 % mayores,  $p = 0,035$ , respectivamente).

Analizando estos datos en conjunto, se observa que las intervenciones de ejercicio aplicadas inducen principalmente cambios en los niveles de AMPK de los ratones *atg4b<sup>-/-</sup>*.

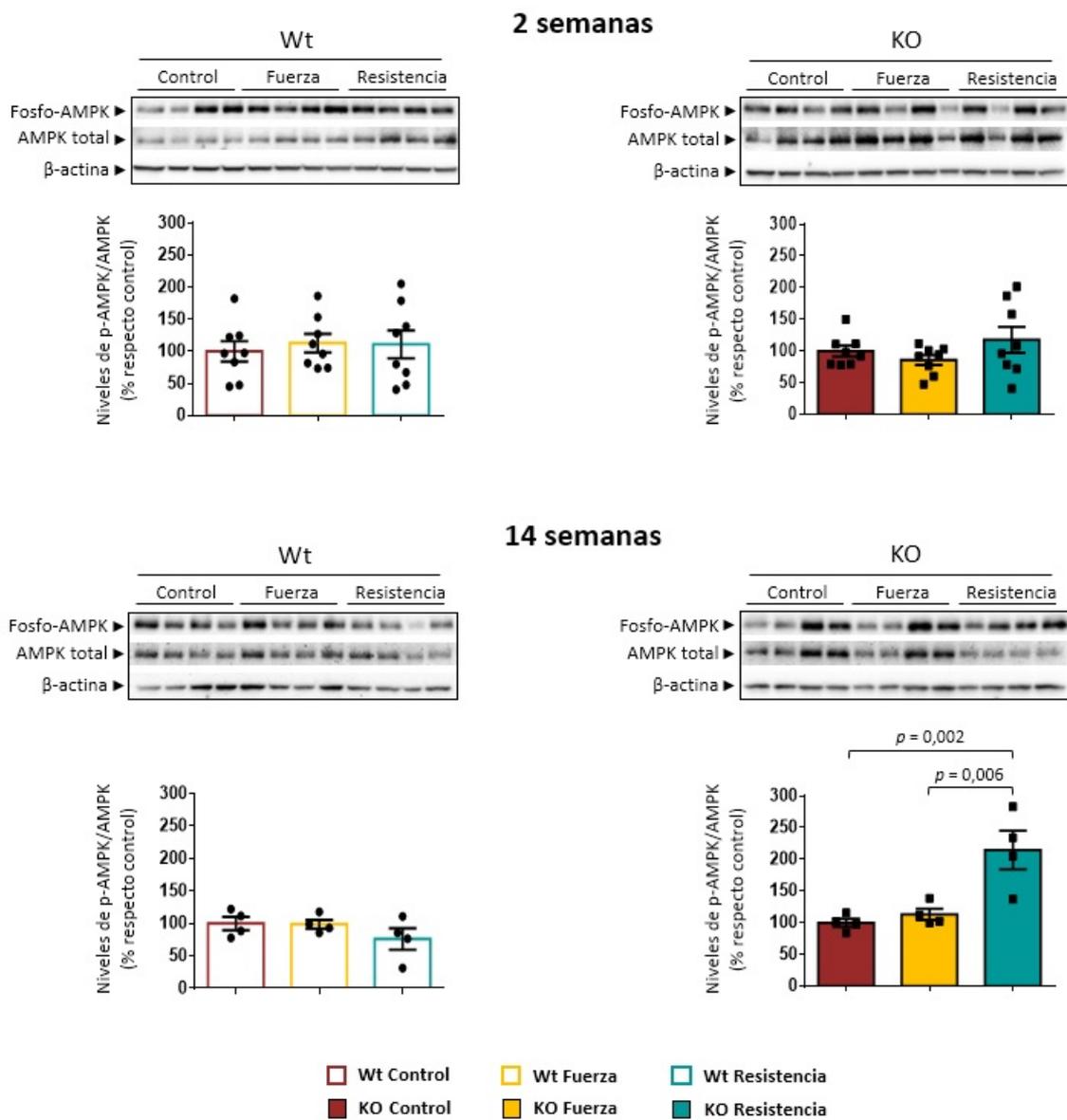
Una vez finalizado el análisis de AMPK, quisimos estudiar otra quinasa reguladora de la autofagia, p70 S6K. Esta proteína, a diferencia de AMPK, no es inductora de la vía autofágica, sino que inhibe esta ruta de degradación. Sin embargo, no se logró obtener marcaje de la proteína activa (fosfo-p70), por lo que no se pudo completar el análisis. Los datos obtenidos de p70 S6K se muestran en anexos (Anexo 2; Figuras suplementarias 1, 2 y 3).

### Corteza cerebral



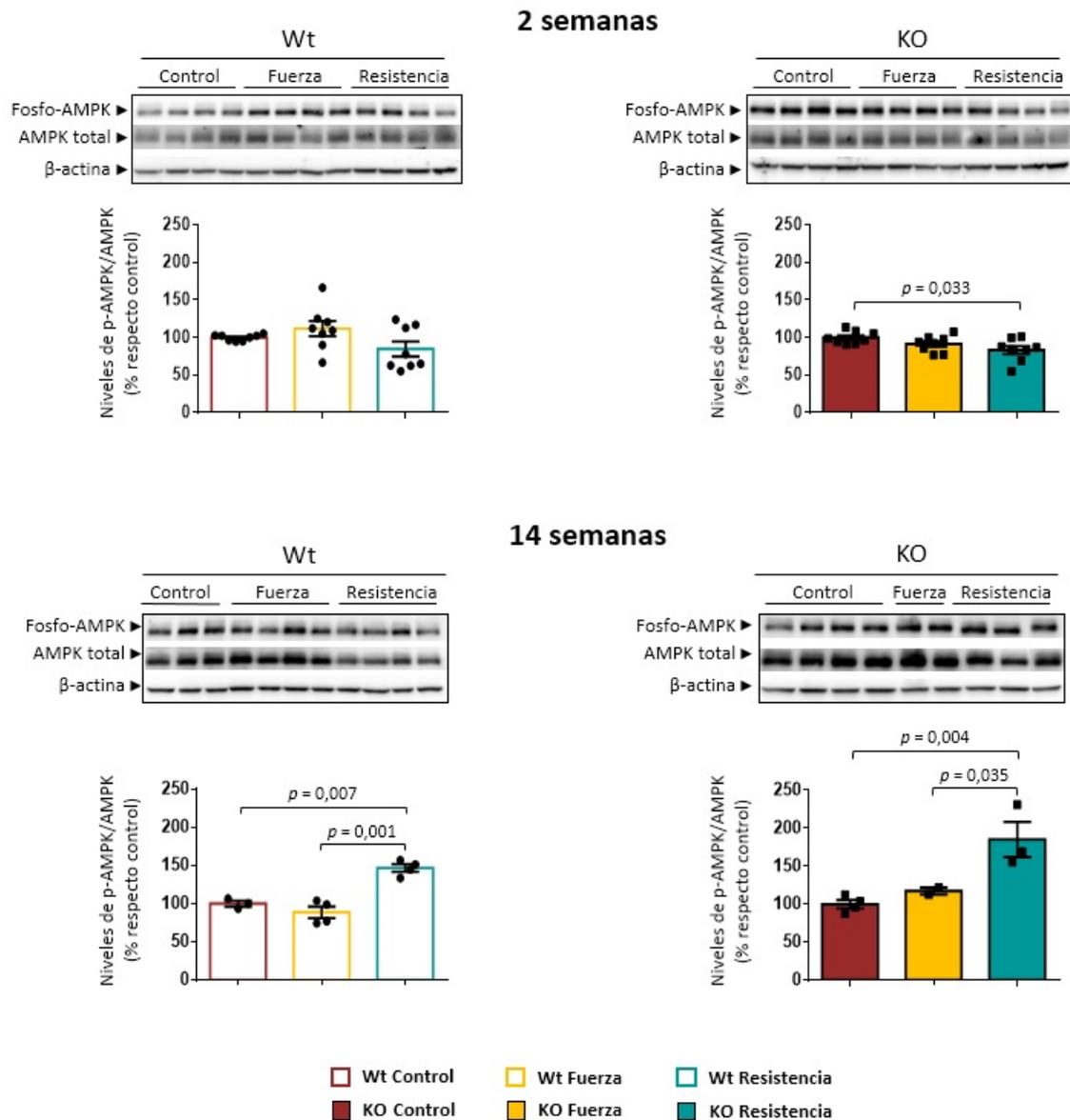
**Figura 46. Niveles de fosfo-AMPK/AMPK total en la corteza cerebral de ratones Wt y KO pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas. Los datos se representan como media ± SEM; n = 8 en cada grupo en la intervención de 2 semanas y n = 4 en la intervención de 14 semanas.**

**Estriado**



**Figura 47. Niveles de fosfo-AMPK/AMPK total en el estriado de ratones Wt y KO pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas.** Los datos se representan como media ± SEM; n = 8 en cada grupo en la intervención de 2 semanas y n = 4 en la intervención de 14 semanas.

**Cerebelo**



**Figura 48. Niveles de fosfo-AMPK/AMPK total en el cerebelo de ratones Wt y KO pertenecientes a las intervenciones de 2 y 14 semanas.** Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; n = 8 en cada grupo en la intervención de 2 semanas y n = 2-4 en la intervención de 14 semanas.

## **VI. DISCUSIÓN**



Evolutivamente, el movimiento es una estrategia imprescindible para la supervivencia. La pérdida de actividad de la sociedad desarrollada actual está en la base de la fisiopatología de muchas enfermedades crónicas (Hawley et al., 2014; Neuffer et al., 2015). El ejercicio físico puede ser entendido como una herramienta que, utilizada de forma correcta, ayuda a la mejora de la calidad de vida y a la prevención de diversas patologías (Neuffer et al., 2015; Grazioli et al., 2017). Por lo tanto, conocer los mecanismos del ejercicio para la salud resulta prioritario.

El tipo de entrenamiento, así como su duración e intensidad, activan diferentes rutas moleculares, tanto en tejidos que participan en el desarrollo directo del propio ejercicio, por ejemplo, el músculo esquelético, como en tejidos que inicialmente se pueden considerar pasivos, entre los que se encuentra el encéfalo (Pedersen y Febbraio, 2012). La mayoría de los estudios que han evaluado el efecto del ejercicio en el encéfalo han utilizado principalmente roedores, debido a que permiten realizar abordajes que resultarían imposibles en humanos. Así mismo, estos trabajos se centran fundamentalmente en el ejercicio de resistencia (van Praag et al., 1999; Lin et al., 2012; Nie y Yang, 2017), siendo escasos aquellos que evalúan el efecto del ejercicio de fuerza sobre el encéfalo, y aún menos sus consecuencias sobre la neurogénesis (Novaes Gomes et al., 2014; Nokia et al., 2016); probablemente porque realizar este tipo de entrenamiento en roedores es más complejo.

Por ello, en este trabajo hemos utilizado protocolos de entrenamiento de fuerza y de resistencia, diseñados de forma que su intensidad fuese progresiva y con una alternancia de cargas que evite la fatiga, para evaluar los efectos de ambos tipos de ejercicio sobre el encéfalo.

Por otro lado, la autofagia es una ruta importante en el mantenimiento de la homeostasis celular que se ve afectada por los procesos de envejecimiento (López-Otín et al., 2016). Debido a que el ejercicio de resistencia es capaz de inducirla, tanto en el músculo esquelético como en el encéfalo (He et al., 2012b; Bayod, et al., 2014; Martin-Rincon et al., 2018), quisimos precisar su implicación en las adaptaciones al ejercicio de fuerza.

## 1. Comportamiento en dos modelos de ratón con déficit de autofagia

El número de trabajos existentes que analizan el efecto del déficit de autofagia en el comportamiento es muy limitado (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Mariño et al., 2010; Glatigny et al., 2019). De hecho, hasta este año, solo se había analizado la conducta motriz, que depende de los núcleos de la base y del cerebelo, describiéndose que los ratones con déficit de autofagia presentaban problemas motores al realizar las pruebas de *rotarod* y *footprinting*. Además, los animales también mostraban *claspings*, que consiste en la flexión de las extremidades anteriores cuando se les cuelga por la cola; un comportamiento que está asociado a alteraciones del sistema nervioso (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Mariño et al., 2010). Sin embargo, la región del hipocampo está relacionada con el comportamiento, siendo una de las áreas encefálicas más vulnerables al déficit de autofagia (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Su región ventral está implicada en las emociones y el estrés, mientras que su región dorsal se asocia a la memoria y la cognición (Fanselow y Dong, 2010). Por ello, utilizamos el test de campo abierto y el de reconocimiento de objetos para evaluar tanto las conductas asociadas al estado de ansiedad como la memoria a corto y largo plazo. Así mismo, durante la redacción de esta Tesis, Glatigny y colaboradores (2019) publicaron un amplio estudio en el que habían realizado diferentes pruebas de comportamiento a ratones a los que se les indujo la inhibición de distintos genes autofágicos.

En nuestro trabajo, los ratones *atg4d*<sup>-/-</sup> mostraron mayor actividad que sus respectivos Wt en el test de campo abierto, demostrando que el déficit parcial de autofagia afecta al tiempo de exploración. Este dato no se ha descrito previamente, ya que solo Glatigny y colaboradores (2019) analizaron el papel de la autofagia en el estado de ansiedad, pero no encontraron diferencias entre los ratones con bajos niveles de autofagia y sus controles. Hay que tener en cuenta que utilizaron un modelo murino al que, tres semanas antes de realizarle el test de comportamiento, se le inhibió la expresión del gen *Beclin 1* exclusivamente en el hipocampo, mientras que nuestros ratones presentaban déficit de *Atg4d* a nivel sistémico desde su nacimiento. Así mismo, Glatigny y colaboradores (2019) trabajaron con animales de 3 meses de edad, que eran más jóvenes que los *atg4d*<sup>-/-</sup> de nuestro estudio (15 meses), por lo que cabe la

posibilidad de que, a mayor edad y con una inhibición de la autofagia sostenida en el tiempo, pudieran presentar un fenotipo similar al descrito en esta Tesis.

Con respecto a la memoria, los ratones *atg4d*<sup>-/-</sup> presentaron un mayor índice de reconocimiento a corto plazo que los Wt, mientras que el déficit de Atg4d no afectó a la memoria a largo plazo. Nuestros resultados son contrarios a los de Glatigny y colaboradores (2019) que describieron que tanto ratones de 3 meses de edad como de 16 meses, que presentaban disminuidos los niveles de autofagia, tenían afectada la memoria de reconocimiento a largo plazo. Es posible que la diferencia entre ambos estudios se deba al gen modificado, ya que, en nuestro caso, la autofagina Atg4 presenta cuatro parálogos distintos, que podrían compensarse entre sí ante el déficit de alguno de ellos, mientras que no ocurriría lo mismo en el caso de *Beclin 1*, ya que este gen no los tiene.

