



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO
CIENCIAS DE LA SALUD

Tesis Doctoral

BDNF y músculo esquelético

Gorka Vázquez Rodríguez

Oviedo 2019

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
PROGRAMA DE DOCTORADO
MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR

Tesis Doctoral

BDNF y músculo esquelético

Gorka Vázquez Rodríguez
Oviedo 2019

Directores

José A. Vega Álvarez
Olivía García Suárez

Oviedo 2019

JUSTIFICACIÓN:

SE ESTIMA, QUE EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO TESIS DOCTORAL, CUMPLE TODOS LOS REQUISITOS PARA SU DEFENSA Y PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Oviedo, 17 de septiembre del 2019

Presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado

Fdo.: JOSE ANTONIO VEGA ALVAREZ

Contra la presente Resolución, podrá interponer recurso de alzada ante el Rectorado, en el plazo de un mes, a partir del día siguiente al de la presente notificación, de conformidad con el art. 122 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis Doctoral	
Español/Otro Idioma: BDNF y MÚSCULO ESQUELÉTICO	Inglés: BDNF AND SKELETAL MUSCLE
2.- Autor	
Nombre: GORKA VÁZQUEZ RODRÍGUEZ	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Línea de Investigación: ÓRGANOS DE LOS SENTIDOS Y SISTEMA NERVIOSO	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN (en español)

Introducción. - El músculo esquelético de los vertebrados se considera en la actualidad una fuente de moléculas bioactivas, denominadas colectivamente, miocinas, entre las que se encuentra el BDNF. Esta molécula pertenece a la familia de los factores de crecimiento de las neurotrofinas y actúa mediante un receptor de transmembrana con actividad tirosina-quinasa denominado TrkB.

Los niveles plasmáticos y cerebrales de BDNF aumentan con el ejercicio, lo que podría estimular la renovación y reparación del músculo en las situaciones de pérdida de masa muscular, así como mejorar los déficits cognitivos de las personas ancianas o con patologías neurodegenerativas.

Hipótesis y objetivos. - El músculo esquelético es una fuente de BDNF cuya producción se ve potenciada con el ejercicio y es independiente de la inervación. El objetivo general del trabajo es contribuir al conocimiento de las neurotrofinas-miocinas musculares, y los objetivos específicos son: 1.- Determinar si el músculo esquelético expresa en gen del BDNF y su receptor de alta afinidad TrkB; 2.- Establecer si el músculo esquelético contiene BDNF y receptor de alta afinidad TrkB y en qué células musculares se localiza; 3.- Analizar si el ejercicio de entrenamiento produce modificaciones en los niveles de BDNF a nivel de mRNA o de proteína en el músculo esquelético, en plasma y a nivel cerebral; 4.- Ver si produce las modificaciones en los niveles de BDNF a nivel de mRNA o de proteína en el músculo esquelético dependen de la inervación; 5.- Estudiar la estructura del músculo esquelético de ratones deficientes en BDNF y su receptor de alta afinidad TrkB.

Material y técnicas. - Se utilizaron ratones machos de diferentes edades (10,40,90 días; 6 y 12 meses), animales sometidos a actividad física voluntaria durante 30 días (edades

al inicio 1º y 60 días; 11 meses), animales con denervación unilateral del músculo gastronemius durante 10 días (edades al inicio (30 y 80 días, y 12 meses) y animales deficientes en BDNF y TrkB. De todos estos grupos se obtuvieron muestras de músculo, plasma e hipocampo-cerebro, sobre las que se realizaron las siguientes técnicas: 1.- rt-PCR para analizar la expresión de los genes de BDNF y TrkB en músculo; 2.- Westernblot para determinar la presencia de BDNF y TrkB en músculo; 3.- Inmunohistoquímica para determinar la localización celular de TrkB y BDNF en el músculo; 4.- ELISA para cuantificar BDNF en músculo, plasma y cerebro; 5.- técnicas estructurales y ultraestructurales para analizar el músculo de ratones portadores de mutaciones en los genes de BDNF y TrkB.

Resultados y conclusiones. - Los resultados y las conclusiones más relevantes del trabajo han sido: El músculo esquelético del ratón expresa los dos componentes del sistema de neurotrofinas BDNF/TrkB a nivel de mRNA y de proteína, y ambos son detectables a la largo de las diferentes edades analizadas (desde los 10 días hasta los 12 meses). El BDNF fue indetectable mediante técnicas de inmunohistoquímica en el músculo esquelético y el TrkB se localizó en células del aparato nervioso intramuscular. El entrenamiento, mediante ejercicio voluntario, durante 30 días produce aumento de los niveles proteicos de BDNF en músculo, plasma y cerebro, siendo las elevaciones más significativas en los animales de mayor edad. Los niveles de BDNF muscular son regulados al menos en parte por la inervación, ya que la sección del nervio isquiático los reduce significativamente en el tejido muscular pero no es plasma o cerebro. La estructura y ultraestructura del músculo esquelético y del aparato nervioso intramuscular, incluidos los husos neuromusculares, del ratón no se ve afectada por el déficit de TrkB, mientras que en los animales deficientes en BDNF se las células musculares son de menor tamaño, la matriz extracelular está aumentada y muestras alteraciones mitocondriales.

RESUMEN (en Inglés)

Introduction.- The skeletal muscle of vertebrates is currently regarded a source of bioactive molecules, collectively called myocines, including BDNF. This molecule belongs to the family of neurotrophin growth factors and acts throughout a transmembrane receptor with TrkB tyrosine-kinase activity.

Plasma and brain levels of BDNF increase with exercise, which could stimulate muscle renewal and repair in muscle loss situations, as well as improve cognitive deficits in elderly or neurodegenerative pathologies.

Hypothesis and objectives.- The skeletal muscle is a source of BDNF whose production is enhanced with exercise and is independent of innervation. The overall objective of the work is to contribute to the knowledge of muscle neurotrophins-myocines, and the specific objectives are: 1.- Determine if the skeletal muscle expresses BDNF and its receptor high affinity TrkB genes; 2.- Establish whether the skeletal muscle contains BDNF and TrkB high affinity receptor and in which muscle cells is located; 3.- Analyze

whether the training exercise produces modifications in BDNF levels at the mRNA or protein level in the skeletal muscle, in serum and at the brain level; 4.- Study whether or not the muscle BDNF, at mRNA or protein level, depends on the innervation; 5.- Study the structure of the skeletal muscle of mice deficient in BDNF and its receptor of high affinity TrkB.

Material y técnicas.- We used male mice of different ages (10,40,90 days; 6 and 12 months), animals subjected to voluntary physical activity for 30 days (ages at the beginning 1st and 60days), animals with unilateral denervation of the gastrocnemius muscle for 10 days (ages at onset 30 and 80 days, and 12 months) and animals deficient in BDNF and TrkB. From all these groups were obtained samples of muscle, plasma and hippocampus-brain, on which the following techniques are performed: 1.- rt-PCR to analyze the expression of the BDNF and TrkB genes in muscle; 2.- Westernblot to determine the presence of BDNF and TrkB in muscle; 3.- Immunohistochemistry to determine the cellular location of TrkB and BDNF in muscle; 4.- ELISA to quantify BDNF in muscle, plasma and brain; 5.- Structural and ultrastructural techniques to analyze the muscle of mice carrying mutations in the BDNF and TrkB genes.

Results and concluding remarks.- The most relevant results and conclusions of the study were: The skeletal muscle of the mouse expresses the two components of the BDNF/TrkB neurotrophin system at the mRNA and protein level, and both are detectable at the different ages analyzed (from 10 days to 12 months). BDNF was undetectable by immunohistochemistry in skeletal muscle and TrkB was located in cells of the intramuscular nervous system. Training, through voluntary exercise, for 30 days produces increased protein levels of BDNF in muscle, plasma and brain, being the most significant elevations in older animals. Muscle BDNF levels are regulated at least in part by innervation, as the section of the sciatic nerve significantly reduces them in muscle tissue but not in plasma or brain. The structure and ultrastructure of the skeletal muscle and intramuscular nervous system, including muscle spindles, of the mouse is not affected by TrkB deficiency, while in BDNF-deficient animals the muscle cells are smaller and the extracellular matrix is augmented and shows mitochondrial alterations.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

DEDICATORIA

A J.A. Vega,

Como homenaje a su brillante carrera de esfuerzo y trabajo,
muchas veces no reconocido, a su mente y su corazón.

“Solo hay un mal: la ignorancia”. Sócrates

AGRADECIMIENTOS

A mi gran amigo el **Dr. Jose Antonio Vega** por creer y cobijar a ese alumno que decía “cosas raras” en el grado de fisioterapia. No sólo me diste tu saber sino tu amistad, que es el bien máspreciado.

A los doctores **Olivia Garcia, Eliseo Viña, Angel Gago y Roberto Cabo** por su generosidad y compañerismo; en mi memoria quedarán grandes momentos en el laboratorio.

A mis padres **Jose Luis Vázquez Gaspón y Salud Rodríguez Ys**, por inculcarme valores y educación; sin ellos nunca hubiera llegado hasta aquí.

A **Gely López Prieto** por todo su amor y su paciencia; cada día me das lecciones de vida que siempre te agradeceré.

A **Noa y Juan**, por acompañarme todos los días en mis horas de trabajo enfrente del ordenador. Sois parte de mí y siempre me acompañareis allí donde vayamos.

Índice

- 1.- Introducción, 19

- 2.- Estado actual del problema, 23
 - 2.1. Introducción, 24
 - 2.2. El músculo esquelético como fuentes de moléculas bioactivas, 24
 - 2.3. El factor de crecimiento derivado del cerebro: Breve actualización sobre las neurotrofinas y sus receptores, 27
 - 2.4. BDNF y músculo, 31
 - 2.5. BDNF y ejercicio, 33
 - 2.6. BDNF, neuropatías periféricas y ejercicio, 35
 - 2.7. BDNF, envejecimiento y ejercicio, 37
 - 2.8. BDNF, patologías del sistema nervioso central y ejercicio

- 3.- Hipótesis de trabajo y Objetivos, 41

- 4.- Material y Técnicas, 45
 - 4.1. Material, 47
 - 4.2. Recogida de las muestras, 49
 - 4.3. Técnicas, 50
 - 4.3. Estudio estadístico, 55

- 5.- Resultados, 57
 - 5.1. El músculo esquelético del ratón expresa *bdnf* y *trkB* y contiene BDNF y TrkB, 59
 - 5.2. El ejercicio incrementa los niveles de BDNF en plasma, músculo y cerebro, 61
 - 5.3. Los niveles de BDNF en plasma y cerebro no se ven afectados por la denervación muscular, pero si los musculares, 63
 - 5.4. La estructura del músculo esquelético no se afecta por el déficit de TrkB y levemente por la ausencia de BDNF, 65

- 6.- Discusión, 69
 - 6.1. Consideraciones generales, 71
 - 6.2. Discusión de los resultados, 72
 - 6.3. Limitaciones del estudio y futuras línea de investigación, 75

- 7.- Conclusiones

- 8.- Bibliografía

- Anexo 1 – Curriculum vitae
- Anexo 2 – Publicaciones derivadas la Tesis

1.

Introducción

1. INTRODUCCION

En 1982 Barde y colaboradores purificaron e identificaron en el cerebro del cerdo el segundo miembro de la familia de las neurotrofinas (NTs) y lo denominaron factor de crecimiento derivado del cerebro (*brain-derived neurotrophic factor*: BDNF; Barde et al., 1982). Desde entonces, se ha demostrado que esta molécula cumple funciones fundamentales en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central y en algunas poblaciones neuronales y gliales del sistema nervioso periférico (Montaño et al., 2010; McGregor y English, 2019) y es esencial en los mecanismos de la plasticidad sináptica (De Vincenti et al., 2019). Muchos de los cambios relacionados con la actividad cerebral se realizan a través de variaciones en los niveles de BDNF, especialmente en el hipocampo y el neocórtex (ver De Vincenti et al., 2019). Consecuentemente, cambios patológicos en los niveles de BDNF están en la base de muchas patologías, desde la epilepsia (Lughetti et al., 2018) a la sensibilización al dolor crónico (Merighi, 2016), y la administración de BDNF exógeno puede ser una potencial arma terapéutica para patologías neurodegenerativas y psiquiátricas (ver para una revisión Binder y Scharfman, 2004; Deng et al., 2016). Todas estas funciones del BDNF parecen lógicas dado su papel preponderante de neurotrofina.

Pero numerosos estudios han demostrado que el BDNF también ejerce sus efectos sobre tejidos no-nerviosos y que los animales deficientes en BDNF o en su receptor de alta afinidad TrkB presentan alteraciones estructurales en diferentes órganos (Yamamoto et al., 1996; Botchkarev et al., 1999; Vega et al., 2003; García-Suárez et al., 2002, 2006a, 2006b, 2009).

Como se expondrá en detalle en el capítulo siguiente, el BDNF se sintetiza en varios tejidos del cuerpo y uno de los que mayores cantidades produce es el músculo esquelético. Ya que mi formación de base es la fisioterapia y, por tanto, la manipulación del sistema músculo esquelético, en el presente trabajo de tesis doctoral se ha tratado de contribuir al conocimiento de las relaciones entre BDNF y el músculo esquelético como fuente y diana de esta molécula. Se estudiará si la producción de BDNF por el músculo depende o no de su inervación, si los niveles musculares de BDNF están en relación con el ejercicio, y si el ejercicio modifica los niveles de BDNF cerebrales. Los resultados que se produzcan tienen interés fisiopatológico a la hora de manipular parálisis musculares centrales y/o periféricas y para dilucidar si puede tener interés en el evitar la propia atrofia muscular debida a la inactividad muscular.

El estudio se ha realizado mediante técnicas de biología celular y molecular en ratones normales, portadores de lesiones del sistema nervioso periférico (sección nerviosa) y sometidos a actividad muscular. Además, se ha analizado mediante técnicas morfológicas el fenotipo muscular de ratones deficientes en BDNF y en su receptor TrkB.

2.

Estado actual del problema

2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

2.1. Introducción

El músculo esquelético, además de las funciones mecánicas que desarrolla, puede considerarse como parte del sistema endocrino porque, en condiciones fisiológicas, es capaz de producir sustancias bioactivas, que actúan de manera endocrina y/o paracrina (ver para una revisión Iizuka et al., 2014; Legard y Pedersen, 2019). En conjunto, a estos factores se los denomina "**factores de ejercicio**" o **miocinas**; y entre las diferentes moléculas de origen muscular identificadas (Fig. 2.1) se encuentran algunas NTs, especialmente el BDNF (ver Jiménez-Maldonado et al., 2018) conocida, sobre todo, porque regula la neurogénesis adulta y la plasticidad sináptica (Kim et al., 2019). Pero estudios recientes han demostrado que BDNF participa en procesos fisiológicos como la homeostasis de la glucosa y el metabolismo lipídico (ver Jiménez-Maldonado et al., 2018).

En las páginas que siguen se realiza una puesta al día sobre 1) el BDNF y la regulación de su síntesis por la actividad muscular (ejercicio) y la innervación; 2) las variaciones en los niveles/síntesis de BDNF tras la denervación muscular, lesiones medulares, patologías del sistema nervioso central; y 3) cambios en los niveles de BDNF intervenciones terapéuticas para el tratamiento de las mismas.

2.2. El músculo esquelético como fuentes de moléculas bioactivas

Las relaciones del músculo esquelético con el resto de los órganos y tejidos de la economía, incluido el sistema nervioso central, se realizan a través de la secreción de **miocinas**, hormonas proteicas que pueden ejercer efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos de larga distancia; y como ya se comentó previamente, entre estas moléculas se encuentra el BDNF (Pedersen, 2011, 2019; Delezie y Handschin, 2018; Lee y Jun, 2019). Las miocinas son citoquinas producidas por los miocitos que median las acciones del ejercicio sobre el metabolismo, la inflamación y otras condiciones fisiopatológicas (**Fig. 2.1**). Además, el músculo esquelético es una importante fuente de citoquinas generales (IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor- α , monocyte chemoattractant protein-1, IL-1 β , BDNF, IL-12p35/p40 y IL-15) algunas de las cuales se liberan durante el ejercicio (Peake et al., 2015).