Por otro lado, el déficit del gen *Atg4b* no afectó al tiempo deambulatorio, al igual que lo descrito por Glatigny y colaboradores (2019) con respecto a *Beclin 1*, y contrario a lo observado en el modelo *atg4d*<sup>-/-</sup>. Esto podría deberse a tres factores: en primer lugar, el fondo genético de los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> es distinto al de los *atg4d*<sup>-/-</sup>, pudiendo influir de forma diferente en el comportamiento de los animales. En segundo lugar, otro factor que podría interferir entre ambos modelos es la diferencia entre parálogos. Aunque tanto Atg4b como Atg4d intervienen en la formación del autofagosoma, su implicación en esta vía de degradación se produce en diferentes niveles del procesamiento de LC3 (Kauffman et al., 2018; Agrotis et al., 2019). Por último, hay que tener en cuenta que los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> realizaron los test de comportamiento cuando tenían 2 meses de edad, por lo que, a diferencia de los *atg4d*<sup>-/-</sup>, es posible que aún no se hubiese visto afectado el tiempo de exploración, pero fenotípicamente se pueda detectar a edades más avanzadas.

Sin embargo, en el test de reconocimiento de objetos, al igual que observamos en los *atg4d*<sup>-/-</sup>, el déficit de Atg4b se asoció a un mayor índice de reconocimiento en la memoria a corto plazo, sin afectar a la memoria a largo plazo. Por lo tanto, como se acaba de comentar, es posible que los parálogos de *Atg4* se pudiesen compensar, y por ello, salvando las diferencias en cuanto al modelo animal, nuestros datos son diferentes a los descritos por Glatigny y colaboradores (2019). No obstante, es posible que

nuestros dos modelos animales puedan tener la memoria afectada pasados los 15 meses de edad, ya que se ha descrito que ratones Wt envejecidos de 26 meses presentaban acumulación de autofagosomas en el hipocampo, así como la memoria a corto plazo reducida (Soontornniyomkij et al., 2012).

## **2. Capacidad física en un modelo deficiente en autofagia tras el entrenamiento de fuerza y de resistencia**

Aunque se ha demostrado que el entrenamiento de resistencia es capaz de inducir la autofagia en el encéfalo (He et al., 2012b; Bayod, et al., 2014), el efecto del ejercicio de fuerza no ha sido estudiado hasta el momento en esta región. Por ello, para poder evaluar el alcance de ambos tipos de ejercicio en el encéfalo, en primer lugar, realizamos una adaptación progresiva y prolongada a las estaciones de entrenamiento, que permitió que todos los ratones llevaran a cabo las intervenciones. Además, evaluamos la capacidad de fuerza y de resistencia de los ratones tanto antes de las intervenciones, con el fin de planificar el entrenamiento, como después de las mismas, pudiendo así conocer los efectos del entrenamiento.

Durante el test de evaluación inicial, los animales con déficit parcial de autofagia tenían afectada la capacidad de fuerza, pero no la de resistencia. Por lo tanto, dicho déficit parece producir, a los 2 meses de edad, un detrimento de la fuerza más avanzado en los *atg4b*<sup>-/-</sup> con respecto a los Wt. Existen dos estudios en los que también se ha demostrado la disminución de esta cualidad motriz en modelos deficientes en autofagia. Sin embargo, en estos trabajos utilizaron modelos de ratón, de entre 2 y 5 meses de edad, con déficit de *Atg5* y *Atg7*, exclusivamente en el músculo esquelético (Raben et al., 2008; Masiero et al., 2009), mientras que nuestro estudio es el primero en describir que el déficit parcial de autofagia, a nivel sistémico, también reduce la capacidad de fuerza.

Una vez realizadas las intervenciones de 2 y 14 semanas, se confirmó que los entrenamientos fueron eficaces y específicos de las cualidades entrenadas, a excepción de la intervención de fuerza durante 2 semanas, donde observamos que tanto los Wt

entrenados en fuerza como los controles incrementaron su capacidad de fuerza a lo largo de la intervención. Esto indica que el entrenamiento no fue la única causa de la mejora de la fuerza, sino que los animales, que tenían al comienzo del entrenamiento 2 meses de edad, aún se encontraban desarrollándose y aumentando tanto su peso como su fuerza. Sin embargo, no observamos este mismo resultado en los Wt que entrenaron resistencia ya que, aunque estos animales también se encontraban en desarrollo, este tipo de ejercicio pudo contrarrestar la ganancia de fuerza.

Por otro lado, tras la intervención de larga duración, los Wt que no entrenaron disminuyeron la capacidad de fuerza, desde los 2 meses de edad hasta los 5 meses, cuando llevaron a cabo el test de evaluación final. Por lo tanto, es probable que el envejecimiento sea la causa de esta disminución. Un resultado similar encontramos en los animales *atg4b*<sup>-/-</sup> sedentarios de la misma edad. Debido a que la autofagia disminuye a lo largo de la vida, es posible que su detrimento afecte a la capacidad de fuerza. No obstante, al estudiar el efecto del entrenamiento en estos ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> detectamos que el ejercicio de fuerza fue capaz de frenar el deterioro de dicha cualidad. Si bien estudios previos han descrito que el entrenamiento de fuerza induce la autofagia en el músculo esquelético (Luo et al., 2013; White et al., 2016), esta es la primera vez que se demuestra que dicho entrenamiento es capaz de frenar el detrimento de la fuerza que causa el déficit parcial de autofagia. Este resultado aporta nuevos datos sobre la importancia del ejercicio de fuerza para la salud.

A diferencia de lo que ocurre con la capacidad de fuerza, el entrenamiento de resistencia durante 2 semanas mejoró la cualidad entrenada de los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, aunque a largo plazo se detectó la misma tendencia, el déficit de autofagia parece limitar la adaptación a este tipo de ejercicio. Esto podría sugerir que el déficit de autofagia no interfiere sobre la capacidad de resistencia en los ratones jóvenes, mientras que dicho déficit a largo plazo, unido a la disminución de la autofagia asociada al envejecimiento, dificulta la mejora de esta cualidad tras el entrenamiento de resistencia.

Podemos comparar estudios en los que llevaron a cabo entrenamientos agudos con nuestros resultados de los test de evaluación iniciales, debido a su similitud. Mientras que en nuestro caso no detectamos diferencias entre los *atg4b*<sup>-/-</sup> y los Wt, He y colaboradores (2012a) observaron que ratones con déficit de autofagia (*benc1*<sup>+/-</sup> de 3

## Discusión

meses de edad y ratones *bcl2<sup>AAA</sup>* de 2 meses) corrían menos distancia en el tapiz rodante que sus respectivos Wt, tras someterlos a una única sesión de entrenamiento hasta que alcanzaban la extenuación. En otro trabajo en el que entrenaron a ratones de 6 meses de edad con déficit de *Atg7* en el músculo esquelético, se mostró un resultado interesante al entrenar ratones de ambos sexos (Lo Verso et al., 2014). Tras solo 3 días de ejercicio intenso en una cinta de correr (acabando los animales extenuados cada uno de los días), los ratones hembra *atg7<sup>-/-</sup>* corrieron menos distancia que sus respectivos Wt. Sin embargo, la distancia recorrida fue la misma entre los animales macho de ambos genotipos, como vimos en nuestro estudio. Por lo tanto, estos trabajos muestran resultados diferentes entre sí y en comparación con los de nuestra investigación.

Por otro lado, cuando nos centramos en intervenciones de larga duración, también observamos diferencias. Ratones *benc1<sup>+/-</sup>* de 2,5 meses y ratones *col6a1<sup>-/-</sup>* de 4 meses de edad, que entrenaron de forma voluntaria en ruedas de correr, presentaban una disminución de la distancia recorrida tras 5 y 12 semanas de ejercicio respectivamente, en comparación con sus controles (Grumati et al., 2011; Lira et al., 2013). Por el contrario, en nuestro trabajo no detectamos diferencias entre los Wt y los *atg4b<sup>-/-</sup>* tras los entrenamientos de 2 y 14 semanas. Además, los ratones *atg4b<sup>-/-</sup>* entrenados en resistencia no disminuyeron la distancia recorrida a lo largo de las intervenciones. De hecho, como se comentó anteriormente, después de 2 semanas mejoraron el rendimiento y tras 14 semanas mostraron la misma tendencia. Nuestro estudio es el primero que describe un protocolo de entrenamiento de resistencia capaz de mejorar esta cualidad en ratones con déficit de autofagia. Hay que tener en cuenta que, a diferencia de otros trabajos, hemos analizado la capacidad física tanto al inicio como al final del entrenamiento, mostrando el efecto real del ejercicio.

Así mismo, también hay que tener en cuenta que las diferencias encontrados entre los estudios pueden deberse a los distintos protocolos de entrenamiento aplicados, ya que un entrenamiento en el que se utiliza un tapiz rodante permite que todos los animales corran a la misma velocidad y durante el mismo tiempo. Sin embargo, aquellos que utilizan una rueda de correr, de forma voluntaria, no pueden controlar estos parámetros, por lo que esta diferencia en el entrenamiento podría producir algunas de las discrepancias que encontramos. A su vez, también habría que tener en cuenta que cada modelo de ratón es KO para un gen diferente implicado en distintas fases del

proceso autofágico. Además, nuestro modelo murino tiene déficit para el gen *Atg4b*, que podría ser compensado por los otros tres parálogos de *Atg4* (*Atg4a*, *Atg4c* y *Atg4d*).

### 3. Efecto del entrenamiento en el comportamiento de ratones *atg4b*<sup>-/-</sup>

El ejercicio es beneficioso a nivel cognitivo (Vaynman et al., 2004; van Praag et al., 2005; O'Collaghan et al., 2007), al igual que como inductor de la vía autofágica (He et al., 2012b; Bayod, et al., 2014); no existiendo trabajos previos que hayan estudiado el efecto del entrenamiento en la conducta de modelos murinos con déficit de autofagia. Así mismo, esta es la primera vez que se analiza el efecto del ejercicio de fuerza en el comportamiento y, al igual que habían descrito otros autores en ratones Wt entrenados solo en resistencia (Sakalem et al., 2016; Morgan et al., 2017), ninguno de los dos tipos de ejercicio aplicados (fuerza y resistencia) afectó al tiempo deambulatorio en el test de campo abierto.

Por el contrario, parece que el déficit parcial de autofagia disminuyó la actividad de los ratones cuando tenían 3,5 meses de edad, al contrario de lo que habíamos observado a los 2 meses, y contrariamente también al estudio de Glatigny y colaboradores (2019) en el que tampoco se detectaron diferencias en la actividad entre ratones de 3 meses de edad con déficit de *Beclin 1* exclusivamente en el hipocampo y sus respectivos Wt. Es posible que nuestros resultados estén indicando que el déficit parcial de autofagia no afecta al tiempo de exploración a edades tempranas, mientras que a mayor edad puede causar comportamientos relacionados con la ansiedad. No obstante, estos resultados no son concluyentes, ya que no se han encontrado diferencias conductuales entre el test previo al entrenamiento y el que se realizó tras el mismo, en cada uno de los grupos de entrenamiento.

Por otro lado, al estudiar la memoria vimos que los animales Wt entrenados en fuerza presentaron un mayor índice de reconocimiento a corto plazo con respecto a los controles, no observándose variación entre los grupos de entrenamiento en los *atg4b*<sup>-/-</sup>. Por lo tanto, el déficit parcial de autofagia interferiría sobre este tipo de memoria, no detectándose el efecto del entrenamiento que observamos en los Wt.

## Discusión

En cuanto al efecto del ejercicio sobre la memoria, el número de trabajos es muy limitado (Suijo et al., 2013; Loprinzi et al., 2018; Soga et al., 2018; Feter et al., 2019), siendo casi inexistentes aquellos que analizan la memoria de reconocimiento a corto plazo. En un estudio reciente, Feter y colaboradores (2019) entrenaron a ratones de 2 meses de edad en una escalera vertical durante 6 semanas. Sin embargo, no observaron que los animales entrenados presentaran mejor memoria de reconocimiento a corto plazo que los sedentarios, posiblemente debido a que el protocolo que utilizaron incrementaba la intensidad del entrenamiento de forma rápida. En nuestro caso, el protocolo fue diseñado para que la intensidad aumentara de forma mucho más progresiva, reduciendo el estrés de los animales lo máximo posible. Por lo tanto, el entrenamiento de fuerza en el estudio de Feter y colaboradores (2019) quizá produjese un nivel de estrés elevado, interfiriendo sobre el reconocimiento de objetos. No obstante, estos autores sí que mostraron que el entrenamiento de fuerza influyó de forma positiva en la memoria espacial, por lo que es importante tener en cuenta que existen diferentes tipos de memoria y que, en cada una de ellas, están implicadas diferentes regiones del hipocampo, así como otras áreas cerebrales como la corteza prefrontal o la corteza perirrinal (DeVito y Eichenbaum, 2010; Vann y Albasser., 2011; O'Neill et al., 2017).

En el caso del entrenamiento de resistencia, diversos estudios han descrito que este tipo de ejercicio mejora la cognición (van Praag et al., 1999, 2005; Vaynman et al., 2004; O'Collaghan et al., 2007; Feter et al., 2019). Sin embargo, no todos los trabajos han podido demostrarlo sistemáticamente; lo que puede ser debido a diferencias en el fondo genético de los animales utilizados, al tipo de protocolo de entrenamiento o a que el ejercicio de resistencia puede producir efectos distintos sobre los diferentes tipos de memoria (Lin et al., 2012). No obstante, dos estudios previos que trabajaron con ratones de 2 y 3 meses de edad mostraron, al igual que nuestro estudio, que un entrenamiento durante 3 semanas en rueda de correr, así como otro de 6 semanas en tapiz rodante, no afectaron a la memoria de reconocimiento a corto plazo (Bolz et al., 2015; Tsai et al., 2018). Sakalem y colaboradores (2016) también obtuvieron resultados similares al aplicar enriquecimiento ambiental junto con un entrenamiento de 2 semanas en cinta de correr.

Con respecto a la memoria de reconocimiento a largo plazo, aunque no existen trabajos previos en los que se analice el efecto del ejercicio de fuerza sobre este tipo de memoria, sí que se ha estudiado el efecto del entrenamiento de resistencia. Tsai y colaboradores (2018) no detectaron que un entrenamiento de 6 semanas en una cinta de correr influyese en la memoria de ratones Wt de 3 meses de edad. Sin embargo, en cuanto al déficit de autofagia Glatigny y colaboradores (2019) describieron que ratones de 3 meses de edad, con la expresión del gen *Beclin 1* inhibida exclusivamente en el hipocampo, presentaban este tipo de memoria disminuida. En nuestro caso, la memoria de reconocimiento a largo plazo no se vio afectada ni por el ejercicio ni por el déficit parcial de autofagia. Y, como ya se comentó, estas diferencias que encontramos con respecto a la influencia del déficit de autofagia pueden deberse a que cada modelo de ratón presenta déficit de un gen distinto. Así mismo, el modificado en nuestro estudio (*Atg4b*) tiene tres parálogos que podrían compensarlo, mientras que esto no ocurriría en el caso de *Beclin 1*.