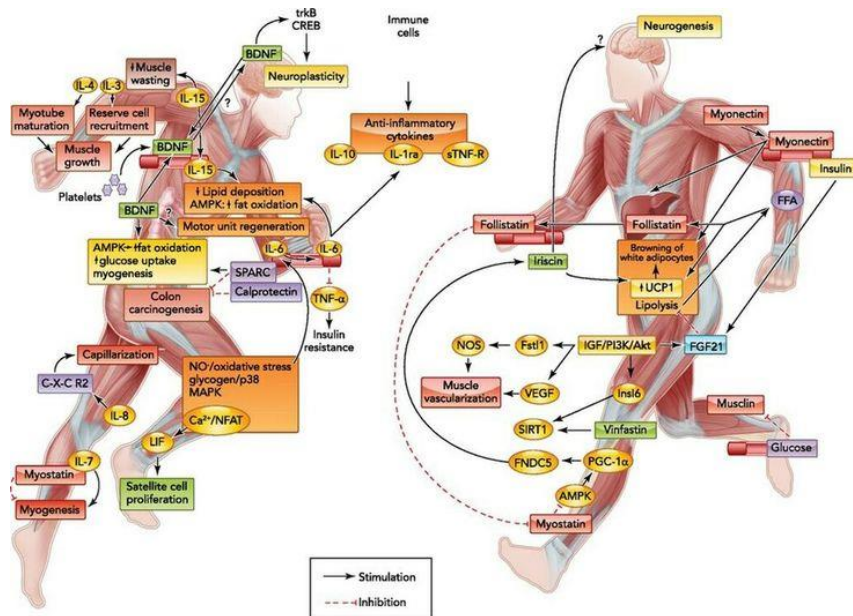


Figura 2.1.- El músculo esquelético como fuente de moléculas bioactivas. Tomado de Fiuz-Luces et al (2013)

Todas estas moléculas bioactivas de origen muscular una vez liberadas al torrente circulatorio ejercen funciones de regulación sobre los diferentes órganos y tejidos del cuerpo (Fig. 2.2).

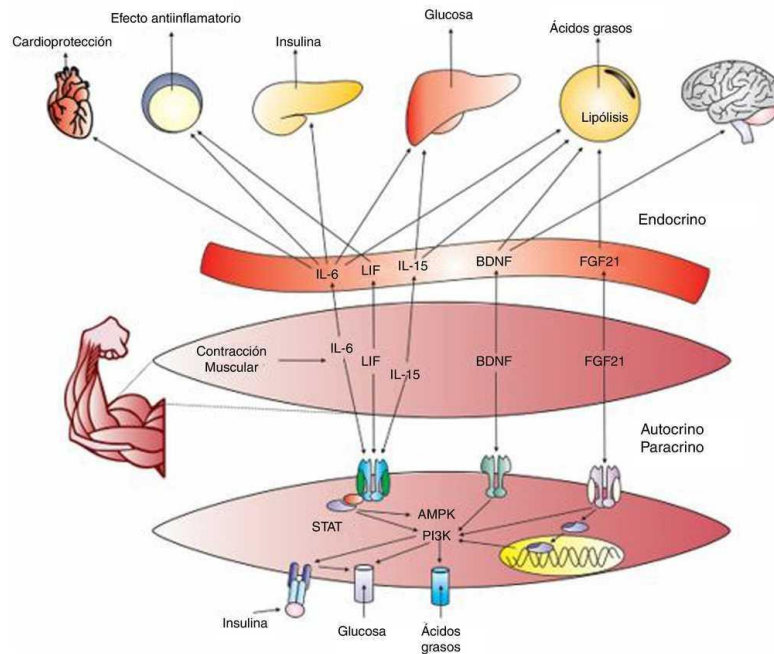


Figura 2.1.- Principales efectos endocrino y paracrin/autocrin de las miocinas, incluido en BDNF. Tomado de León-Ariza et al. (2018).

Pero los datos disponibles sobre la secreción/liberación de miocinas en general, y del BDNF en particular, tras el ejercicio son muy dispersos y bastante incoherentes. Ello podría atribuirse al momento de la recolección de muestras, el procesamiento de las mismas, y el método analítico de determinación entre otras variables, entre otras variables (Huh, 2018; Son et al., 2018).

2.3. El factor de crecimiento derivado del cerebro: Breve actualización sobre las neurotrofinas y sus receptores

Las neurotrofinas (NTs) forman una familia de proteínas, relacionadas estructural y funcionalmente, que funcionan como factores neurotróficos y neurotróficos. Sus

acciones principales las ejercen durante el desarrollo del sistema nervioso periférico y de diferentes derivados de la cresta neural; pero también sobre poblaciones neuronales específicas centrales, especialmente el sistema colinérgico (Levi-Montalcini, 1987; Lewin y Barde, 1996; Fried et al., 2000).

La familia de factores de crecimiento de las NTs está formada, en los vertebrados superiores, por 4 miembros: NGF (*nerve growth factor*: factor de crecimiento nervioso), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*: factor de crecimiento derivado del cerebro), NT3 (neurotrofina-3) y NT4. En los teleósteos se han secuenciado, además, otros dos miembros denominados NT6 (Götz et al., 1994) y NT7 (Lai et al. 1998; Nilsson et al., 1998) que parecen ser ortólogos del NGF de los mamíferos (ver Lewin y Barde, 1996; Vega et al., 2003). Además, existen evidencias de que las NTs también están presentes en los invertebrados (ver para referencias Lucini et al., 1999) y se considera que las NTs y sus receptores están bien conservados filogenéticamente y existen amplias analogías de secuencia (Hallböök et al., 2006). BDNF comparte aproximadamente un 50% de identidad de aminoácidos con NGF, NT-3 y NT-4/5 (Binder y Scharfman, 2004).

Las NTs se sintetizan como precursores inmaduros que se procesan dentro del citoplasma celular y son liberadas como productos maduros (Teng y Hempstead, 2004). NGF y NT-3 se liberan a través de una vía secretora constitutiva, mientras que BDNF se secreta a través de vías reguladas (Hempstead, 2006; Schweigreiter, 2006).

Las NTs actúan sobre las células que responden a ellas uniéndose a dos tipos de receptores de membrana definidos en base a su afinidad farmacológica como

receptores de alta y baja afinidad. El receptor de baja afinidad se denomina p75^{NTR}. Es común para todas las neurotrofinas, y se ha identificado como una glicoproteína de transmembrana perteneciente a la superfamilia del TNF (*tumor necrosis factor*: factor de necrosis tumoral) que carece de la actividad enzimática y tiene una secuencia de dominio de muerte (Dechant y Barde, 2002; Roux y Barker, 2002).

Los receptores de alta afinidad, por su lado, son proteínas de transmembrana con actividad tirosina-quinasa, codificadas por proto-oncogenes de la familia *trk*. Hasta la fecha se han identificado los receptores generales TrkA, TrkB y TrkC y algunos órgano-específicos como el TrkE y el TrkAIII (ver Barbacid, 1995; Lu et al., 2005, Reichardt, 2006; Montañó et al., 2010). Cada Trk liga preferentemente una única NT. Así, TrkA es el receptor para NGF, BDNF y NT-4/5 se unen a TrkB y NT-3 es el ligando para TrkC (Lewin y Barde, 1996; Chao, 2003; Segal, 2003; Huang y Reichardt, 2003; Reichardt, 2006) (Fig. 2.3).

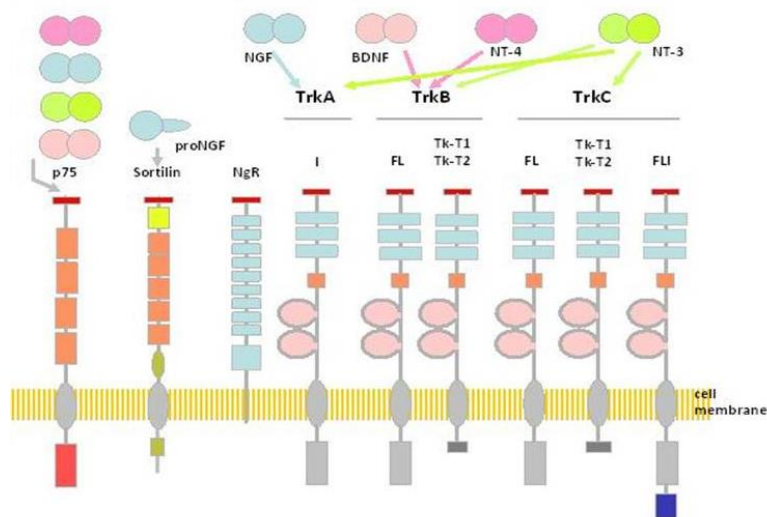


Figura 2.3.- Representación esquemática de la estructura de p75^{NTR}, sortilina, receptor Nogo (NgR) y Trks (tomado de García-Cosamalón et al., 2010). El esquema muestra las posibles uniones de las NTs y pro-NTs a los receptores. Hasta la fecha se han identificado cinco isoformas de TrkA. Las isoformas de TrkB y TrkC incluyen, formas completas (con actividad tirosina-quinasa, FL) y truncadas (TK-T1 y TK-T2, carentes de dominio tirosina-quinasa) e isoformas insertadas (sólo para TrkC).

Además de los receptores Trk y gp75^{NTR}, algunas NTs y pro-NTs pueden ligarse a otros receptores de membrana como la sortilina y el complejo Nogo-receptor para ejercer sus acciones biológicas, sobre todo interaccionando con gp75^{NTR} (ver Bronfman y Fainzilber, 2004; Bandtlow y Dechant, 2004; Nykjaer et al., 2004; Jansen et al., 2007). Tras unirse a los receptores de membrana, las NTs inician una serie de señales que conducen al control de la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia (Segal, 2003; Reichardt, 2006; Skaper, 2008).

Aunque la mayor parte de los efectos biológicos de las NTs se realizan sobre el sistema nervioso, existen evidencias de que también actúan sobre tejidos no nerviosos, especialmente sobre el sistema inmunitario (ver Vega et al., 2003). Esta suposición se sustenta en los efectos biológicos de las NTs sobre células no neuronales en cultivo, la expresión de receptores para las NTs en los tejidos no nervioso (Shibayama y Koizumi, 1996; Yamamoto et al., 1996), y las alteraciones estructurales en órganos no nerviosos de animales deficientes en NTs o sus receptores. Así, se han demostrado cambios estructurales en timo (García-Suarez et al., 2000, 2002), hígado (García-Suarez et al., 2006b), riñón (García-Suarez et al., 2006a), piel (Botchkarev et al., 1999) y pulmón (García-Suárez et al., 2009).

En las páginas que siguen se realiza una puesta al día sobre 1) el BDNF y la regulación de su síntesis por la actividad muscular (ejercicio) y la inervación; 2) las variaciones en los niveles/síntesis de BDNF tras la denervación muscular, lesiones medulares, patologías del sistema nervioso central; y 3) cambios en los niveles de BDNF intervenciones terapéuticas para el tratamiento de las mismas.

2.4. BDNF y músculo

Muchos autores consideran que el BDNF de origen muscular es una miocina. A favor de esta teoría está el hecho de que el BDNF se expresa en el músculo esquelético y los niveles de expresión varían entre las condiciones fisiológicas y las patológicas (Chevrel et al., 2006). Los estudios de Yamamoto et al. (1996) y Shibayama y Koizumi (1996) ha demostrado la presencia de BDNF y su receptor TrkA en el músculo esquelético de los mamíferos, incluido el hombre.

Durante el desarrollo embrionario BDNF se expresaba tanto en las células musculares precursoras como en las diferenciadas *in vitro* como *in vivo* de manera que actuaría como un factor autocrino para las células del músculo esquelético capaz de regular la miogénesis. La ausencia condicional de BDNF en células precursoras musculares de ratón altera la miogénesis y la regeneración *in vivo*. Experimentos funcionales *in vitro* demostraron que el silenciamiento del gen BDNF o el bloqueo de su actividad en cultivos de mioblastos obstaculizaron la miogénesis. Estos efectos se producirían por medio de un eje de señalización BDNF-p75NTR ya que los miocitos expresarían de p75NTR pero no TrkB (Colombo et al., 2013).

En el músculo esquelético adulto BDNF se expresa en las células satélite musculares (Mousavi et al., 2004) y su expresión se regula a la alta celular cuando se produce una lesión muscular y proliferación de esta población (Omura et al., 2005). Por su parte, Clow y Jasmin (2010), utilizando un modelo de ratón deficiente en BDNF muscular, demostraron que BDNF regula la diferenciación de células satélite. Los resultados de ambos estudios sugieren que BDNF podría jugar un importante en la mediación de la

respuesta de las células satélite a la lesión muscular y la regeneración muscular esquelética.

Por otro lado, BDNF actuando por medio del TrkB potencia la transmisión neuromuscular por medio de un efecto presináptico, y el mantenimiento de la estructura de las uniones neuromusculares, efectos que disminuyen o desaparecen con el envejecimiento (Greising et al., 2015). De acuerdo con esta función, BDNF también se expresa en las zonas próximas a las sinapsis mioneurales. La expresión de BDNF en esta localización parece estar regulada por el nervio, ya que los niveles de BDNF se reducen tras la denervación; ello sugiere que los niveles de BDNF muscular están regulados por la inervación. Además, el BDNF se conduce por transporte axónico retrógrado desde el músculo a las motoneuronas α del asta anterior de la médula espinal que expresan el gen que codifica p145trkB (TrkB) y p75NGFR (Koliatsos et al., 1993; Stephens et al., 2005).

Pero a pesar de los abundantes estudios que asocian el BDNF con el desarrollo y la función musculares, no hay evidencia concluyente de que BDNF sea que es una miocina. De hecho, el efecto de la contracción muscular en los niveles circulantes de BDNF es controvertido. Algunas investigaciones no han demostrado cambios en los niveles séricos tras ejercicio agudo o crónico; otros estudios, por el contrario, sostienen que los niveles circulantes de BDNF aumentan después del ejercicio físico (Ferris et al., 2007; Yarrow et al., 2010; Pereira et al., 2018). Además, la contracción de las células musculares aumenta los niveles mRNA-BDNF (Matthews et al., 2009).

Así pues, el BDNF producido en el músculo puede liberarse a la sangre y ejercer diferentes funciones a distancia (endocrinas) o actuar directamente dentro del propio músculo (autocrinia/paracrinia). Las primeras le permiten actuar, directa o indirectamente, sobre el sistema nervioso central, el hígado o en músculo; las segundas sobre las motoneuronas del asta anterior de la médula (es más discutida su posible acción sobre las neuronas de los ganglios raquídeos) y sobre las diferentes categorías de células presentes en el músculo.

2.5. BDNF y ejercicio

La mayor parte de los estudios experimentales y en humanos apuntan que el ejercicio conlleva un aumento de las concentraciones circulantes y locales de BDNF, y que gran parte del mismo tiene origen muscular. Así, se ha demostrado que la expresión de BDNF muscular, a nivel de mRNA y de la proteína, están regulados por la actividad física. Además, ello se acompaña de expresión de TrkB por axones intramusculares (Sartini et al., 2013). Por su lado, Yu et al. (2017), en un trabajo realizado en ratas macho Sprague Dawley, encontraron una elevación significativa del BDNF en sangre que se mantiene elevado incluso 14 días después de la realización del ejercicio, así como un aumento de la expresión de mRNA-BDNF y del BDNF musculares. No obstante, el ejercicio agudo e intenso es capaz de producir lesiones musculares y de reduce los niveles de BDNF circulante (Verbickas et al., 2018). Es interesante destacar que el ejercicio de entrenamiento después de un infarto de miocardio aumenta los niveles de BDNF en el músculo esquelético y en las áreas no infartadas del corazón lo que puede contribuir a mejorar la disfunción muscular y la función cardíaca postinfarto (Lee et al., 2017; Zhang et al., 2019).

Además, la expresión de BDNF muscular a nivel proteico depende de la actividad y el tipo de célula muscular: el ejercicio crónico de alta intensidad reduce el nivel de BDNF en los músculos rápidos y aumenta los niveles de mRNA-BDNF en los músculos lentos (Jiménez-Maldonado et al., 2016).

La respuesta del BDNF muscular también parece estar relacionada con las diferentes modalidades de ejercicio (Jiménez-Maldonado et al., 2018). Recientemente Antunes et al. (2019) estudiaron la respuesta de BDNF después de las sesiones de ejercicio agudo realizadas a intensidades bajas, moderadas y altas. El ejercicio de alta intensidad conlleva disminución de los niveles de BDNF y se observó que sujetos con niveles de aptitud física más bajos tuvieron mayores aumentos en BDNF en el ejercicio de alta intensidad. Los autores concluyen que el ejercicio de alta intensidad parece ser más eficiente en el aumento de la concentración de BDNF a corto plazo.

Otros estudios, por el contrario, no han observado ningún efecto del ejercicio sobre el BDNF y la expresión en músculo esquelético humano del gen que codifica para BDNF no se modifica después del ejercicio (Walsh et al., 2015).

Así pues, en conjunto, la mayoría de los estudios sugieren que el ejercicio aumenta los niveles circulantes y locales musculares de BDNF, potenciando indirectamente el efecto fisiológico de esta neurotrofina-miocina.

2.6. BDNF, neuropatías periféricas y ejercicio

Tras la lesión de un nervio periférico o de la médula espinal (donde se localiza el soma de las motoneuronas), la reinervación de los músculos es fundamental para restablecer la actividad funcional del sistema locomotor y algunos estudios han establecido que el BDNF es fundamental para la reparación de los nervios periféricos lesionados. La expresión de BDNF así como de su receptor TrkB aumenta de forma transitoria durante los 2-3 primeros días tras la lesión del nervio periférico tanto en las motoneuronas como en las neuronas sensitivas (Gordon 2009).