Como ocurre en relación con el análisis de la capacidad física, este es el único trabajo que ha estudiado el comportamiento, tanto al inicio como al final del entrenamiento. A la vista de nuestros resultados, sería necesario que en aquellos trabajos en los que se aplique una intervención de este tipo, se realicen también los test de comportamiento antes de llevar a cabo dicha intervención, para así tener un reflejo más real del efecto de la misma.

Los estudios descritos a continuación se llevaron a cabo con tejido *post mortem*. Hay que tener en cuenta que los ratones entrenados se sacrificaron 48 horas después de la última sesión de ejercicio con el fin de analizar la situación basal en estos animales.

#### 4. Adaptaciones neuronales al entrenamiento

La inducción de la neurogénesis adulta por el ejercicio de resistencia ha sido ampliamente estudiada (van Praag et al., 1999). Sin embargo, son escasos los trabajos sobre el efecto del ejercicio de fuerza, y sus resultados son contradictorios (Novaes Gomes et al., 2014; Nokia et al., 2016), no existiendo ninguno con modelos murinos deficientes en autofagia.

Nuestros resultados indicaron que ninguno de los dos tipos de entrenamiento modificó los niveles de células Ki67<sup>+</sup>, si bien otros autores habían descrito previamente un aumento en este marcador tanto tras un ejercicio de resistencia como de fuerza (van Praag et al., 1999; Novaes Gomes et al., 2014). Esta discrepancia podría deberse a que, como demostraron Kempermann y colaboradores (1997), la neurogénesis hipocampal adulta se ve afectada de forma distinta dependiendo del fondo genético de los ratones. Otros estudios también describieron que el enriquecimiento ambiental no afecta a la proliferación celular de igual forma en ratones C57BL/6J que en 129/SvJ (van Praag et al., 1999). Teniendo en cuenta que el fondo genético de nuestros animales es mixto (C57BL6/129Sv), esto podría estar dificultando que el entrenamiento indujese la proliferación. Por otro lado, la autofagia no estaba implicada en el proceso, ya que tampoco se observaron cambios a este nivel en los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup>.

Sin embargo, la edad parece ser un factor clave para estas células, ya que su número descendió en los animales que participaron en la intervención de larga duración. Este resultado podría deberse a dos causas: por un lado, el envejecimiento podría disminuir la capacidad proliferativa de las células de forma muy acusada en apenas 2,5 meses. De hecho, en otros estudios también se ha observado que el grado de proliferación celular disminuye drásticamente en un corto periodo de tiempo, pero hasta ahora no se había detectado en ratones de menos de 6 y 7 meses (Wu et al., 2008; Yang et al., 2015). Por otro lado, la diferencia observada en el número de células Ki-67<sup>+</sup> podría deberse a que la población de las NSC se reduce con la edad. Encinas y colaboradores (2011) han mostrado la posibilidad de que las NSC, en los individuos adultos, permanecen en reposo la mayor parte de su vida hasta que se activan y se someten a un pequeño número de divisiones para, finalmente, diferenciarse y abandonar la capacidad de célula madre neural. Esto produciría la reducción de la población de los

progenitores de tipo-1, limitando el resto de las fases de la neurogénesis. Sin embargo, aunque el detrimento de la población de las NSC es clave en el proceso neurogénico, aún siguen siendo necesarios más estudios para esclarecer las causas de su reducción a lo largo de la vida (Encinas et al., 2012).

Por otro lado, los entrenamientos de fuerza y de resistencia favorecieron la neurogénesis, determinada por el marcaje con DCX, en el DG del hipocampo de los ratones Wt. Estos resultados demuestran que no solamente el ejercicio de resistencia es beneficioso para la diferenciación neuronal en el DG, sino que el ejercicio de fuerza también aporta grandes beneficios. De hecho, en la intervención de 14 semanas, el entrenamiento de fuerza fue más efectivo que el de resistencia; un resultado que no se había descrito con anterioridad y que aporta una gran relevancia a este tipo de entrenamiento.

En contraposición a nuestro estudio, Nokia y colaboradores (2016) en un primer experimento describieron que ratas de 2 meses de edad entrenadas durante 8 semanas en fuerza (en una escalera vertical) presentaban el mismo número de células DCX<sup>+</sup> que las sedentarias. En un segundo experimento, ratas de 6 meses de edad entrenadas previamente en una cinta de correr durante 8 semanas, se dividieron en dos grupos, uno entrenando fuerza y otro resistencia durante 6 semanas más. Aquí mostraron que aquellas que mantuvieron el entrenamiento de resistencia presentaban más células DCX<sup>+</sup> que las entrenadas en fuerza. Es posible que el número de células DCX<sup>+</sup> que detectaron fuese menor en los animales que realizaron ejercicio de fuerza debido a que la intensidad del entrenamiento fue mayor que la nuestra, lo que podría causar estrés a los animales, afectando a la neurogénesis. Así mismo hay que tener en cuenta que utilizaron una especie de roedor distinta a la nuestra. No obstante, en este último experimento no existió un grupo de animales que realizaran ejercicio de fuerza exclusivamente, así como tampoco compararon ambos tipos de entrenamiento con un grupo control, lo que impide la interpretación de los resultados.

Por el contrario, el déficit parcial de autofagia influyó negativamente sobre el efecto del ejercicio en la neurogénesis, dificultando la diferenciación y la maduración de los precursores neuronales. Xi y colaboradores (2016) ya habían descrito, en ratones de entre 2-3 meses de edad, que el bloqueo del gen *Atg5*, específicamente en el DG,

## Discusión

producía un descenso de las células DCX<sup>+</sup>. Sin embargo, nuestra investigación es la primera en la que se describe este resultado en un modelo murino con déficit parcial de autofagia a nivel sistémico, lo que indica que es probable que el descenso de la autofagia que se produce a lo largo de la vida afecte a la correcta diferenciación, maduración y supervivencia de los precursores neuronales.

Aunque no realizamos un análisis del número de neuritas, pudimos apreciar que los ejercicios de fuerza y de resistencia parecen influir en su desarrollo. Así mismo, tanto la edad como el déficit parcial de autofagia pudieron afectar de forma negativa en este proceso. De hecho, existen estudios que evidencian que el ejercicio de resistencia estimula la neuroplasticidad y el crecimiento de las dendritas (Lin et al., 2012; Yang et al., 2015), y que en este proceso influye la edad de los ratones (Wu et al., 2008). Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que el ejercicio de fuerza pueda inducir el desarrollo dendrítico, un resultado que le conferiría un gran valor a este tipo de entrenamiento. En cuanto a la influencia del déficit de autofagia sobre el desarrollo de las neuritas, Xi y colaboradores demostraron que precursores neuronales *atg5*<sup>-/-</sup> presentaban reducida la densidad de espinas dendríticas, por lo que el estudio utilizando ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> podría corroborar la importancia de la autofagia en la maduración y el desarrollo neuronal.

Con respecto al efecto del ejercicio de fuerza y de resistencia, así como del déficit de autofagia, sobre las proteínas SNARE, diversos estudios han demostrado que tanto el entrenamiento de fuerza como el de resistencia influyen sobre los niveles de diferentes proteínas presinápticas en distintas regiones encefálicas (Ferreira et al., 2010; Cassilhas et al., 2012; Garcia et al., 2012; Lin et al., 2012). Se ha descrito que el déficit de autofagia puede producir la acumulación de estas proteínas y, con ello, la disfunción sináptica (Friedman et al., 2012; Xilouri et al., 2013; Vijayan y Verstreken, 2017). Aunque diversos autores han demostrado que el ejercicio de resistencia disminuye los niveles de  $\alpha$ -sinucleína, frecuentemente utilizan modelos de ratón de la enfermedad de Parkinson (Koo y Cho, 2017; Hwang et al., 2018), sin analizar este efecto específicamente en animales Wt. Así mismo, debido a la implicación de  $\alpha$ -sinucleína en esta patología, los estudios se suelen centrar en la región del estriado y la sustancia negra, sin examinar otras zonas encefálicas. Además, son escasos los trabajos que han

analizado los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en modelos murinos con déficit de autofagia (Friedman et al., 2012).

Nuestros resultados mostraron que ni el ejercicio ni el déficit parcial de autofagia influyeron sobre los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en ninguna de las regiones encefálicas estudiadas. Debido a que, como se acaba de comentar, la mayoría de los trabajos que estudian el efecto del ejercicio en esta proteína suelen utilizar modelos murinos de enfermedad de Parkinson, no podemos compararlos con nuestro estudio. En cuanto a la influencia del déficit de autofagia sobre los niveles de  $\alpha$ -sinucleína, Friedman y colaboradores (2012) describieron que ratones de 35 días de edad con déficit de *Atg7*, específicamente en células nerviosas, presentaron acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en los terminales presinápticos. Puesto que nuestro modelo tenía déficit parcial de autofagia a nivel sistémico, es posible que el resto de parálogos de *Atg4* compensen dicho déficit.

Con respecto a CSP $\alpha$ , no existen trabajos previos que hayan analizado el papel del ejercicio ni el déficit de autofagia sobre sus niveles. Nuestros resultados mostraron que solo el entrenamiento de resistencia durante 14 semanas aumentó los niveles de esta chaperona en el cerebelo de los ratones Wt. Otros autores han descrito incrementos en los niveles de diferentes proteínas presinápticas en distintas regiones encefálicas, mejorando la plasticidad sináptica, con entrenamientos de fuerza (Cassilhas et al., 2012), de resistencia (Ferreira et al., 2010; Cassilhas et al., 2012; Lin et al., 2012) y de equilibrio y coordinación (García et al., 2012). En la misma línea, nuestros resultados podrían estar indicando que el entrenamiento de resistencia durante 14 semanas también mejoraría la plasticidad sináptica en relación con CSP $\alpha$  en el cerebelo, mientras que el ejercicio de fuerza no influiría en los niveles de esta proteína.

No obstante, estos trabajos previos fueron capaces de detectar diferencias en los niveles de proteínas presinápticas en el hipocampo, la corteza cerebral, el estriado o el cerebelo, tras 4 y 8 semanas de entrenamiento de resistencia (Cassilhas et al., 2012; García et al., 2012; Lin et al., 2012), e incluso, con tan solo 7 días de ejercicio (Ferreira et al., 2010). Sin embargo, en nuestro caso, CSP $\alpha$  solo sigue esa tendencia tras 14 semanas de entrenamiento, y solo en el cerebelo. Por lo tanto, aunque esta chaperona también responde a los efectos del ejercicio de resistencia, lo hace a más largo plazo

## Discusión

que las otras proteínas estudiadas. Por otro lado, cada región encefálica cumple una función distinta, y responde de forma diferente a cada intervención. Aunque la corteza cerebral, el estriado y el cerebelo estén involucrados en el movimiento, cada uno de ellos está especializado en diferentes etapas del aprendizaje motor. Mientras que la corteza cerebral está implicada en las primeras fases conscientes de este aprendizaje, el cerebelo está relacionado con la automatización de los movimientos previamente aprendidos (Doyon et al., 2009; Galea et al., 2011). Es por ello por lo que, posiblemente, solo hayamos detectado respuesta ante el ejercicio por parte de esta región encefálica.

Sin embargo, en cuanto a los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup>, el ejercicio produjo efectos diferentes sobre los niveles de CSP $\alpha$  en cada una de las regiones estudiadas. De esta forma, el entrenamiento de resistencia a largo plazo incrementó los niveles de esta chaperona en el estriado, sin que este efecto se haya visto ni en el entrenamiento de fuerza ni en la intervención a corto plazo. Es posible que la alta demanda proteica requerida en la región presináptica cuando se realiza ejercicio de resistencia, junto con el déficit parcial de autofagia que sufren estos animales, sean la causa por la cual se produce la acumulación de CSP $\alpha$  en esta región. En cambio, en el hipocampo y en el cerebelo, tanto el ejercicio de fuerza como el de resistencia disminuyeron los niveles de CSP $\alpha$ . Esto estaría indicando que, a diferencia de lo observado en el estriado, ambos tipos de ejercicio facilitan su reciclaje en las dos regiones encefálicas, probablemente a través de los otros tres parálogos de *Atg4*, los cuales podrían estar compensando el déficit de *Atg4b*. Previamente, Friedman y colaboradores (2012) observaron que el déficit autofágico produce acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebelo y, a raíz de nuestros datos, CSP $\alpha$  podría seguir el mismo patrón. A su vez, parece que no solo el ejercicio de resistencia favorecería la degradación de esta proteína acumulada, como ya se había observado en otros trabajos sobre  $\alpha$ -sinucleína (Koo y Cho, 2017; Hwang et al., 2018), sino que el entrenamiento de fuerza también disminuiría sus niveles. Por lo tanto, el ejercicio de fuerza jugaría un papel importante en la prevención del deterioro neuronal en el hipocampo y el cerebelo de estos ratones.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que, ante el déficit de autofagia, los niveles de CSP $\alpha$  en el hipocampo y el estriado requieren mayor tiempo de adaptación al efecto del ejercicio. Sin embargo, el cerebelo es la única estructura de las estudiadas que

responde a las primeras semanas de entrenamiento. La mayoría de los estudios en los que se ha descrito el déficit de autofagia en el encéfalo de modelos murinos han demostrado que esta región es una de las más sensibles ante el déficit autofágico, acumulándose en ella gran cantidad de proteínas (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Es por ello por lo que, posiblemente, el déficit parcial de autofagia afecte primero a esta región, y que el efecto del ejercicio se perciba antes en esta zona.

## 5. Análisis de los niveles de proteínas involucradas en autofagia

Estudios previos han demostrado que el ejercicio de resistencia es capaz de inducir la autofagia en el encéfalo (He et al., 2012b; Bayod et al., 2014). En cambio, los trabajos que estudiaron el efecto del entrenamiento de fuerza en esta vía de degradación solo analizaron los niveles de autofagia en el músculo esquelético (Fry et al., 2013; Luo et al., 2013; White et al., 2016; Kwon et al., 2018).

La corteza cerebral fue la única región de todas las estudiadas en la que los niveles basales de LC3 respondieron al ejercicio. En los ratones Wt, tanto el entrenamiento de fuerza como el de resistencia, a largo plazo, incrementaron los niveles de LC3-II/LC3-I en esta región cerebral. Sin embargo, en los *atg4b*<sup>-/-</sup> solo el entrenamiento de resistencia a corto plazo los aumentó. Este es el primer estudio que describe que el ejercicio de fuerza es capaz de incrementar los niveles de autofagia en la corteza cerebral. Los trabajos previos en los que, al igual que en el nuestro, utilizaron una escalera vertical, observaron que tras entrenar ratas durante 8 y 9 semanas los niveles de LC3-II/LC3-I estaban disminuidos en el músculo (Luo et al., 2013; Kwon et al., 2018).