En el tratamiento de las lesiones nerviosas periféricas se utiliza con frecuencia la estimulación eléctrica. Pues bien, se ha visto que una pauta de ejercicio diario moderado durante dos semanas puede tener efectos superiores a la estimulación eléctrica en la regeneración axónica del nervio periférico (Sabatier et al., 2008) y la combinación de ambos tiene efectos superiores sobre la regeneración axónica a los encontrados usando ambos por separado (Asensio-Pinilla et al., 2009). En ambos casos la efectividad del tratamiento depende de la capacidad de inducir la producción de BDNF por el músculo y de la expresión de TrkB a nivel de las células de Schwann a nivel de los nervios y de las motoneuronas medulares (Gordon, 2009; Zhang et al., 2000; Wilhelm et al., 2012; Willand et al., 2016). Así, se ha observado que la aplicación de estimulación eléctrica a un nervio lesionado produce un rápido y marcado incremento de la expresión de BDNF y TrkB en las motoneuronas. De la misma manera el ejercicio activo causa un aumento de la expresión de mRNA-BDNF en las motoneuronas de los nervios periféricos (Udina et al., 2011; Sabatier y English, 2015).

Experimentalmente se ha visto que dosis bajas de BDNF pueden contrarrestar los efectos de la axotomía crónica, favorecer la regeneración axónica y la formación de conexiones neuromusculares (Gordon et al., 2003). Por otro lado, la actividad electromiográfica del diafragma mejora sustancialmente en pacientes con lesión medular cervical tras la administración intratecal de BDNF o la implantación de células troncales modificadas que sobreexpresan BDNF; los efectos contrarios se obtienen cuando se bloquea el sistema TrkB/BDNF (Gill et al., 2015; Hernandez-Torres et al., 2017; Hayashi et al., 2019). Por otro lado, la implantación en el músculo diana de cócteles de factores de crecimiento, que incluyen el BDNF, aumentan la supervivencia de las motoneuronas en las lesiones nerviosas por aplastamiento (Glat et al., 2016).

La esclerosis lateral amiotrófica es una patología degenerativa de las motoneuronas del asta anterior de la médula, cuyos axones forman las placas motrices. En esta enfermedad se han encontrado niveles disminuidos de BDNF en los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (Tremolizzo et al., 2016) si bien la expresión de mRNA-BDNF en las biopsias musculares de estos pacientes no se modifica (Grundström et al., 1999) o está aumentada (Küst et al., 2002) lo que induce a pensar que la causa de la degeneración de motoneuronas en esta patología no está relacionada con un fallo en el aporte trófico por parte del tejido muscular.

Por último indicar que el BDNF también se ha puesto en relación con el dolor muscular crónico habiéndose sugerido que el gen del BDNF marca la vulnerabilidad para el dolor crónico y su persistencia, especialmente en situaciones de estrés (Generaal et al., 2016).

2.7. BDNF, envejecimiento y ejercicio

Se acepta con carácter general, en base a las evidencias científicas acumuladas, que el ejercicio tiene efectos beneficiosos sobre el cerebro, mejora la cognición y el estado de ánimo afectando a la sinaptogénesis, neurogénesis, plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria y parece ser que el BDNF es el responsable en la mediación de tales efectos y que los mismos son más potentes en hombres que en mujeres, si bien se producen en ambos sexos (Szuhany et al., 2015; Venezia et al., 2016). Además, estudios recientes han demostrado que diferentes miocinas liberadas por los músculos de ejercicio afectan la expresión de la síntesis de BDNF en el giro dentado del hipocampo (Phillips et al., 2014). En los sujetos ancianos y en los pacientes con distrofia muscular progresiva de tipo Steinert se han encontrado niveles reducidos de BDNF (Comim et al., 2015).

En la actualidad se dispone de numerosos datos obtenidos a partir de estudios en animales y en humanos que ligan el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas con cambios en los niveles centrales y periféricos de algunos factores tróficos, y en particular con el BDNF. Teniendo en cuenta que el ejercicio aumenta los niveles circulantes de BDNF (¿también a nivel cerebral?) y el papel de esta molécula en las funciones cognitivas, podría pensarse que el ejercicio mejoraría las funciones cerebrales deterioradas en el envejecimiento (Campos et al., 2016; Miyamoto et al., 2018).

El ejercicio en humanos aumenta las concentraciones séricas de BDNF (Rojas Vega et al., 2006), llegando hasta un 70-80% tanto en la circulación tanto cerebral como en la periférica, lo cual contribuye a optimizar el aprendizaje y la memoria (Rasmussen et al.,

2009; Loprinzi y Frith, 2018). Mediante técnicas de imagen no invasivas se ha observado el incremento de BDNF en las regiones específicas del cerebro antes y después del ejercicio (Krabbe et al., 2007; Seifert et al., 2010). Además, el ejercicio de resistencia se ha demostrado un estímulo eficaz para mejorar la función cognitiva en adultos mayores, y este efecto es mediado por el BDNF. Los trabajos de Walsh et al. (2016) demostraron un incremento del BDNF sérico inmediatamente después de ejercicio de resistencia en adultos mayores. También se ha visto que el entrenamiento mantenido aumenta BDNF en el hipocampo BDNF (Lee et al., 2017) y tiene un efecto positivo sobre la pérdida de memoria asociada a la edad (De la Rosa et al., 2019).

2.8. BDNF, patologías del sistema nervioso central y ejercicio

Las conexiones entre actividad física y neuroprotección, tanto en el sistema nervio central como el periférico, han sido estudiadas durante décadas, pero los mecanismos que subyacen a las mismas han comenzado a ser conocidos solo recientemente y en ellos parecen estar implicados los factores de crecimiento, especialmente el BDNF. El ejercicio sostenido y de intensidad moderada tiene efectos anti-inflamatorios y pro-regenerativos y mejora las funciones cognitivas y motoras propias del envejecimiento y las patologías neurodegenerativas (Cobianchi et al., 2016). Pero el ejercicio intenso se asocia con un aumento de las hormonas del estrés que pueden inhibir la expresión de BDNF que generalmente se incrementa con el ejercicio (Kreber y Griesbach, 2016).

Los niveles circulantes y locales de BDNF también están alterados en algunas patologías del sistema nervioso central y se ha demostrado que el ejercicio facilita la liberación de

moléculas que favorecen la neuroplasticidad y ofrecen protección contra el daño cerebral.

Así, se ha visto que el ejercicio aumenta los niveles sanguíneos de BDNF en la enfermedad de Parkinson (Hirsch et al., 2018) o en la esclerosis múltiple (Wens et al., 2016). Por otro lado, en las lesiones cerebrales traumáticas, el ejercicio intenso durante el período agudo post-lesión, mejora el rendimiento cognitivo y que esto puede verse favorecido por el ejercicio. En este sentido, recientemente Ryan et al. (2019) han demostrado que la hemiparesia debida a accidente vascular reduce la expresión de BDNF en el músculo esquelético.

Pero en pacientes con trastorno depresivo mayor el ejercicio físico no aumenta significativamente el BDNF (Kurebayashi y Otaki, 2018). Por otro lado, el BDNF se relaciona con el estrés y ambos interaccionado podrían estar en la del dolor crónico musculoesquelético. El estudio de Generaal et al. (2016) sugiere que el BDNF marca la vulnerabilidad para el dolor crónico.

3.

Hipótesis y objetivos

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: el músculo esquelético es una fuente de BDNF cuya producción se ve potenciada con el ejercicio y es independiente de la innervación.

El **objetivo general** del trabajo es contribuir al conocimiento de las neurotrofinas-miocinas musculares, y los **objetivos específicos** son los siguientes:

- 1.- Determinar si el músculo esquelético expresa en gen del BDNF y su receptor de alta afinidad TrkB.
- 2.- Establecer si el músculo esquelético contiene BDNF y receptor de alta afinidad TrkB y en qué células musculares se localiza.
- 3.- Analizar si el ejercicio de entrenamiento produce modificaciones en los niveles de BDNF a nivel de mRNA o de proteína en el músculo esquelético, en plasma y a nivel cerebral.
- 4.- Ver si las modificaciones en los niveles de BDNF a nivel de mRNA o de proteína en el músculo esquelético dependen de la innervación.
- 5.- Estudiar la estructura del músculo esquelético de ratones deficientes en BDNF y su receptor de alta afinidad TrkB.

4.

Material y técnicas

4. MATERIAL Y TECNICAS

4.1. Material

Para la realización del presente estudio se utilizaron ratones C57BL/6 obtenidos en el bioterio de la Universidad de Oviedo (nº: 33443591 en la Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias como centro de cría y usuario de animales de experimentación) de diferentes edades y sometidos a diferentes condiciones experimentales.

4.1.1. **Animales controles:** en el estudio se utilizaron animales machos de 10 (n = 5), 40 (n = 5), y 90 (n = 5), y 6 (n = 4) y 12 (n = 5) meses, que fueron mantenidos en condiciones estándar de estabulación, en jaulas de 5 animales cada una, con acceso libre a la comida y al agua.

4.1.2. **Animales sometidos a actividad física voluntaria:** animales de 10 días (n = 5), 60 días (n = 5) y 11 meses (n = 3) fueron estabulados en jaulas de 5 animales cada una, y sometidos a ejercicio voluntario en una rueda giratoria durante 30 días (Sistema de jaula de rueda de actividad para ratones, Techniplast, Buguggiate, Italia). El sistema permitía el registro continuo del número de vueltas de la rueda y, por lo tanto, el cálculo de la media de metros/día en cada jaula que, posteriormente, se dividía por el número de animales para establecer la actividad diaria por animal. La inspección periódica de las jaulas permitió comprobar que todos los animales utilizaban la rueda, si bien no fue posible determinar el tiempo y/o los metros recorridos por cada ratón de manera específica. Los ratones de control estaban estabulados en jaulas similares sin rueda de carrera.

4.1.3. **Animales con sección del nervio isquiático:** a grupos de 5 animales de 30 días, 80 días y 12 meses se procedió a la sección del nervio isquiático del lado derecho en el momento de su salida de la pelvis. Los animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (350 mg/kg) y en condiciones de asepsia se procedió a la sección del nervio. Los animales intervenidos fueron mantenidos en jaulas individuales para evitar agresiones y se les dejó sobrevivir durante 10 días transcurridos los cuales se procedió a su sacrificio.

4.1.4. **Animales deficientes en BDNF y TrkB:** se obtuvieron por cruces repetidos de animales heterocigóticos obtenidos en The Jackson Laboratory (600 Main Street Bar Harbor, Maine 04609 USA, JAX® Mice and Services 610 Main Street Bar Harbor, Maine 04609 USA). Solo un grupo reducido de animales sobrevivió hasta los 10 días y fueron utilizados en el presente estudio. Los animales fueron criados y mantenidos en el animalario de la Universidad de Oviedo, y se genotiparon a los 2 días de edad mediante PCR en los Servicios comunes de investigación de la Universidad de Oviedo.

La tabla 4.1. resume los grupos de animales utilizados en el trabajo.

Tabla 4.1. Grupos de animales utilizados en el trabajo

Controles	10 días (5)	40 días (5)	90 días (5)	6 meses (4)	12 meses (5)
Ejercicio voluntario		10 días + 30 días EV (5)	60 días + 30 días EV (5)		11 meses + 30 días EV (3)
Sección n. isquiático		30 días + 10 días SNI	80 días + 10 días SNI		12 meses + 10 días SNI
BDNF k.o.	10 días (3)				
TrkB k.o.	10 días (4)				

4.2. Recogida de las muestras

Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados por decapitación rápida tras anestesia con hidrato de cloral (350 mg/kg, i.p). De cada uno de los animales se obtuvieron las siguientes muestras biológicas:

- a) 0,5 ml de **sangre** central obtenida por punción cardiaca directa. De cada muestra se separó el plasma mediante microcentrifugación y se conservó el sobrenadante congelado a -80° C hasta el momento de su utilización.
- b) Músculo gastrocnemius, el del lado derecho de cada animal, ya que fue el estudiado en los casos de denervación. Los músculos se disecaron y aislaron inmediatamente después del sacrificio de los animales, se dividieron en fragmentos que se fijaron por inmersión en formol al 10%, en paraformadehido al 4%. La mitad de los fragmentos, aproximadamente, se homogenizaron (peso/volumen, 1:10) con tampón de fosfato frío 0,1 M (pH 7.4) que contenía un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los homogenizados centrifugaron a 2.000 g durante 5 min, y las alícuotas de los sobrenadantes se separaron y almacenaron a -80° C para su utilización posterior en los estudios de rt-PCR, Westernblot y ELISA.

Tabla 4.2. Muestras biológicas obtenidas de cada uno de los grupos de animales. **M:** músculo gastrocnemius; **S:** sangre; **C:** cerebro-hipocampo

Controles	10 días (5) M, S, C	40 días (5) M, S, C	90 días (5) M, S, C	6 meses (4) M, S, C	12 meses (5) M, S, C
Ejercicio voluntario		10 días + 30 días EV (5) M, S, C	60 días + 30 días EV (5) M, S, C		11 meses + 30 días EV (3) M, S, C
Sección n. isquiático		30 días + 10 días SIN M, S, C	80 días + 10 días SIN M, S, C		12 meses + 10 días SIN M, S, C
BDNF k.o.	10 días (3) M				
TrkB k.o.	10 días (4) M				

c) Cerebro: de las cabezas aisladas por decapitación se extrajo el cerebro y a continuación se aisló el hipocampo de ambos hemisferios (con algunas pequeñas cantidades de estructuras cerebrales circundantes). Las piezas se homogenizaron de la misma manera que la descrita para el músculo y se conservaron a -80° C hasta el momento de su utilización.

4.3. Técnicas

4.3.1. *rt-PCR: Expresión de los genes de BDNF y TrkB en músculo*

El RNA total se extrajo del músculo gastrocnemius utilizando TRI (Sigma; St. Louis, MO, USA) y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. El RNA extraído del músculo fue transcrito en reverso en un volumen final de 20 µl de Superscript RNA-ase H- Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) usando 20 U del rNA-ase h Transcriptase reverse (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) suplido por el fabricante que 2 µg de RNA, 5 µM oligo (dT)₁₂₋₁₈, mM dNTPS, 40 U de inhibidor de RNA-asa (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), 0.1 µg/µl de BSA y 10 mM de DTT. La reacción se realizó a 58° C durante 90 minutos. Las secuencias de los oligonucleotidos de los primers se basaron en las publicadas en GeneBank para el *trkB* (GenBank accession number X17647), *BDNF* (GeneBank accession number D16762), y β -actina (GenBank accession number M12481) del ratón. Las secuencias fueron:

BDNF: sense: 5'-GTTACTCTTTCTCTTGGAGGAATACAAAA-3';
 reverse: 5'-GTCATAACTGTCACAAACGTCGAGTT-3'

TrkB: sense: 5'-GGGGAAGGAGCCTTCGGG-3';
 reverse: 5'-CATCCATCGGATGGGCAACAT-3'

β -actina: sense 5'AACTGGGACGACATGGAGAA3'
Reverse 5' GGTCTCAAACATGATCTGGG3'

Las condiciones de la amplificación fueron: 2U Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), 1 μ M de los primers, 10 ng de cDNA de músculo de ratón (gastrocnemius), 0.2 mM de cada dNTP en 15 μ l y tampón de Taq DNA Polymerase. La reacción se realizó en un ciclador termico (Hyband Th. Cycler) con el siguiente programa: 1 minuto a 94 ° C para la desnaturalización inicial, seguido de 10 ciclos de 94° C de 1 minuto, 65° C durante 30 segundos y 72° C durante 45 segundos. Posteriormente se realizaron 20 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 61° C durante 30 segundos, 72° C durante 45 segundos y una extensión final de 5 minutos a 72° C. Los productos finales de la PCR se visualizaron por tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta tras electroforesis en gel de agarosa al 2%. Finalmente se realizaron los controles negativos para la transcripción reversa (reacción mixta sin RNA) y la PCR (reacción mixta sin cDNA).

Se secuenciaron con un GeneAmpPCR System 2700 (Applied Biosystems) con BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de PCR se realizaron en un analizador ABI PRISM 3100 Genetic y las secuencias determinadas con el DNA Sequencing Analysis Software™ Version 3.7 (Applied Biosystems).

4.3.2. *Westernblot: Presencia de BDNF y TrkB en músculo*

Para determinar la presencia de BDNF y TrkB en el músculo esquelético de los animales controles y experimentales, se realizó análisis de Westernblot sobre homogenizados de

tejido muscular fresco. Las muestras se trituraron de forma mecánica en frío y a continuación se homogenizaron (1: 2, p/v) en una solución salina de Tris-HCl (TBS; 0.1M, pH 7,5) que contenía 1 μ M de leupeptina, pepstatina 10 μ M y 2 mM de fluoruro de phenylmethylsulfonyl. Los homogenizados resultantes se centrifugaron a 25.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 ° C, y el sedimento resultante se disolvió en Tris HCl 10 mM, pH 6,8, SDS al 2%, dithiothreitol 100 mM y glicerol al 10%, a una temperatura de 4°C. Los sobrenadantes se analizaron por electroforesis en geles de SDS de poliacrilamida discontinuos del 15% y 8%, para BDNF y TrkB, respectivamente.