Esta discrepancia que encontramos entre nuestra investigación y la de estos estudios puede deberse a varios factores. Primero, el efecto del ejercicio de fuerza sobre las proteínas autofágicas podría ser distinto en los diferentes tejidos, así como entre las distintas especies. En segundo lugar, hay que tener en cuenta las diferencias entre los entrenamientos. En el estudio de Luo y colaboradores (2013) los animales subieron un menor número de escalones en cada una de las sesiones de entrenamiento en

## Discusión

comparación con nuestras intervenciones. Además, utilizaron ratas de edad avanzada (18 - 20 meses). En el caso del estudio de Kwon y colaboradores (2018), aplicaron un protocolo de entrenamiento en el que la intensidad de las cargas era máxima (75 - 100 %), lo que pudo producir estrés a los animales, afectando a la inducción de la autofagia. Un tercer factor es la posibilidad de que el entrenamiento de fuerza requiera más de 9 semanas para incrementar los niveles de autofagia, ya que no todas las cualidades físicas responden al entrenamiento de igual forma. Como vimos anteriormente, nuestros ratones Wt necesitaron más de 2 semanas de ejercicio de fuerza para mejorar esta cualidad. Sin embargo, el entrenamiento de resistencia durante el mismo periodo de tiempo sí produjo que este genotipo incrementara su capacidad de resistencia. Y, por último, hay que tener en cuenta que en estos estudios los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última sesión de entrenamiento, mientras que en nuestra investigación transcurrieron 48 horas; eliminando así el efecto agudo de esa última sesión. Una vez más, nuestros resultados mostrarían la importancia del entrenamiento de fuerza a nivel encefálico.

Por el contrario, el papel del ejercicio de resistencia en el cerebro ya había sido previamente estudiado. Bayod y colaboradores (2014) habían descrito que el entrenamiento en una cinta de correr tras 36 semanas incrementaba el cociente LC3-II/LC3-I en la corteza cerebral de ratas. Sin embargo, en nuestro estudio con ratones demostramos que una intervención más corta (14 semanas) es suficiente para detectar este efecto. En consecuencia, tanto el ejercicio de fuerza como el de resistencia podrían paliar la disminución de la autofagia basal que se produce durante ciertos procesos como el envejecimiento, previniendo la acumulación de proteínas asociadas con algunos trastornos neurodegenerativos.

En cuanto al efecto del ejercicio en los ratones con déficit de autofagia, a diferencia de nuestros resultados, He y colaboradores (2012b) describieron que el ejercicio de resistencia en cinta de correr no modificaba los niveles de LC3 en la corteza cerebral de ratones *bcl2<sup>AAA</sup>* de 2 meses de edad. Sin embargo, su intervención consistía en un entrenamiento agudo, lo cual no es comparable con nuestra intervención de 2 semanas.

Por otro lado, los resultados de los niveles de p62 y ubiquitina no fueron concluyentes. El ejercicio afectó de forma distinta a los niveles de p62 en cada una de las regiones encefálicas, mientras que solo los Wt que entrenaron fuerza durante 2 semanas mostraron los niveles de ubiquitina incrementados. Diversos trabajos han descrito que estas dos proteínas trabajan conjuntamente durante la autofagia selectiva y, al contrario de lo que ocurre con LC3, disminuyen sus niveles durante el proceso autofágico (Komatsu e Ichimura, 2010; Johansen y Lamark, 2011; Schreiber y Peter, 2014). Bayod y colaboradores (2014) describieron que el entrenamiento de resistencia inducía la autofagia en la corteza cerebral, disminuyendo los niveles de ambas proteínas. Sin embargo, en nuestro caso, p62 y ubiquitina no siguieron el mismo patrón. Sería necesario saber el tiempo transcurrido desde que llevaron a cabo la última sesión de entrenamiento y el sacrificio de los animales, porque en su estudio no lo especifican y podría ser una de las causas de las discrepancias que encontramos. Así mismo, hay que tener en cuenta que ambas proteínas están implicadas en otras rutas celulares, lo que podría influir en estas diferencias. Aunque p62 principalmente se ha asociado con la autofagia (Komatsu e Ichimura, 2010; Johansen y Lamark, 2011; Schreiber y Peter, 2014), también está involucrada en la regulación de la adipogénesis, la hipoxia o el estrés oxidativo (Moscat y Díaz-Meco, 2011; Calvo-Garrido et al., 2019). En el caso de ubiquitina, cabe destacar que el déficit parcial de autofagia no influyó sobre sus niveles, posiblemente debido a que esta proteína está relacionada, no solo con la autofagia, sino también con el proteosoma (Schreiber y Peter, 2014), por lo que en este caso puede que haya habido una compensación entre ambos sistemas de proteostasis. En consecuencia, y en contra de lo que observaron Bayod y colaboradores (2014), los niveles de ambas proteínas podrían no seguir siempre un patrón similar ante el efecto del ejercicio y el déficit parcial de autofagia.

Todos estos datos demostraron que, al igual que se observó en los resultados sobre los niveles de CSP $\alpha$ , cada región encefálica responde de forma diferente al ejercicio, posiblemente por su distinta función. Así mismo, es interesante destacar que, mientras el ejercicio solo influyó en los niveles basales de autofagia en la corteza cerebral, esta región encefálica es la única que no respondió al efecto del entrenamiento sobre los niveles de CSP $\alpha$  en los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup>. Cabría preguntarse si el entrenamiento de resistencia es capaz de compensar el déficit de autofagia que presentan estos

## Discusión

animales en la corteza encefálica no produciéndose la acumulación de CSP $\alpha$  y, por tanto, no detectándose la influencia directa del ejercicio en los niveles de esta chaperona.

Aunque parece que el ejercicio solo incrementó los niveles de LC3-II/LC3-I en la corteza cerebral, al analizar las posibles correlaciones entre la corteza cerebral y el resto de las regiones encefálicas encontramos resultados interesantes. En los Wt, 2 semanas de entrenamiento de resistencia podrían favorecer el incremento de los niveles de LC3-II/LC3-I en las tres regiones relacionadas con el movimiento, mientras que en los *atg4b*<sup>-/-</sup> el ejercicio no sería capaz de producir este efecto ni en el estriado ni en el cerebelo. Estos resultados estarían mostrando que el ejercicio de resistencia podría inducir la autofagia de forma coordinada en estas áreas durante las primeras semanas de entrenamiento, para producir la adaptación del encéfalo al ejercicio. Por el contrario, esto no ocurriría ante el déficit parcial de autofagia, lo que puede deberse a que ante el déficit de Atg4b el procesamiento de LC3 se encuentra afectado. Como vimos, los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> presentaban la acumulación de pro-LC3 en todas las regiones encefálicas estudiadas, y el ejercicio no pudo revertirlo. Tampoco observamos correlación positiva entre la corteza cerebral y el hipocampo, por lo que el ejercicio no favoreció la inducción de la autofagia en esta región cerebral. Esto podría ser una de las causas por las que el entrenamiento no pudo activar la neurogénesis en el DG de los *atg4b*<sup>-/-</sup>, lo que es posible que revirtiera también a nivel de comportamiento.

Sin embargo, no debemos olvidar que en los *atg4b*<sup>-/-</sup> el entrenamiento de resistencia no solo fue capaz de inducir la autofagia en la corteza cerebral, sino que también produjo beneficios a otros niveles, junto con el entrenamiento de fuerza. Ambos tipos de ejercicio pudieron mantener la capacidad física de estos animales, así como mejorar el estado de la plasticidad sináptica ante el déficit parcial de autofagia regulando los niveles de CSP $\alpha$ .

Una de las rutas moleculares por las que el ejercicio es capaz de inducir la autofagia es la vía de AMPK (Hawley et al., 2009; Ravikumar et al., 2010). Esta quinasa se activa en diferentes tejidos, como músculo y cerebro, cuando se realiza ejercicio de resistencia y se produce un déficit de ATP (Egan et al., 2010; Bayod et al., 2011; Marosi et al., 2012). No obstante, el número de trabajos que han estudiado el

efecto del ejercicio en los niveles de AMPK en el cerebro son escasos, centrándose principalmente en las regiones del hipocampo y la corteza cerebral (Bayod et al., 2011; Marosi et al., 2012), sin haberse estudiado previamente en otras áreas relacionadas con el movimiento, ni en modelos murinos con déficit de autofagia.

El ejercicio produjo cambios en los niveles de AMPK principalmente en los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup>. En los Wt, solo el entrenamiento de resistencia durante 14 semanas incrementó los niveles de fosfo-AMPK/AMPK total en el cerebelo. Debido a que no existen estudios previos que hayan analizado los niveles de esta quinasa en esta región encefálica, no pudimos comparar nuestros resultados con los de otros trabajos. Aun así, estos datos son muy interesantes, ya que todos los animales que entrenaron fueron sacrificados 48 horas después de la última sesión de entrenamiento, y se ha demostrado que los niveles de AMPK en músculo esquelético se incrementan durante la primera hora tras la realización de ejercicio aeróbico, recuperando prácticamente sus valores basales entre las 2,5 y las 3 horas (Egan et al., 2010; Vissing et al., 2011). Sin embargo, algunas regiones del encéfalo podrían tardar más tiempo. Marosi y colaboradores (2012) también mostraron que los niveles de AMPK estaban incrementados en el hipocampo de ratas tras 15 semanas de intervención en una cinta de correr, tomando las muestras 24 horas después de la última sesión de entrenamiento. Así mismo, Bayod y colaboradores (2011) mostraron en ratas que 36 semanas de intervención en una cinta de correr aumentaban los niveles de AMPK en el hipocampo y la corteza cerebral. Sin embargo, en su estudio no especificaron el tiempo que transcurrió desde la toma de muestras y la última sesión de entrenamiento, lo que dificulta la comparación de sus resultados con los nuestros en relación a la corteza cerebral. De hecho, esta podría ser una de las causas por las que encontramos diferencias entre ambos trabajos. Tomando nuestros datos en conjunto es interesante destacar que solo el cerebelo parece responder al ejercicio, lo que podría deberse a que, como ya se ha comentado, es una de las regiones encefálicas más sensibles, pudiendo responder de forma distinta al efecto del ejercicio de resistencia a largo plazo.

Con respecto al efecto del déficit de autofagia, tanto el ejercicio de fuerza como el de resistencia a corto plazo incrementaron los niveles de fosfo-AMPK/AMPK en la corteza cerebral de los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup>, mientras que solo el de resistencia a largo plazo los aumentó en el estriado y el cerebelo. Esto podría sugerir que el déficit parcial de

## Discusión

autofagia impide el restablecimiento completo de los niveles energéticos tras el entrenamiento de resistencia, permaneciendo los niveles de AMPK elevados 48 horas después de la última sesión de entrenamiento, para mantener una situación basal. Así mismo, y aunque AMPK está directamente ligada al ejercicio de resistencia, el entrenamiento de fuerza durante 2 semanas también produjo ese efecto en la corteza cerebral, un resultado similar al descrito por Luo y colaboradores (2013), en el que vieron que el entrenamiento de ratas durante 9 semanas en una escalera vertical aumentaba los niveles de fosfo-AMPK en el tejido muscular. Por otro lado, en contra de lo anteriormente descrito, los animales con déficit parcial de autofagia entrenados en resistencia durante 2 semanas presentaron menores niveles de AMPK en el cerebelo, por lo que parece que esta región encefálica se recuperaría energéticamente cuando los ratones son jóvenes, pero el déficit parcial de autofagia a largo plazo frenaría este efecto.

Este trabajo abre la puerta a conocer los efectos, no solo del ejercicio de resistencia sino también del de fuerza, revelando así el potencial del entrenamiento a distintos niveles. Nuestros resultados, obtenidos a partir de los ratones Wt, han demostrado que el ejercicio de fuerza podría mejorar la memoria a corto plazo, así como favorecer la maduración y la diferenciación de los progenitores neuronales. Además, es capaz de inducir la autofagia en la corteza cerebral. Esta es la primera investigación en la que se describen estos resultados.

Por otro lado, la autofagia cumple un papel fundamental, tanto en la mejora de la capacidad física, como garantizando el correcto funcionamiento del encéfalo. Hemos detectado que el entrenamiento de fuerza es capaz de frenar el deterioro de esta cualidad, causado por el déficit parcial de autofagia. Así mismo, a nivel encefálico, los ratones *atg4b*<sup>-/-</sup> tenían comprometida la diferenciación y maduración neuronal, además de presentar alteraciones en los niveles de la proteína presináptica CSP $\alpha$ . No obstante, el ejercicio fue capaz de revertir la posible acumulación de esta chaperona en el hipocampo y el cerebelo de estos animales, así como también de incrementar los niveles

del proceso autofágico en la corteza cerebral. Estos resultados aportan nuevos datos sobre la importancia del ejercicio de fuerza para la salud como estrategia para retrasar el envejecimiento.

Por lo tanto, es necesario continuar profundizando más sobre cada uno de los procesos aquí estudiados, para tratar de comprender el efecto del ejercicio y de la autofagia en los cambios funcionales, celulares y moleculares de las diferentes regiones encefálicas.



## **VII. CONCLUSIONES**

## Conclusiones

1. El déficit de Atg4d o Atg4b afecta a la conducta relacionada con la ansiedad y la memoria.
2. La autofagia es necesaria para las adaptaciones físicas al entrenamiento de fuerza, siendo dicho entrenamiento capaz de frenar la pérdida de esta cualidad.
3. La autofagia es necesaria para que el ejercicio induzca la neurogénesis, independientemente del modelo de entrenamiento.
4. El entrenamiento de fuerza es más eficaz que el de resistencia en la inducción de la neurogénesis en ratones de mediana edad.
5. El déficit parcial de autofagia produce la acumulación de la proteína presináptica CSP $\alpha$  en el estriado, el hipocampo y el cerebelo, siendo los ejercicios de fuerza y de resistencia capaces de modificar sus niveles.
6. La corteza cerebral es la única región encefálica de las estudiadas que responde al entrenamiento de fuerza y de resistencia, modificando el cociente LC3-II/LC3-I cuando la autofagia no está afectada. Sin embargo, el entrenamiento de resistencia, pero no el de fuerza, modifica el cociente en esta misma región cuando existe un déficit parcial de autofagia.

## Conclusiones

## **VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## Referencias bibliográficas

- Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, et al. Mice lacking  $\alpha$ -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 2000;25(1):239-52.
- Adegoke OA, Abdullahi A, Tavajohi-Fini P. mTORC1 and the regulation of skeletal muscle anabolism and mass. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2012;37(3):395-406.
- Agrotis A, Pengo N, Burden JJ, Ketteler R. Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells. *Autophagy*. 2019;15(6):976-997.
- Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev*. 2014;94(4):991-1026.
- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965;124(3):319-35.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*. 2007;163:3-22.
- Arias-Carrión O, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Colín R. Neurogenesis in the adult brain. *Rev Neurol*. 2007;44(9):541-50.
- Ashokan A, HeDGe A, Balasingham A, Mitra R. Housing environment influences stress-related hippocampal substrates and depression-like behavior. *Brain Res*. 2018;168:78-85.
- Atherton PJ, Phillips BE, Wilkinson DJ. Exercise and regulation of protein metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;135:75-98.
- Babaei P, Damirchi A, Mehdipoor M, Tehrani BS. Long term habitual exercise is associated with lower resting level of serum BDNF. *Neurosci Lett*. 2014;566:304-8.
- Bayod S, Del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Camins A, et al. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol*. 2011;111(5):1380-90.
- Bayod S, Del Valle J, Pelegri C, Vilaplana J, Canudas AM, Camins A, et al. Macroautophagic process was differentially modulated by long-term moderate exercise in rat brain and peripheral tissues. *J Physiol Pharmacol*. 2014;65(2):229-39.