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se bloquearon por inmersión durante 3 h en PBS con leche en polvo desnatada al 5% y Tween-20 al 0,1%. A continuación, se incubaron las membranas a 4°C durante 2 horas con los anticuerpos primarios anti-BDNF y anti-TrkB, a una dilución de 1:1000 y 1:200, respectivamente. El anticuerpo anti-BDNF fue generado en conejo contra BDNF recombinante (Chemicon, Inc.; USA) y el anti-TrkB se generó en conejo contra los residuos 794-808 del TrkB humano (Santa Cruz Biotechnology, USA). Tras la incubación, las membranas se lavaron con una solución salina intermedia de Tris (pH 7.6) que contiene Tween-20 al 20%, y se incubaron de nuevo durante 1 hora con IgG de cabra anti-conejo (diluido 1/100) a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas de nuevo e incubadas con el complejo PAP diluido 100, durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se desarrolló y visualizó la reacción mediante un kit de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) y la exposición a Hyperfilm. Las proteínas se visualizaron por tinción con Brilliant Blue y los pesos moleculares de las mismas se determinaron en base a los estándares oportunos.

4.2.3. *Inmunohistoquímica: localización celular de BDNF y TrkB en músculo*

Las piezas de músculo incluidas en parafina se cortaron a un grosor de 10 μm , y los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados. Para el estudio de inmunohistoquímica se utilizó el método de la peroxidasa indirecta con el kit de alta sensibilidad EnVision (Dako, Copenhague, Dinamarca).

Una vez desparafinados (en etanoles de gradación creciente y dos baños de xilol) y rehidratados, los cortes se lavaron en búfer Tris-HCl (0.05M, pH 7,5) que contenía seroalbúmina bovina al 0,1% y Tritón-X 100 al 0,2%. A continuación, se bloquearon la actividad de la peroxidasa endógena (H_2O_2 al 3%) y las uniones no específicas (suero bovino fetal al 25%) y se procedió a la incubación de los cortes durante 24 horas con los anticuerpos primarios anti-BDNF y anti-TrkB descritos previamente, ambos a una dilución de 1:100. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron los cortes en Tris-HCl y se incubaron durante 1 hora, a temperatura ambiente, con IgG de cabra anti-conejo (Amersham) ligada a peroxidasa, a una dilución de 1: 100. Finalmente se lavaron los cortes en búfer Tris-HCl y se visualizó la peroxidasa usando 3-3 ' DAB como cromógeno.

La especificidad de la inmunoreacción desarrollada se comprobó sustituyendo el anticuerpo primario por un suero específicamente preabsorbido, a por un suero de conejo preinmune. Para establecer los detalles estructurales la mayoría de los cortes fueron contrastados con hematoxilina de Harris.

4.3.3. *ELISA: cuantificación de BDNF en músculo y cerebro*

Los niveles de BDNF se analizaron en los músculos rectus femoris, gastrocnemius, plasma sanguíneo y cerebro utilizando el kit comercial BDNF, ELISA Kit MBS355435 MSDS BDNF, ELISA Kit MBS355435 MSDS (Biosource, Wilmington, DE, USA), de 96 pocillos, siguiendo las instrucciones del fabricante, que detecta en rangos de 31.2 pg/ml-2000 pg/ml, con una sensibilidad menor a < 2 pg/ml). Se trata de un kit ELISA preparado para su utilización basado en la detección del BDNF nativo, no recombinante, mediante un sistema de un anticuerpo policlonal anti-BDNF conjugado con biotina. Las placas se leyeron en un lector de microplacas a una absorbancia O.D. a 450 nm para calcular las concentraciones de BDNF.

4.2.5. *Estudio estructural y ultraestructural*

Muestras del músculo gastrocnemius de los animales deficientes en fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión. Las piezas fijadas en paraformaldehído al 4% las piezas se lavaron en tampón PBS 0.1 M, pH 7.5 (durante 2 días, renovado cada 6 horas). A continuación, se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% y se procesaron de manera rutinaria para la inclusión en Durcupan® ACM (Fluka, Buchs SG, Suiza). Los bloques se cortaron en un ultramicrotomo Reichert Jung Ultracut E, obteniéndose secciones semifinas de 1µm de grosor que se tiñeron con azul de toluidina se se examinaron al microscopio óptico para seleccionar los campos de interés. A continuación, se obtuvieron los cortes ultrafinos (400Å) que fueron teñidas con acetato de uranilo-citrato de plomo y examinados y fotografiados en un microscopio electrónico JEOL-JEM-T8.

4.4. Estudio estadístico

Los resultados se expresaron como valores de la media \pm SEM. Se realizó un test de ANOVA unidireccional o de doble sentido seguido de pruebas *post hoc* Bonferroni, Newman-Keuls o Dunnett se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 4. Las variaciones edad-dependientes temporales se analizaron utilizando ANOVAS de medidas repetidas utilizando el software SPSS. Valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados como significativos.

5.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. El músculo esquelético del ratón expresa *bdnf* y *trkB* y contiene BDNF y TrkB

Los resultados del estudio de rt-PCR han puesto de evidencia que en el músculo gastrocnemius del ratón expresa *BDNF* y *TrkB*. Tomando como referencias los valores encontrados en los animales de 10 días, en el resto de las edades investigadas se ha observado la expresión de *BDNF* con regulación a la baja, salvo en los animales de 12 meses que estaba regulado a la alta, aunque sin grandes cambios entre las diferentes edades (Tabla 5.1). En cuanto al *trkB*, tomando igualmente como valores de referencia los de los animales de 10 días de edad, no se han observado modificaciones edad-dependientes en la expresión de este gen (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Resultados del estudio de rt-PCR en el músculo gastrocnemius de ratón a diferentes edades. Las variaciones en la expresión de ambos genes se expresan en unidades relativas respecto a los valores de 10 días.

Controles	10 días (5)	40 días (5)	90 días (5)	6 meses (4)	12 meses (5)
<i>BDNF</i>	1	-1,6	-1,2	-1,8	+1,8
<i>trkB</i>	1	1,3	1	1	-0.6

El paso siguiente fue investigar si el BDNF y el TrkB también se expresan a nivel proteico en el músculo gastrocnemius de ratones de diferentes edades. Mediante Westernblot en muestras correspondientes a animales de 10 días, 90 días y 12 meses hemos observado que en los homogenizados musculares, con el anticuerpo indicado, se detecta una banda proteica con un peso molecular estimado de 14-16 kDa que es el esperado para el BDNF de ratón (Fig. 5.1.A). Por otro lado, en los homogenizados musculares también se ha detectado con el anticuerpo correspondiente, una proteína

con un peso molecular estimado de 145-148 kDa, que es el correspondiente a la forma completa, no truncada, del TrkB (Fig. 5.1.B).

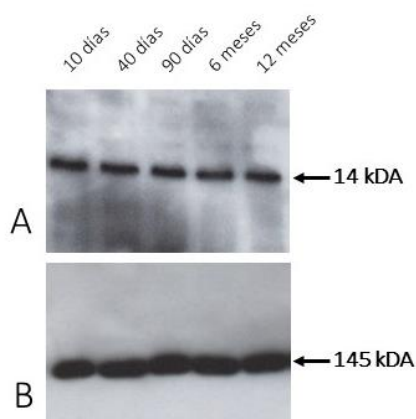


Figura 5.1. Westernblot en hogenizados de músculo gastrocnemius de ratón de diferentes edades con anticuerpos contra BDNF (A) y TrkB (B).

Inmediatamente después se cuantificaron las cantidades de BDNF en los homogenizados del músculo gastrocnemius de ratón mediante ELISA. En consonancia con los resultados previos, a todas las edades analizadas se ha detectado la presencia de BDNF muscular que se incrementa desde los animales de 10 días a los de 40, adquiere los valores máximos a los 90 días, y desciende a los 6 meses y aún más a los 12 meses (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Cantidades de BDNF en el músculo gastrocnemius de ratón a diferentes edades determinado por ELISA. Las cantidades se expresan en pg/ml

Controles	10 días (5)	40 días (5)	90 días (5)	6 meses (4)	12 meses (5)
BDNF	76 ± 15	129 ± 22	216 ± 319	197 ± 31	104 ± 26

Finalmente, quisimos conocer si mediante técnicas de inmunohistoquímica y utilizando los anticuerpos indicados en el apartado de Material y Técnicas, era posible detectar el BDNF y el TrkB en el músculo gastrocnemius del músculo y en qué célula se encontraba. Esta parte del estudio se realizó sobre secciones de músculo de los animales de 10 días,

90 días y 12 meses. En ningún caso se pudo detectar inmunorreacción específica para BDNF (datos no mostrados). Por el contrario, en las secciones de músculo de los ratones, con independencia de la edad, se ha detectado la presencia de TrkB aparentemente asociado con el aparato nervioso intramuscular en particular en las proximidades de los husos neuromusculares (Fig. 5.2).