## Referencias bibliográficas

- Bergmann O, Spalding KL, Frisén J. Adult neurogenesis in humans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(7):a018994.
- Birgisdottir ÁB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif – crucial for selective autophagy. *J Cell Sci.* 2013;126(15):3237-47.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 2005;171(4):603-14.
- Block MR, Glick BS, Wilcox CA, Wieland FT, Rothman JE. Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalysing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(21):7852-6.
- Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, et al. Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. *Cell Stem Cell.* 2018;22(4):589-99.
- Bolz L, Heigele S, Bischofberger J. Running improves pattern separation during novel object recognition. *Brain Plast.* 2015;1(1):129-141.
- Bruusgaard JC, Johansen IB, Egner IM, Rana ZA, Gundersen K. Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15111-6.
- Buchner E, Gundersen CB. The DnaJ-like cysteine string protein and exocytotic neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 1997;20(5):223-7.
- Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron.* 2002;35(4):625-41.
- Burgoyne RD, Morgan A. Cysteine string protein (CSP) and its role in preventing neurodegeneration. *Semin Cell Biol.* 2015;40:153-9.
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC.  $\alpha$ -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science.* 2010;329(5999):1663-7.
- Cai Z, Zeng W, Tao K, E Z, Wang B, Yang Q. Chaperone-mediated autophagy: roles in neuroprotection. *Neurosci Bull.* 2015;31(4):452-8.

- Calvo-Garrido J, Maffezzini C, Schober FA, Clemente P, Uhlin E, Kele M, et al. SQSTM1/p62-directed metabolic reprogramming is essential for normal neurodifferentiation. 2019;12(4):696-711.
- Caputo C, Jaffe E. Transmisión sináptica. En: de León-Fraga J, Romero-Hernández G, Bernal-Pérez M, eds. Fisiología humana. 4ª ed. México, D. F: McGraw Hill; 2010. p. 76-94.
- Cardinalli DP. Componentes del sistema nervioso. En: de León-Fraga J, Romero-Hernández G, Bernal-Pérez M, eds. Fisiología humana. 4ª ed. México, D. F: McGraw Hill; 2010. p. 53-61.
- Cassilhas RC, Lee KS, Fernandes J, Oliveira MG, Tufik S, Meeusen R, et al. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. *Neuroscience*. 2012;202:309-17.
- Castilla-Ortega E, Rosell-Valle C, Pedraza C, Rodríguez de Fonseca F, Estivill-Torrús G, Santín LJ. Voluntary exercise followed by chronic stress strikingly increases mature adult-born hippocampal neurons and prevents stress-induced deficits in ‘what–when–where’ memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2014;109:62-73.
- Chandra S, Fornai F, Kwon HB, Yazdani U, Atasoy D, Liu X, et al. Double-knockout mice for  $\alpha$ - and  $\beta$ -synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(41):14966-71.
- Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC.  $\alpha$ -Synuclein cooperates with CSP $\alpha$  in preventing neurodegeneration. *Cell*. 2005;123(3):383-96.
- Chowdhury M, Enenkel C. Intracellular Dynamics of the Ubiquitin-Proteasome-System. *F1000Res*. 2015;4:367.
- Clary DO, Griff IC, Rothman JE. SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell*. 1990;61(4):709-21.
- Cohen SJ, Stackman RW. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*. 2015;285:105-17.
- Combes A, Dekerle J, Webborn N, Watt P, Bougault V, Daussin FN. Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMKII phosphorylation in human skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2015;3(9):e12462.

## Referencias bibliográficas

- Cookson MR.  $\alpha$ -Synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener.* 2009;4:9.
- Cuervo AM., Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 2014;24:92-104.
- Dancourt J, Melia TJ. Lipidation of the autophagy proteins LC3 and GABARAP is a membrane-curvature dependent process. *Autophagy.* 2014;10(8):1470-1.
- de Lima MNM, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schröder N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res.* 2005;156:139-43.
- DeVito LM, Eichenbaum H. Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the “what-where-when” components of episodic-like memory in mice. 2010;215(2):318-25.
- Diao J, Liu R, Rong Y, Zhao M, Zhang J, Lai Y, et al. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature.* 2015;520(7548):563-6.
- Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 Conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12–5–16L1. *Mol Cell.* 2014;55(2):238-52.
- Doyon J, Bellec P, Amsel R, Penhune V, Monchi O, Carrier J, et al. Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning. *Behav Brain Res.* 2009;199(1):61-75.
- Egan B, Carson BP, Garcia-Roves PM, Chibalin AV, Sarsfield FM, Barron N, et al. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2010;588(Pt 10):1779-90.
- Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.* 2011;331(6061):456-61.
- Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, et al. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell.* 2011;8(5):566-79.

- Encinas JM, Sierra A. Neural stem cell deforestation as the main force driving the age-related decline in adult hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res.* 2012;227(2):433-9.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4(11):1313-7.
- Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(7):3017-22.
- Erickson KI, Hillman CH, Kramer AF. Physical activity, brain, and cognition. *Curr Opin Behav Sci.* 2015;4:27-32.
- Eskelinen EL, Reggiori F, Baba M, Kovács AL, Seglen PO. Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy.* 2011;7:935-56.
- Fabel K, Wolf SA, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Kempermann G. Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Front Neurosci.* 2009;3:1-7.
- Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron.* 2010;65(1):7-19.
- Fernández-Chacón R, Wölfel M, Nishimune H, Tabares L, Schmitz F, Castellano-Muñoz M, et al. The synaptic vesicle protein CSP $\alpha$  prevents presynaptic degeneration. *Neuron.* 2004;42(2):237-51.
- Ferraro E, Giammarioli AM, Chiandotto S, Spoletini I, Rosano G. Exercise-induced skeletal muscle remodelling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(1):154-76.
- Ferreira AF, Real CC, Rodrigues AC, Alves AS, Britto LR. Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain. *Brain Res.* 2010;1361:31-42.
- Feter N, Spanevello RM, Soares MSP, Spohr L, Pedra NS, Bona NP, et al. How does physical activity and different models of exercise training affect oxidative parameters and memory? *Physiol Behav.* 2019;201:42-52.

## Referencias bibliográficas

- Firth J, Stubbs B, Vancampfort D, Schuch F, Lagopoulos J, Rosenbaum S, et al. Effect of aerobic exercise on hippocampal volume in humans: A systematic review and meta-analysis. *Neuroimage*. 2018;166:230-8.
- Fiuza-Luces C, Garatachea N, Berger NA, Lucia A. Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(5):330-58.
- Friedman LG, Lachenmayer ML, Wang J, He L, Poulouse SM, Komatsu M, et al. Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of  $\alpha$ -synuclein and LRRK2 in the brain. *J Neurosci*. 2012;32(22):7585-93.
- Fry CS, Drummond MJ, Glynn EL, Dickinson JM, Gundermann DM, Timmerman KL, et al. Skeletal muscle autophagy and protein breakdown following resistance exercise are similar in younger and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013;68(5):599-607.
- Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):698-708.
- Galea JM, Vazquez A, Pasricha N, de Xivry JJ, Celnik P. Dissociating the roles of the cerebellum and motor cortex during adaptive learning: the motor cortex retains what the cerebellum learns. *Cereb Cortex*. 2011;21(8):1761-70.
- Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*. 2017;36(13):1811-36.
- Garatachea N, Pareja-Galeano H, Sanchis-Gomar F, Santos-Lozano A, Fiuza-Luces C, Morán M, et al. Exercise attenuates the major hallmarks of aging. *Rejuvenation Res*. 2015;18(1):57-89.
- Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(7):1334-59.
- Garcia PC, Real CC, Ferreira AF, Alouche SR, Britto LR, Pires RS. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. *Brain Res*. 2012;1456:36-48.
- George JM. The synucleins. *Genome Biol*. 2002;3(1): reviews3002.1-3002.6.

- Glatigny M, Moriceau S, Rivagorda M, Ramos-Brossier M, Nascimbeni AC, Lante F, et al. Autophagy is required for memory formation and reverses age-related memory decline. *Curr Biol*. 2019;29(3):435-48.
- Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(9):607-15.
- Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*. 2007;8:481-8.
- Grazioli E, Dimauro I, Mercatelli N, Wang G, Pitsiladis Y, Di Luigi L, et al. Physical activity in the prevention of human diseases: role of epigenetic modifications. *BMC Genomics*. 2017;18(Suppl 8):802.
- Grumati P, Coletto L, Schiavinato A, Castagnaro S, Bertaggia E, Sandri M, et al. Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. *Autophagy*. 2011;7(12):1415-23.
- Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2011;86(3):564-600.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008;30(2):214-26.
- Halloran J, Hussong SA, Burbank R, Podlitskaya N, Fischer KE, Sloane LB, et al. Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin modulates cognitive and non-cognitive components of behavior throughout lifespan in mice. *Neuroscience*. 2015;223:102-13.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441(7095):885-9.
- Hawley AJ. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009;34(3):355-61.
- Hawley AJ, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell*. 2014;159(4):738-49.

## Referencias bibliográficas

- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Südhof TC, et al. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* 1994;13(21):5051-61.
- Hayashi T, Yamasaki S, Nauenburg S, Binz T, Niemann H. Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex in vitro. *EMBO J.* 1995;14(10):2317-25.
- He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature.* 2012a;481(7382):511-5.
- He C, Sumpter R, Levine B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy.* 2012b;8(10):1548-51.
- Hornberger TA Jr, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol.* 2004;29(1):16-31.
- Hung YH, Linden MA, Gordon A, Rector RS, Buhman KK. Endurance exercise training programs intestinal lipid metabolism in a rat model of obesity and type 2 diabetes. *Physiol Rep.* 2015;3(1):e12232.
- Hwang DJ, Koo JH, Kwon KC, Choi DH, Shin SD, Jeong JH, et al. Neuroprotective effect of treadmill exercise possibly via regulation of lysosomal degradation molecules in mice with pharmacologically induced Parkinson's disease. *J Physiol Sci.* 2018;68(5):707-16.
- Jiang P, Dang RL, Li HD, Zhang LH, Zhu WY, Xue Y, et al. The impacts of swimming exercise on hippocampal expression of neurotrophic factors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:729827.
- Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy.* 2011;7(3):279-96.
- Kauffman KJ, Yu S, Jin J, Mugo B, Nguyen N, O'Brien A, et al. Delipidation of mammalian Atg8-family proteins by each of the four ATG4 proteases. *Autophagy.* 2018;14(6):992-1010.
- Kempermann G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci.* 2002;22(3):635-8.

- Kempermann G. New neurons for ‘survival of the fittest’. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(10):727-36.
- Kempermann G. Off the beaten track: new neurons in the adult human striatum. *Cell.* 2014;156(5):870-1.
- Kempermann G, Fabel K, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Garthe A, et al. Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. *Front Neurosci.* 2010;4:1-9.
- Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, et al. Human adult neurogenesis: evidence and remaining questions. *Cell Stem Cell.* 2018;23(1):25-30.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 2004;27(8):447-52.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(19):10409-14.
- Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(9):a018812.
- Kim SG, Buel GR, Blenis J. Nutrient regulation of the complex 1 signaling pathway. *Mol Cell.* 2013;35(6):463-73.
- Kimball SR. Integration of signals generated by nutrients, hormones, and exercise in skeletal muscle. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(1):237S-42S.
- Kleemeyer MM, Kühn S, Prindle J, Bodammer NC, Brechtel L, Garthe A, et al. Changes in fitness are associated with changes in hippocampal microstructure and hippocampal volume among older adults. *Neuroimage.* 2016;131:155-61.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1-222.
- Klionsky DJ, Eskelinen EL, Deretic V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. *Autophagy.* 2014;10(4):549-51.

## Referencias bibliográficas

- Kohara K, Pignatelli M, Rivest AJ, Jung HY, Kitamura T, Suh J, et al. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat Neurosci.* 2014;17(2):269-79.
- Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1374-8.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 2006;441(7095):880-4.
- Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL Jr, Iwata J, Kominami E, et al. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(36):14489-94.
- Koo JH, Cho JY. Treadmill exercise attenuates  $\alpha$ -synuclein levels by promoting mitochondrial function and autophagy possibly via SIRT in the chronic MPTP/P-induced mouse model of parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2017;32(3):473-486.
- Korolchuk VI, Menzies FM., Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* 2009;584(7):1393-8.
- Kosaki Y, Lin TC, Horne MR, Pearce JM, Gilroy KE. The role of the hippocampus in passive and active spatial learning. *Hippocampus.* 2014;24(12):1633-52.
- Krahe TE, Medina AE, Lantz CL, Filgueiras CC. Hyperactivity and depression-like traits in Bax KO mice. *Brain Res.* 2015;1625:246-54.
- Kronenberg G, Bick-Sander A, Bunka E, Wolf C, Ehninger D, Kempermann G. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging.* 2006;27(10):1505-13.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 2004;432(7020):1032-6.
- Kuma A, Komatsu M, Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy.* 2017;13(10):1619-28.

- Kwon I, Jang Y, Cho JY, Jang YC, Lee Y. Long-term resistance exercise-induced muscular hypertrophy is associated with autophagy modulation in rats. *J Physiol Sci.* 2018;68(3):269-80.
- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(12):759-74.
- Licht T, Keshet E. The vascular niche in adult neurogenesis. *Mech Dev.* 2015;138:56-62.
- Lin TW, Chen SJ, Huang TY, Chang CY, Chuang JI, Wu FS, et al. Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance. *Neurobiol Learn Mem.* 2012;97(1):140-7.
- Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005;1(6):361-70.
- Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, et al. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J.* 2013;27(10):4184-93.
- Liu PZ, Nusslock R. Exercise-mediated neurogenesis in the hippocampus via BDNF. *Front Neurosci.* 2018;12(52):1-6.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(3):179-93.
- Llorens-Martín M, Jurado-Arjona J, Avila J, Hernández F. Novel connection between newborn granule neurons and the hippocampal CA2 field. *Exp Neurol.* 2015;263:285-92.
- Llorens-Martín M, Jurado-Arjona J, Bolós M, Pallas-Bazarra N, Ávila J. Forced swimming sabotages the morphological and synaptic maturation of newborn granule neurons and triggers a unique pro-inflammatory milieu in the hippocampus. *Brain Behav Immun.* 2016;53:242-54.
- Logan T, Bendor J, Toupin C, Thorn K, Edwards RH.  $\alpha$ -Synuclein promotes dilation of the exocytotic fusion pore. *Nat Neurosci.* 2017;20(5):681-9.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.

## Referencias bibliográficas

- López-Otín C, Galluzzi L, Freije JMP, Madeo F, Kroemer G. Metabolic control of longevity. *Cell*. 2016;166(4):802-21.
- Loprinzi PD, Frith E, Edwards MK. Resistance exercise and episodic memory function: a systematic review. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2018; Ene 24. [Prepublicación electrónica] PMID 29368393.
- Lou SJ, Liu JY, Chang H, Chen PJ. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. *Brain Res*. 2008;1210:48-55.
- Lo Verso F, Carnio S, Vainshtein A, Sandri M. Autophagy is not required to sustain exercise and PRKAA1/AMPK activity but is important to prevent mitochondrial damage during physical activity. *Autophagy*. 2014;10(11):1889-94.
- Lub S, Maes K, Menu E, De Bruyne E, Vanderkerken K, Van Valckenborgh E. Novel strategies to target the ubiquitin proteasome system in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2016;7(6):6521-37.
- Lumb A. Diabetes and exercise. *Clin Med (Lond)*. 2014;14(6):673-6.
- Luo L, Lu AM, Wang Y, Hong A, Chen Y, Hu J, et al. Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. *Exp Gerontol*. 2013;48(4):427-36.
- Maass A, Düzel S, Brigadski T, Goerke M, Becke A, Sobieray U, et al. Relationships of peripheral IGF-1, VEGF and BDNF levels to exercise-related changes in memory, hippocampal perfusion and volumes in older adults. *Neuroimage*. 2016;131:142-54.
- Mariño G, Fernández AF, Cabrera S, Lundberg YW, Cabanillas R, Rodríguez F, et al. Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2331-44.
- Marosi K, Bori Z, Hart N, Sárga L, Koltai E, Radák Z, et al. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. *Neuroscience*. 2012;226:21-8.
- Martin-Rincon M, Morales-Alamo D, Calbet JAL. Exercise-mediated modulation of autophagy in skeletal muscle. *Scand J Med Sci Sports*. 2018;28(3):772-81.
- Martínez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol*. 2007;6(4):352-61.

- Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, et al. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab.* 2009;10(6):507-15.
- Menzies FM, Fleming A, Rubinsztein DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(6):345-57.
- Messier B, Leblond CP, Smart I. Presence of DNA synthesis and mitosis in the brain of young adult mice. *Exp Cell Res.* 1958;14(1):224-6.
- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy.* 2011;7(7):673-82.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011a;147(4):728-41.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011b;27:107-32.
- Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2019;25(4):554-60.
- Morgan JA, Singhal G, Corrigan F, Jaehne EJ, Jawahar MC, Baune BT. The effects of aerobic exercise on depression-like, anxiety-like, and cognition-like behaviours over the healthy adult lifespan of C57BL/6 mice. *Behav Brain Res.* 2018;337:193-203.
- Morris JN, Heady JA, Raffle PA, Roberts CG, Parks JW. Coronary heart-disease and physical activity of work. *Lancet.* 1953;265(6796):1111-20.
- Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell.* 2009;137(6):1001-4.
- Moscat J, Diaz-Meco MT. Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections. *Cell.* 2011;147(4):724-7.
- Mosti MP, Kaehler N, Stunes AK, Hoff J, Syversen U. Maximal strength training in postmenopausal women with osteoporosis or osteopenia. *J Strength Cond Res.* 2013;27(10):2879-86.

## Referencias bibliográficas

- 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(11):793-801.
- Neufer PD, Bamman MM, Muoio DM, Bouchard C, Cooper DM, Goodpaster BH, et al. Understanding the cellular and molecular mechanisms of physical activity-induced health benefits. *Cell Metab.* 2015;22(1):4-11.
- Nie J, Yang X. Modulation of synaptic plasticity by exercise training as a basis for ischemic stroke rehabilitation. *Cell Mol Neurobiol.* 2017;37(1):5-16.
- Ninkina N, Papachroni K, Robertson DC, Schmidt O, Delaney L, O'Neill F, et al. Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene. *Mol Cell Biol.* 2003;23(22):8233-45.
- Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2013;19(8):983-97.
- Noda NN, Kumeta H, Nakatogawa H, Satoo K, Adachi W, Ishii J, et al. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells.* 2008;13(12):1211-8.
- Nokia MS, Lensu S, Ahtiainen JP, Johansson PP, Koch LG, Britton SL, et al. Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. *J Physiol.* 2016;594(7):1855-73.
- Northey JM, Cherbuin N, Pumpa KL, Smee DJ, Rattray B. Exercise interventions for cognitive function in adults older than 50: a systematic review with meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2018;52(3):154-60.
- Novaes-Gomes FG, Fernandes J, Vannucci-Campos D, Cassilhas RC, Viana GM, D'Almeida V, et al. The beneficial effects of strength exercise on hippocampal cell proliferation and apoptotic signaling is impaired by anabolic androgenic steroids. *Psychoneuroendocrinology.* 2016;50:106-17.
- Novus Biologicals [Internet]. Centennial: Novus Biologicals; c2016 [citada el 08/04/2019]. FAQs – Autophagy and LC3. Disponible en: <https://www.novusbio.com/support/faqs-autophagy-and-lc3>
- O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res.* 2007;176(2):362-6.

- O'Neill J, Boccara CN, Stella F, Schoenenberger P, Csicsvari J. Superficial layers of the medial entorhinal cortex replay independently of the hippocampus. 2017;355(6321):184-8.
- Organización Mundial de la Salud – OMS [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; c2010 [citada el 24/01/2019]. Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud. Disponible en: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/pa/es/>
- Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(8):457-65.
- Pedersen BK, Pedersen M, Krabbe KS, Bruunsgaard H, Matthews VB, Febbraio MA. Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. *Exp Physiol.* 2009;94(12):1153-60.
- Poirier MA, Hao JC, Malkus PN, Chan C, Moore MF, King DS, et al. Protease resistance of syntaxin.SNAP-25.VAMP complexes. Implications for assembly and structure. *J Biol Chem.* 1998;273(18):11370-7.
- Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, et al. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR coactivator-1. *Mol Cell.* 2001;8(5):971-82.
- Raben N, Hill V, Shea L, Takikita S, Baum R, Mizushima N, et al. Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Hum Mol Genet.* 2008;17(24):3897-908.
- Ramsbottom R, Currie J, Gilder M. Relationships between components of physical activity, cardiorespiratory fitness, cardiac autonomic health, and brain-derived neurotrophic factor. *J Sports Sci.* 2010;28(8):843-9.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, García-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiology Rev.* 2010;90(4),1383-435.
- Real Academia Nacional de Medicina – RANM [Internet]. Madrid: Real Academia Nacional de Medicina; c2011 [citada el 20/01/2019]. Diccionario de Términos Médicos. Disponible en: <https://dtme.ranm.es/index.aspx>
- Redolar-Ripoll D. El cerebro estresado. 1ª ed. Barcelona: Editorial UOC; 2011.

## Referencias bibliográficas

- Reggiori F, Ungermann C. Autophagosome Maturation and Fusion. *J Mol Biol.* 2017;429(4):486-96.
- Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S10-7.
- Rowe GC, Safdar A, Arany Z. Running forward: new frontiers in endurance exercise biology. *Circulation.* 2015;129(7):798-810.
- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature.* 2011;472(7344):466-70.
- Sakalem ME, Seidenbecher T, Zhang M, Saffari R, Kravchenko M, Wördemann S, et al. Environmental enrichment and physical exercise revert behavioral and electrophysiological impairments caused by reduced adult neurogenesis. *Hippocampus.* 2017;27(1):36-51.
- Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KM. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J.* 2016;30(12):3961-78.
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature.* 1992;359(6398):832-5.
- Schiavo G, Rossetto O, Catsicas S, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Benfenati F, et al. Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *J Biol Chem.* 1993a;268(32):23784-7.
- Schiavo G, Santucci A, DasGupta BR, Mehta PP, Jontes J, Benfenati F, et al. Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett.* 1993b;335(1):99-103.
- Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res.* 2012;226(1):56-65.
- Schreiber A, Peter M. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(1):163-81.
- Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behaviour in Mice. *J Vis Exp.* 2015;(96):e52434.

- Shabek N, Herman-Bachinsky Y, Buchsbaum S, Lewinson O, Haj-Yahya M, Hejjaoui M, et al. The size of the proteosomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation. *Mol Cell*. 2012;48(1):87-97.
- Sharma M, Burré J, Südhof TC. CSP $\alpha$  promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nat Cell Biol*. 2011;13(1):30-9.
- Shen DN, Zhang LH, Wei EQ, Yang Y. Autophagy in synaptic development, function, and pathology. *Neurosci Bull*. 2015;31(4):416-26.
- Snell RS. *Neuroanatomía clínica*. 6<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- Soga K, Masaki H, Gerber M, Ludyga S. Acute and long-term effects of resistance training on executive function. *J Cogn Enhanc*. 2018;2(2):200-7.
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 1993;362(6418):318-24.
- Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*. 2012;44(2):89-98.
- Soontornniyomkij V, Risbrough VB, Young JW, Soontornniyomkij B, Jeste DV, Achim CL. Increased hippocampal accumulation of autophagosomes predicts short-term recognition memory impairment in aged mice. *Age (Dordr)*. 2012;34(2):305-16.
- Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*. 2018;555(7696):377-81.
- Steiner B, Zurborg S, Hörster H, Fabel K, Kempermann G. Differential 24 h responsiveness of Prox1-expressing precursor cells in adult hippocampal neurogenesis to physical activity, environmental enrichment, and kainic acid-induced seizures. *Neuroscience*. 2008;154(2):521-9.
- Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(10):655-69.
- Strappazon F, Vietri-Rudan M, Campello S, Nazio F, Florenzano F, Fimia GM, et al. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *EMBO J*. 2011;30(7):1195-208.

## Referencias bibliográficas

- Südhof TC. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*. 2013;80(3):675-90.
- Südhof TC, Rizo J. Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(12):a005637.
- Suijo K, Inoue S, Ohya Y, Odagiri Y, Takamiya T, Ishibashi H, et al. Resistance exercise enhances cognitive function in mouse. *Int J Sports Med*. 2013;34(4):368-75.
- Thompson T, Grabowski-Boase L, Tarantino LM. Prototypical anxiolytics do not reduce anxiety-like behavior in the open field in C57BL/6J mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2015;133:7-17.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Alemán I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 2001;21(5):1628-34.
- Tsai SF, Ku NW, Wang TF, Yang YH, Shih YH, Wu SY, et al. Long-term moderate exercise rescues age-related decline in hippocampal neuronal complexity and memory. *Gerontology*. 2018;64(6):551-61.
- Vainshtein A, Hood DA. The regulation of autophagy during exercise in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2016;120(6):664-73.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999;2(3):266-70.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*. 2005;25(38):8680-5.
- Vann SD, Albasser MM. Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2011;21(3):440-5.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*. 2004;20(10):2580-90.
- Vijayan V, Verstreken P. Autophagy in the presynaptic compartment in health and disease. *J Cell Biol*. 2017;126(7):1895-906.

- Vina J, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello V, Gomez-Cabrera MC. Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. *Br J Pharmacol*. 2012;167(1):1-12.
- Vissing K, McGee S, Farup J, Kjølhed T, Vendelbo M, Jessen N. Differentiated mTOR but not AMPK signaling after strength vs endurance exercise in training-accustomed individuals. *Scand J Med Sci Sports*. 2013;23(3):355-66.
- Vivona S, Cipriano DJ, O'Leary S, Li YH, Fenn TD, Brunger AT. Disassembly of all SNARE complexes by *N*-Ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) is initiated by a conserved 1:1 interaction between  $\alpha$ -soluble NSF attachment protein (SNAP) and SNARE complex. *J Biol Chem*. 2013;288(34):24984-91.
- von Bohlen Und Halbach O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 2011;345(1):1-19.
- von Bohlen Und Halbach O, von Bohlen Und Halbach V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *Cell Tissue Res*. 2018;373(3):729-41.
- Watson K, Baar K. mTOR and the health benefits of exercise. *Semin Cell Dev Bio*. 2014;36:130-9.
- White Z, Terrill J, White RB, McMahon C, Sheard P, Grounds MD, et al. Voluntary resistance wheel exercise from mid-life prevents sarcopenia and increases markers of mitochondrial function and autophagy in muscles of old male and female C57BL/6J mice. *Skelet Muscle*. 2016;6(1):45.
- Wilke J, Giesche F, Klier K, Vogt L, Herrmann E, Banzer W. Acute effects of resistance exercise on cognitive function in healthy adults: a systematic review with multilevel meta-analysis. *Sports Med*. 2019;49(6):905-16.
- Wirth M, Joachim J, Tooze SA. Autophagosome formation—the role of ULK1 and Beclin1–PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(5):301-9.
- Wu CW, Chang YT, Yu L, Chen HI, Jen CJ, Wu SY, et al. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J Appl Physiol*. 2008;105(5):1585-94.

## Referencias bibliográficas

- Xi Y, Dhaliwal JS, Ceizar M, Vaculik M, Kumar KL, Lagace DC. Knockout of Atg5 delays the maturation and reduces the survival of adult-generated neurons in the hippocampus. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2127.
- Xie YW, Li ZY, Du J, Chen Y, Chen BY, Wang TT, et al. Visualization of rostral migratory stream in the developing rat brain by in vivo electroporation. *Cell Mol Neurobiol.* 2018;38(5):1067-79.
- Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L.  $\alpha$ -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Mol Neurobiol.* 2013;47(2):537-51.
- Yamamoto A, Yue Z. Autophagy and its normal and pathogenic states in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2014;37:55-78.
- Yang TT, Lo CP, Tsai PS, Wu SY, Wang TF, Chen YW, et al. Aging and exercise affect hippocampal neurogenesis via different mechanisms. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132152.
- Ybe JA, Wakeham DE, Brodsky FM, Hwang PK. Molecular structures of proteins involved in vesicle fusion. *Traffic.* 2000;1(6):474-9.
- Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms. *Autophagy.* 2018;14(2):207-15.
- Yuan TF, Arias-Carrión O. Adult neurogenesis in the hypothalamus: evidence, functions and implications. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2011;10(4):433-9.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(25):15077-82.
- Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, et al. p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol.* 2002;160(1):255-63.
- Zhai B, Shang X, Fu J, Li F, Zhang T. Rapamycin relieves anxious emotion and synaptic plasticity deficits induced by hindlimb unloading in mice. *Neurosci Lett.* 2018;677:44-8.
- Zhao Y, Liu L-J, Wang C, Li S-X. Swimming exercise may not alleviate the depressive-like behaviors and circadian alterations of neuroendocrine induced by chronic unpredictable mild stress in rats. *Neurol Psychiatry Brai Res.* 2012;18(4):202-7.

Zhao M, Wu S, Zhou Q, Vivona S, Cipriano DJ, Cheng Y, et al. Mechanistic insights into the recycling machine of the SNARE complex. *Nature*. 2015;518(7537):61-7.

## Referencias bibliográficas

## **IX. ANEXOS**



## Anexo 1. Protocolos de entrenamiento aplicados

Tabla suplementaria 1. Protocolo de entrenamiento de fuerza durante 2 semanas.

Día	Sesión	Escalones	Altura (cm)	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Serie 5	Serie 6	Serie 7
L	1	600	900	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
				Escalones	10	10	10	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80
M	2	900	1350	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	15
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80
X	3	820	1230	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	10	10
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	85	85
J	4	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	15
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80
V	5	750	1125	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	15	15	15
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85
S										
D										
L	6	850	1275	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	15	15	15
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85
M	7	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	15
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80
X	8	850	1275	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	20	20	20
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85
J	9	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	15
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80
V	10	850	1275	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	20	20	20
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85
S										
D										

Anexos

L				Test de evaluación final de fuerza							
M				Test final de comportamiento							
				Test de evaluación final de fuerza							
X				Test final de comportamiento							
J				Test final de comportamiento							
				Test de evaluación final de resistencia							
V				Test de evaluación final de resistencia							
S	11	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80	80
D											

Tabla suplementaria 2. Protocolo de entrenamiento de resistencia durante 2 semanas.

Día	Sesión	Tt (min)	Dt (m)	Vm (cm/s)	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Serie 5	Serie 6	
L	1	45	417	15,4	Tiempo (min)	5	5	15	20		
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10		
M	2	45	417	15,4	Tiempo (min)	5	5	15	20		
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10		
X	3	45	417	15,4	Tiempo (min)	5	5	15	20		
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10		
J	4	50	472,5	15,8	Tiempo (min)	5	5	15	25		
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10		
V	5	50	481,5	16,1	Tiempo (min)	5	5	15	15	10	
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5	20	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	
S											
D											
L	6	55	606	18,4	Tiempo (min)	5	5	10	10	10	15
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5	20	25
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10
M	7	55	606	18,4	Tiempo (min)	5	5	10	10	10	15
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5	20	25
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10
X	8	55	606	18,4	Tiempo (min)	5	5	10	10	10	15
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5	20	25
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10
J	9	55	615	18,6	Tiempo (min)	5	5	10	20	15	
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	20	25	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	
V	10	60	690	19,2	Tiempo (min)	5	5	10	20	20	
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	20	25	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	
S											
D											

Anexos

L					Test de evaluación final de fuerza
M					Test final de comportamiento
					Test de evaluación final de fuerza
X					Test final de comportamiento
J					Test final de comportamiento
					Test de evaluación final de resistencia
V					Test de evaluación final de resistencia
S	11	55	615	18,6	<b>Tiempo (min)</b> 5      5      10      20      15 <b>Velocidad (cm/s)</b> 10      10      15      20      25 <b>Inclinación (grados)</b> 0      10      10      10      10
D					

Tt (tiempo total), Dt (distancia total) y Vm (velocidad media).

Tabla suplementaria 3. Protocolo de entrenamiento de fuerza durante 14 semanas.

Día	Sesión	Escalones	Altura (cm)	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Serie 5	Serie 6	Serie 7	Serie 8	Serie 9	Serie 10	Serie 11
L														
M	1	900	1350	Repeticiones	10	10	10	10	10	10				
				Escalones	15	15	15	15	15	15				
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0				
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80				
X	2	800	1200	Repeticiones	10	10	10	10	10	10				
				Escalones	15	15	15	15	10	10				
				Carga (g)	0	0	0	0	0	15	15			
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	85	85			
J	3	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15			
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0			
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80	80			
V	4	750	1125	Repeticiones	10	10	10	10	10	10				
				Escalones	15	15	15	10	10	10				
				Carga (g)	0	0	0	15	15	15				
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85				
S														
D														
L	5	850	1275	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10			
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0			
				Inclinación (grados)	90	85	85	85	85	85	85			
M	6	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15			
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0			
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80	80			
X	7	850	1275	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10			
				Carga (g)	0	0	0	20	20	20	20			
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85			
J	8	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15			
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0			
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80	80			
V	9	850	1275	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10			
				Carga (g)	0	0	0	20	20	20	20			
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85			
S														
D														
L	10	850	1275	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10			
				Carga (g)	0	0	0	25	25	25	25			
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85			
M	11	1200	1800	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10		
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15	15		
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0	0		
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80	80	80		
X	12	950	1425	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10		
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10	10		
				Carga (g)	0	0	0	25	25	25	25	25		
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85		
J	13	1200	1800	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10		
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15	15		
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0	0		
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80	80	80		
V	14	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10	10	10	
				Carga (g)	0	0	0	25	25	25	25	25	25	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	
S														
D														

# Anexos

L	15	2000	3000	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10	10	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	25	25	25	25	25	25	25	25
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85
M	16	900	1350	Repeticiones	10	10	10	10	10	10					
				Escalones	15	15	15	15	15	15					
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0					
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80					
X	17	850	1275	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10				
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10				
				Carga (g)	0	0	0	25	25	25	25				
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85				
J	18	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10				
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15				
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0				
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85				
V	19	950	1425	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10	10			
				Carga (g)	0	0	0	25	25	25	25	25			
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85			
S															
D															
L	20	2100	3150	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	
				Carga (g)	0	0	0	10	10	25	25	25	25	25	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	
M	21	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10				
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15				
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0				
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85				
X	22	1150	1725	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10		
				Carga (g)	0	0	0	10	10	25	25	25	25		
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85		
J	23	900	1350	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10				
				Escalones	15	15	15	15	15	15					
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0					
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80					
V	24	1150	1725	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10		
				Carga (g)	0	0	0	10	10	25	25	25	25		
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85		
S															
D															
L	25	1150	1725	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10		
				Carga (g)	0	0	0	10	10	25	25	25	25		
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85		
M	26	1250	1875	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10				
				Escalones	15	15	15	20	20	20	20				
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0				
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85				
X	27	2100	3150	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	
				Carga (g)	0	0	0	10	10	25	25	25	25	25	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	
J	28	900	1350	Repeticiones	10	10	10	10	10	10					
				Escalones	15	15	15	15	15	15					
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0					
				Inclinación (grados)	90	85	80	80	80	80					
V	29	2100	3150	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	
				Carga (g)	0	0	0	10	10	25	25	25	25	10	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	
S															
D															

L	30	2100	3150	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	25	25	25	25	25	25	25
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85	85
M	31	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10					
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15					
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0					
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85					
X	32	1150	1725	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10			
				Carga (g)	0	0	0	10	10	30	30	30	30			
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85			
J	33	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10					
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15					
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0					
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85					
V	34	2100	3150	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	10	
				Carga (g)	0	0	0	10	10	30	30	30	30	30	30	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85	
S																
D																
L	35	2100	3150	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	10	
				Carga (g)	0	0	0	10	10	30	30	30	30	30	30	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85	
M	36	1350	2025	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15	15	15			
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85			
X	37	1150	1725	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10			
				Carga (g)	0	0	0	10	10	30	30	30	30			
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85			
J	38	1450	2175	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10					
				Escalones	15	15	15	25	25	25	25					
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0					
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85					
V	39	2100	3150	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	10	
				Carga (g)	0	0	0	10	10	30	30	30	30	30	30	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85	
S																
D																
L	40	2100	3150	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	10	
				Carga (g)	0	0	0	10	10	30	30	30	30	30	30	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85	
M	41	1650	2475	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	20	20	20	20	20	20			
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85			
X	42	2100	3150	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	10	
				Carga (g)	0	0	0	10	10	35	35	35	35	35	35	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85	
J	43	3550	5325	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
				Escalones	15	15	15	20	20	20	20	20	20	20	20	
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85	
V	44	1150	1725	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10			
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10			
				Carga (g)	0	0	0	10	10	35	35	35	35			
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85			
S																
D																

# Anexos

L	45	1050	1575	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15	
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0	
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	
M												
X	46	950	1425	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	10	10	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	20	20	20
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85
J												
V	47	2100	3150	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	35	35	35
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85
S												
D												
L	48	1250	1875	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	35	35	35
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85
M	49	1250	1875	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	20	20	20
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85
X												
J	50	1250	1875	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	20	20	20
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85
V	51	1250	1875	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	35	35	35
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85
S												
D												
L	52	1250	1875	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	35	35	35
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85
M	53	1250	1875	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	25	25	25
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85
X												
J	54	1250	1875	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	25	25	25
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85
V	55	1150	1725	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	35	35	35
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85
S												
D												

L				Test de evaluación final de fuerza											
M	56	1150	1725	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	35	35	35	35	35	35
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85
X	57	1200	1800	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85
J				Test de evaluación final de resistencia											
V	58	1250	1875	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	10
				Carga (g)	10	10	10	10	10	35	35	35	35	35	35
				Inclinación (grados)	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
S															
D															
L	59	1250	1875	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	10	30	30	30	30	30	30
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85
M	60	1350	2025	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
				Carga (g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85
X	61	1150	1725	Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
				Escalones	15	15	15	20	10	10	10	10	10	10	10
				Carga (g)	0	0	0	10	35	35	35	35	35	35	35
				Inclinación (grados)	90	85	80	85	85	85	85	85	85	85	85
J															
V															
S															
D															

Tabla suplementaria 4. Protocolo de entrenamiento de resistencia durante 14 semanas.

Día	Sesión	Tt (min)	Dt (m)	Vm (cm/s)	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Serie 5	Serie 6	Serie 7	Serie 8
L												
M	1	45	417	15,4	Tiempo (min)	5	5	15	20			
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5			
					Inclinación (grados)	0	10	10	10			
X	2	45	417	15,4	Tiempo (min)	5	5	15	20			
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5			
					Inclinación (grados)	0	10	10	10			
J	3	45	417	15,4	Tiempo (min)	5	5	15	20			
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5			
					Inclinación (grados)	0	10	10	10			
V	4	50	472,5	15,8	Tiempo (min)	5	5	15	25			
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5			
					Inclinación (grados)	0	10	10	10			
S												
D												
L	5	50	481,5	16,1	Tiempo (min)	5	5	15	15	10		
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5	20		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
M	6	55	606	18,4	Tiempo (min)	5	5	10	10	10	15	
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5	20	25	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	
X	7	55	606	18,4	Tiempo (min)	5	5	10	10	10	15	
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5	20	25	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	
J	8	55	606	18,4	Tiempo (min)	5	5	10	10	10	15	
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	18,5	20	25	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	
V	9	55	615	18,6	Tiempo (min)	5	5	10	20	15		
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	20	25		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
S												
D												
L	10	60	690	19,2	Tiempo (min)	5	5	10	20	20		
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	20	25		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
M	11	60	690	19,2	Tiempo (min)	5	5	10	20	20		
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	20	25		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
X	12	60	690	19,2	Tiempo (min)	5	5	10	20	20		
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	20	25		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
J	13	60	690	19,2	Tiempo (min)	5	5	10	20	20		
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	20	25		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
V	14	60	795	22,1	Tiempo (min)	5	5	5	10	20	15	
					Velocidad (cm/s)	10	10	15	20	25	30	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	
S												
D												

L	15	60	825	22,9	Tiempo (min)	5	10	10	20	15		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
M	16	60	750	20,8	Tiempo (min)	5	10	20	25			
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25			
					Inclinación (grados)	0	10	10	10			
X	17	60	750	20,8	Tiempo (min)	5	10	20	25			
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25			
					Inclinación (grados)	0	10	10	10			
J	18	60	705	19,6	Tiempo (min)	5	5	10	20	20		
					Velocidad (cm/s)	10	15	15	20	25		
					Inclinación (grados)	0	0	10	10	10		
V	19	60	705	19,6	Tiempo (min)	5	5	10	20	20		
					Velocidad (cm/s)	10	15	15	20	25		
					Inclinación (grados)	0	0	10	10	10		
S												
D												
L	20	60	720	20,0	Tiempo (min)	5	5	10	20	15	5	
					Velocidad (cm/s)	10	15	15	20	25	30	
					Inclinación (grados)	0	0	10	10	10	10	
M	21	60	765	21,3	Tiempo (min)	5	5	5	20	15	10	
					Velocidad (cm/s)	10	15	15	20	25	30	
					Inclinación (grados)	0	0	10	10	10	10	
X	22	60	825	22,9	Tiempo (min)	10	5	10	20	15		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
J	23	40	435	18,1	Tiempo (min)	5	5	10	10	10		
					Velocidad (cm/s)	10	15	15	20	25		
					Inclinación (grados)	0	0	10	10	10		
V	24	60	825	22,9	Tiempo (min)	10	5	10	20	15		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
S												
D												
L	25	60	825	22,9	Tiempo (min)	10	5	10	20	15		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
M	26	60	885	24,6	Tiempo (min)	5	5	10	20	15	5	
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	35	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	
X	27	60	885	24,6	Tiempo (min)	5	5	10	20	10	5	5
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	35	30
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10
J	28	45	495	18,3	Tiempo (min)	10	5	10	10	10		
					Velocidad (cm/s)	15	15	15	20	25		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
V	29	60	885	24,6	Tiempo (min)	5	5	10	20	10	5	5
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	35	30
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10
S												
D												

# Anexos

L	30	60	885	24,6	Tiempo (min)	5	5	10	20	10	5	5
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	35	30
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10
M	31	60	900	25,0	Tiempo (min)	5	5	10	10	20	5	5
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	35	25
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10
X	32	60	885	24,6	Tiempo (min)	5	5	10	15	25		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
J	33	60	870	24,2	Tiempo (min)	5	5	10	15	15	5	5
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	35	20
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10
V	34	60	885	24,6	Tiempo (min)	5	5	10	15	25		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
S												
D												
L	35	60	885	24,6	Tiempo (min)	5	5	10	15	25		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
M	36	60	900	25,0	Tiempo (min)	5	5	5	20	25		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
X	37	60	885	24,6	Tiempo (min)	5	5	5	25	20		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
J	38	60	855	23,8	Tiempo (min)	5	5	10	25	15		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
V	39	60	855	23,8	Tiempo (min)	5	5	10	25	15		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
S												
D												
L	40	60	915	25,4	Tiempo (min)	5	5	5	25	10	10	
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	35	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	
M	41	55	855	25,9	Tiempo (min)	5	5	20	20	5		
					Velocidad (cm/s)	15	15	25	30	35		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
X	42	55	855	25,9	Tiempo (min)	5	5	20	20	5		
					Velocidad (cm/s)	15	15	25	30	35		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
J	43	60	915	25,4	Tiempo (min)	5	5	5	20	20	5	
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	35	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	
V	44	60	885	24,6	Tiempo (min)	5	5	5	25	20		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10		
S												
D												

L	45	50	675	22,5	Tiempo (min)	5	5	5	35				
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25				
					Inclinación (grados)	0	10	10	10				
M													
X	46	60	780	21,7	Tiempo (min)	5	5	10	35	5			
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	15			
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10			
J													
V	47	60	930	25,8	Tiempo (min)	5	5	5	5	35	5		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	25		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10		
S													
D													
L	48	75	1077	23,9	Tiempo (min)	5	5	5	5	40	15		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	20		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10		
M	49	75	1095	24,3	Tiempo (min)	5	5	10	20	20	15		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	25		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10		
X													
J	50	75	1056	23,5	Tiempo (min)	5	5	5	20	20	10	10	
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	25	20	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10	
V	51	75	1086	24,1	Tiempo (min)	5	5	5	20	20	5	10	5
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	30	25	20
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10	10
S													
D													
L	52	75	1077	23,9	Tiempo (min)	5	5	5	5	40	15		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	20		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10		
M	53	75	1095	24,3	Tiempo (min)	5	5	10	20	20	15		
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	30	25		
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10		
X													
J	54	70	966	23,0	Tiempo (min)	5	5	10	10	20	10	10	
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	25	20	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10	
V	55	60	867	24,1	Tiempo (min)	5	5	5	20	15	5	5	
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	30	25	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10	
S													
D													

## Anexos

L					Test de evaluación final de fuerza							
M	56	75	1101	24,5	Tiempo (min)	5	5	5	25	20	5	10
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	30	25
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10
X	57	55	699	21,2	Tiempo (min)	5	5	5	15	5	20	
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	20	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	
J					Test de evaluación final de resistencia							
V	58	80	1122	23,4	Tiempo (min)	5	5	20	25	15	5	5
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	30	25
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	10
S												
D												
L	59	75	1083	24,1	Tiempo (min)	5	5	10	35	10	10	
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	30	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	
M	60	60	720	20,0	Tiempo (min)	5	5	40	10			
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25			
					Inclinación (grados)	0	10	10	10			
X	61	75	1098	24,4	Tiempo (min)	5	5	15	20	10	20	
					Velocidad (cm/s)	15	15	20	25	28	30	
					Inclinación (grados)	0	10	10	10	10	10	
J												
V												
S												
D												

Tt (tiempo total), Dt (distancia total) y Vm (velocidad media).

## Anexo 2. Niveles de p70 S6K en corteza cerebral, estriado y cerebelo de los ratones Wt y *atg4b*<sup>-/-</sup>

### El ejercicio produce efectos diferentes en los niveles de p70 S6K en las diferentes regiones encefálicas de los ratones con déficit parcial de autofagia

Los niveles de p70 S6K no mostraron diferencias significativas en la **corteza cerebral** de los ratones entrenados y no entrenados de ambos genotipos (Figura suplementaria 1).

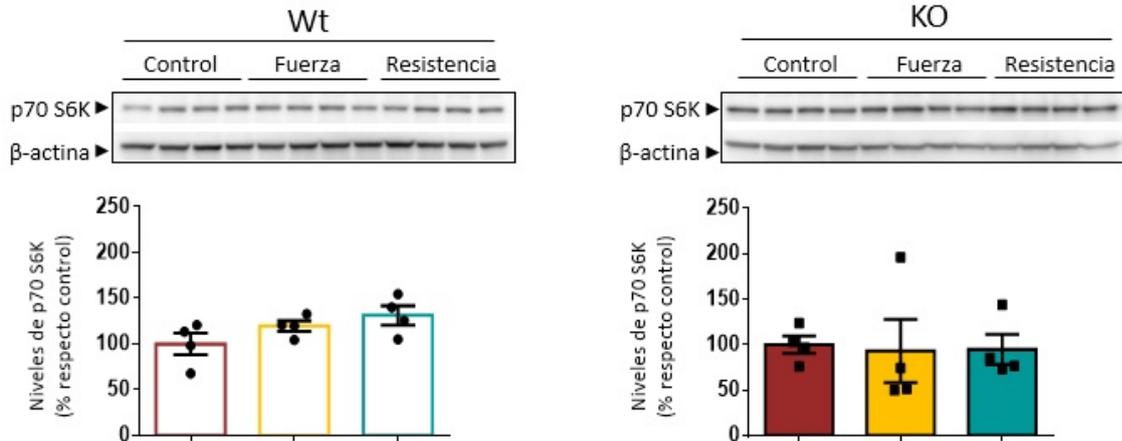
Sin embargo, en el **estriado**, aunque en los animales Wt tampoco se observaron diferencias significativas, los *atg4b*<sup>-/-</sup> que entrenaron presentaron mayores niveles de esta proteína. En concreto, tras la intervención de 2 semanas, los KO-2R tenían unos niveles de p70 S6K un 47 % mayores que los KO-2C ( $p = 0,055$ ; Figura suplementaria 2), mientras que después de la intervención de 14 semanas, tanto los KO-14F como los KO-14R mostraron mayores niveles de p70 S6K que los KO-14C (182 % más altos,  $p = 0,022$ ; 283 % más altos,  $p = 0,010$ , respectivamente).

Por último, observamos que en el **cerebelo** el ejercicio durante 2 semanas no influyó sobre los niveles de p70 S6K en el genotipo Wt, mientras que los ratones KO-2F presentaron menores niveles de esta proteína que los KO-2C (un 71 % menos;  $p = 0,028$ ; Figura suplementaria 3). Por el contrario, el entrenamiento durante 14 semanas sí influyó en el cerebelo de los Wt. Los Wt-14F y los Wt-14R tenían más elevados los niveles con respecto a los Wt-14C (19 % mayores,  $p = 0,025$ ; 52 % más,  $p = 0,000$ , respectivamente). Así mismo, los Wt-14R mostraron más incrementados los niveles de esta proteína con respecto a los Wt-14F (un 32 % mayores;  $p = 0,004$ ). Por otro lado, en el caso de los *atg4b*<sup>-/-</sup>, los resultados fueron similares a los observados en la intervención de corta duración, los KO-14F mostraron valores de p70 S6K menores que los KO-14C (45 % más bajos;  $p = 0,029$ ).

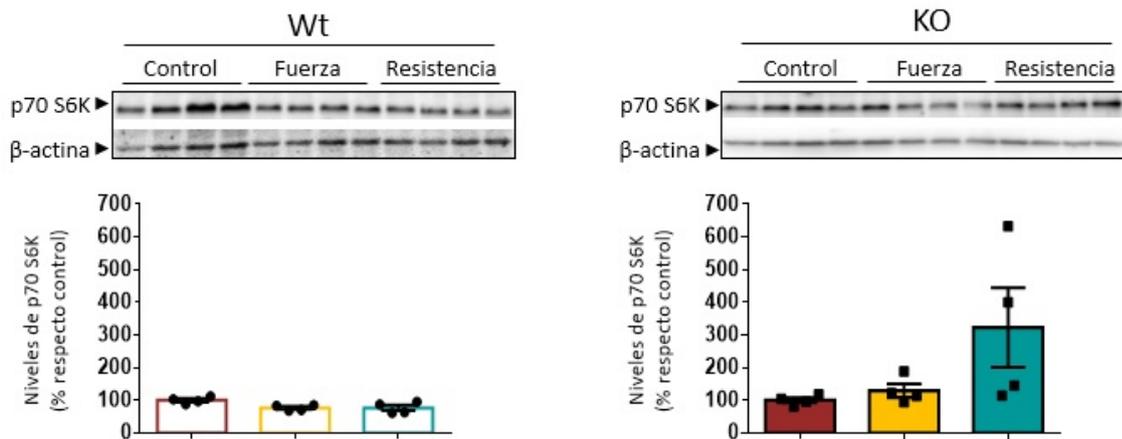
Por lo tanto, ante el déficit parcial de autofagia, cada región encefálica respondió de forma diferente al efecto del ejercicio.

## Corteza cerebral

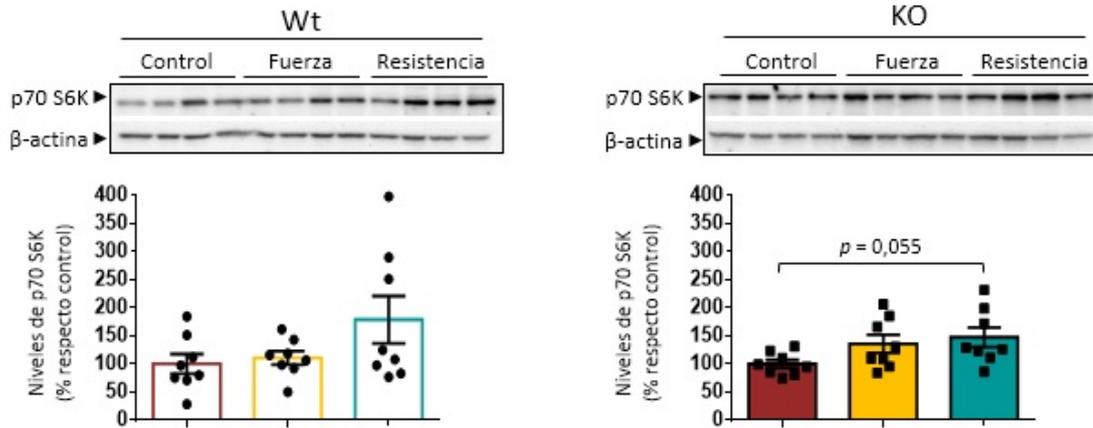
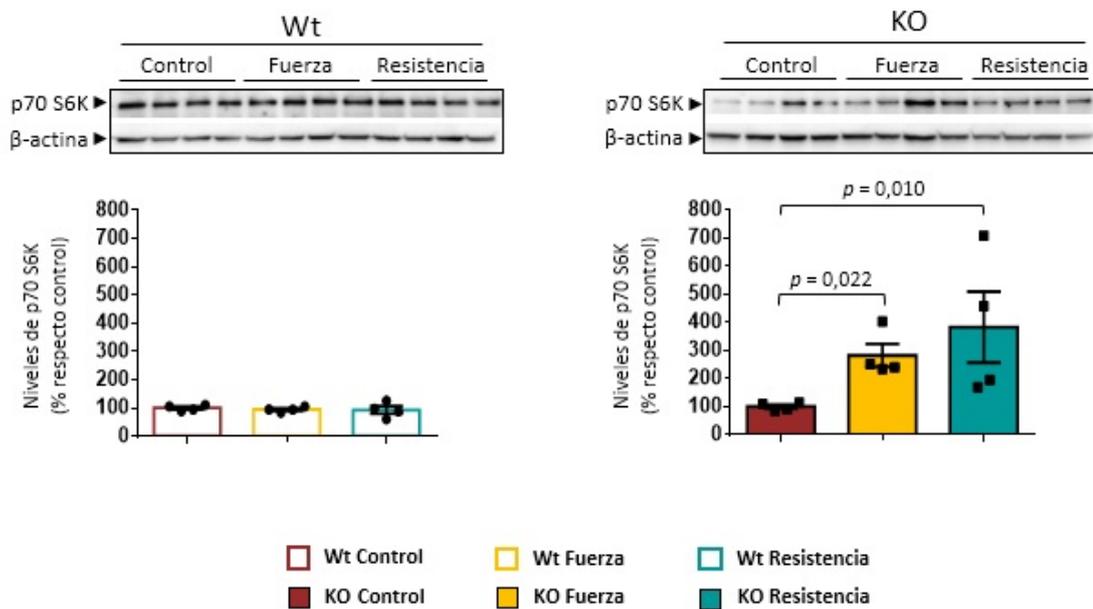
### 2 semanas



### 14 semanas



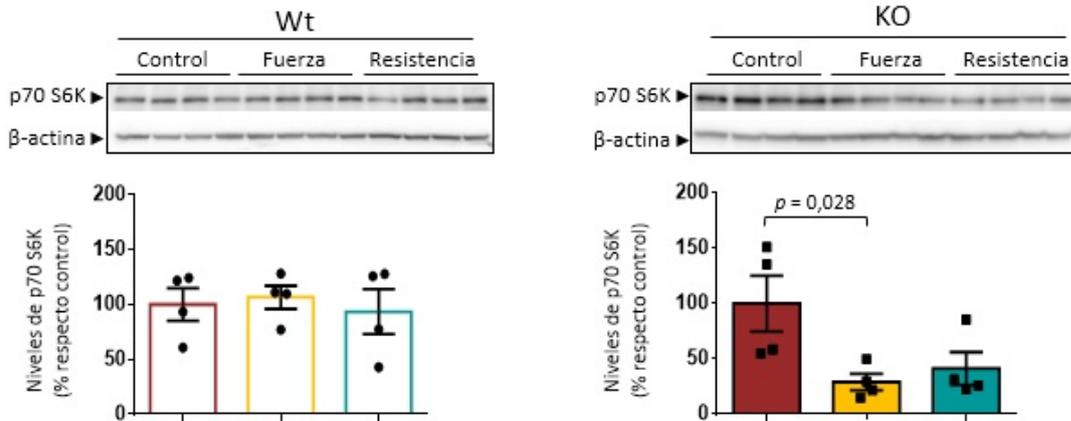
**Figura suplementaria 1. Niveles de p70 S6K en la corteza cerebral de los ratones Wt y KO entrenados durante 2 y 14 semanas.** Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; n = 4 para todos los grupos.

**Estriado****2 semanas****14 semanas**

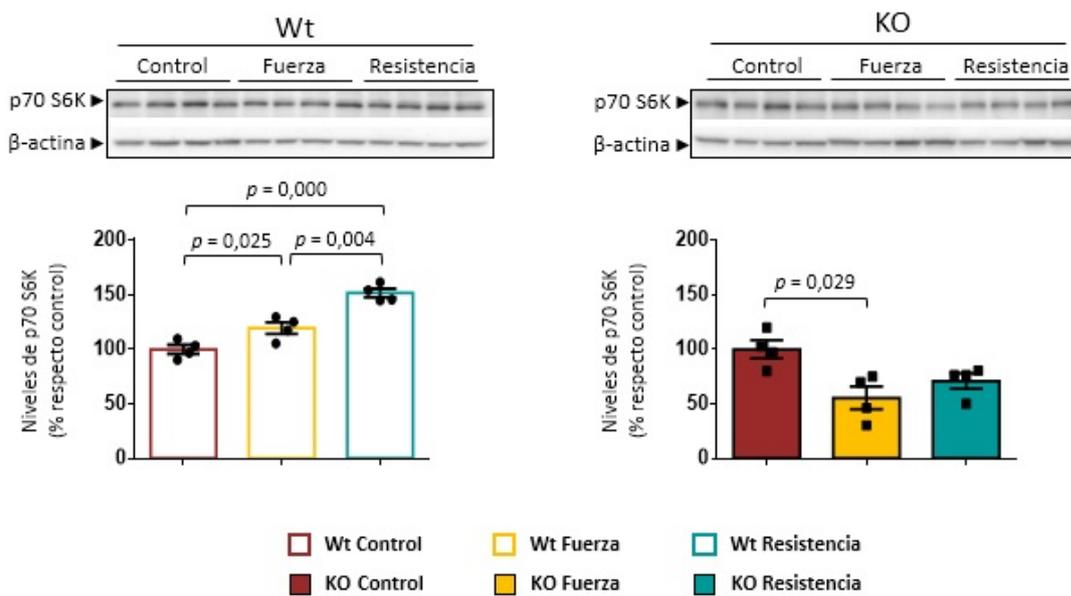
**Figura suplementaria 2. Niveles de p70 S6K en el estriado de los ratones Wt y KO entrenados durante 2 y 14 semanas.** Los datos se representan como media  $\pm$  SEM;  $n = 8$  en cada grupo, en el entrenamiento de 2 semanas y  $n = 4$  en cada grupo, en el entrenamiento de 14 semanas.

## Cerebelo

2 semanas



14 semanas



**Figura suplementaria 3. Niveles de p70 S6K en el cerebelo de los ratones Wt y KO entrenados durante 2 y 14 semanas.** Los datos se representan como media  $\pm$  SEM; n = 4 para todos los grupos.