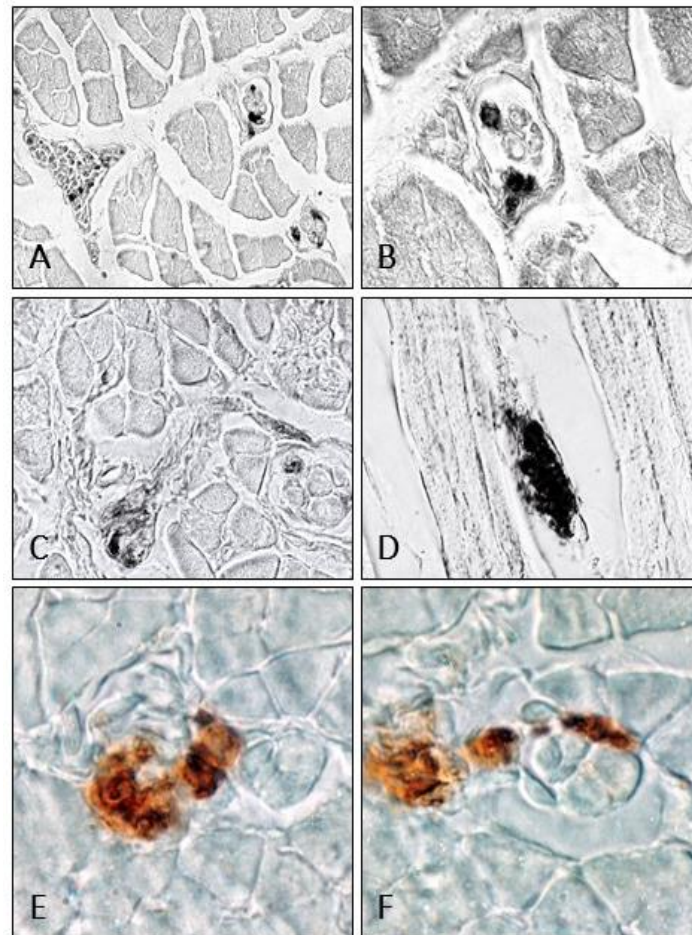


Figura 5.1. Detección inmunohistoquímica de la inmunorreacción para TrkB en el aparato nervioso del músculo gastrocnemius de ratones de 40 días (A-D) y 6 meses de edad (E-F).

5.2. El ejercicio incrementa los niveles de BDNF en plasma, músculo y cerebro

Uno de los mecanismos mediante los cuales se cree que el ejercicio puede aumentar la masa muscular, ejercer sus efectos metabólicos y actuar sobre la función cerebral es por medio de la liberación de la neurotrofina-miocina BDNF. Para confirmar estos

hechos se pusieron grupos de ratones de diferentes edades durante 30 días en condiciones que pudieran realizar ejercicio voluntario mediante una rueda. Las distancias medias recorridas por los animales de cada grupo de edad fueron de: 17,2 km/semana para los animales de 30 días, $15,6 \pm 2,1$ km/semana los de 90 días y 11,2 km/semana los de 12 meses. Estos resultados son similares a los descritos por otros autores en experimentos de entrenamiento semejantes (García-Mesa et al., 2011).

Después de la realización de un periodo de entrenamiento de 30 días todos los grupos de animales se produjo un notable incremento en los niveles de BDNF muscular que fue más evidente en los animales jóvenes y en los viejos que en los adultos (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Cantidades de BDNF en el músculo gastrocnemius de ratón a diferentes edades determinado por ELISA en condiciones de normalidad y después del acceso a ejercicio voluntario de 30 días. Las cantidades se expresan en pg/ml

Controles	10 días (5)	40 días (5)	90 días (5)	6 meses (4)	12 meses (5)
BDNF	76 ± 15	129 ± 22	216 ± 19	197 ± 31	104 ± 26
EJERCICIO VOLUNTARIO		10 días + 30 días EV (5)	60 días + 30 días EV (5)		11 meses + 30 días EV (3)
BDNF		304 ± 27	289 ± 14		236 ± 24

Tabla 5.4. Cantidades de BDNF en el plasma sanguíneo de ratón a diferentes edades determinado por ELISA en condiciones de normalidad y después del acceso a ejercicio voluntario de 30 días. Las cantidades se expresan en pg/ml. Nd: no detectable

Controles	10 días (5)	40 días (5)	90 días (5)	6 meses (4)	12 meses (5)
BDNF	nd	86 ± 8	184 ± 17	205 ± 10	61 ± 9
EJERCICIO VOLUNTARIO		10 días + 30 días EV (5)	60 días + 30 días EV (5)		11 meses + 30 días EV (3)
BDNF		192 ± 14	383 ± 24		144 ± 21

En cuanto al plasma los valores detectados en los animales controles son menores que en el músculo, con la excepción del grupo de edad de 6 meses. Es de destacar que en los animales del grupo de edad más joven el BDNF fue indetectable en sangre. Tras la

realización de 30 días de ejercicio, para las edades estudiadas, los valores de BDNF plasmático duplicaron sus valores (Tabla 5.4).

De las tres muestras biológicas estudiadas, los valores más elevados de BDNF se encontraron en el cerebro observándose los valores más altos en los animales más jóvenes y los más bajos en los animales viejos de 12 meses. En el hipocampo-cerebro las cantidades de BDNF también aumentan con el ejercicio destacando el incremento en los animales de mayor edad (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Cantidades de BDNF en el hipocampo-cerebro de ratón a diferentes edades determinado por ELISA en condiciones de normalidad y después del acceso a ejercicio voluntario de 30 días. Las cantidades se expresan en pg/ml

Controles	10 días (5)	40 días (5)	90 días (5)	6 meses (4)	12 meses (5)
BDNF	512 ± 28	436 ± 36	470 ± 16	426 ± 16	214 ± 24
EJERCICIO VOLUNTARIO		10 días + 30 días EV (5)	60 días + 30 días EV (5)		11 meses + 30 días EV (3)
BDNF		530 ± 27	546 ± 23		348 ± 31

En conjunto pues, puede firmarse que el ejercicio aumenta los niveles de BDNF en músculo, plasma y cerebro, siendo especialmente relevantes los aumentos en los animales de mayor edad.

5.3. Los niveles de BDNF en plasma y cerebro no se ven afectados por la denervación muscular, pero si los musculares

La actividad de los músculos esqueléticos viene determinada por la integridad del sistema nervioso que los supe. Para establecer si los niveles musculares, plasmáticos y cerebrales de BDNF se ven influenciados por las lesiones nerviosas periféricas, se realizó la sección unilateral del nervio isquiático en ratones de diferentes edades y se estudió el BDNF 10 días más tarde. Ni los valores de BDNF plasmáticos (Tabla 5.6) ni los cerebrales

(Tabla 5.7) varían tras la denervación. Estos hallazgos son lógicos si se tiene en consideración que la mayor parte de la masa muscular de los animales posee una inervación normal.

Tabla 5.6. Cantidades de BDNF en el plasma sanguíneo de ratón a diferentes edades determinado por ELISA en condiciones de normalidad y después de sección del nervio isquiático 10 días. Las cantidades se expresan en pg/ml. Nd: no detectable

Controles	10 días (5)	40 días (5)	90 días (5)	6 meses (4)	12 meses (5)
BDNF	nd	86 ± 8	184 ± 17	205 ± 10	61 ± 9
SECCION NERVIOSQUIATICO		30 días + 10 días SNI	80 días + 10 días SNI		12 meses + 10 días SNI
BDNF		79 ± 6	186 ± 19		73 ± 6

Tabla 5.7. Cantidades de BDNF en el hipocampo-cerebro de ratón a diferentes edades determinado por ELISA en condiciones de normalidad y después de sección del nervio isquiático 10 días. Las cantidades se expresan en pg/ml.

Controles	10 días (5)	40 días (5)	90 días (5)	6 meses (4)	12 meses (5)
BDNF	512 ± 28	436 ± 36	470 ± 16	426 ± 16	214 ± 24
SECCION NERVIOSQUIATICO		30 días + 10 días SNI	80 días + 10 días SNI		12 meses + 10 días SNI
BDNF		452 ± 28	481 ± 21		201 ± 16

Por el contrario en los músculos gastrocnemius denervados se produce una notable reducción en las cantidades de BDNF (Tabla 5.8) indicando claramente que la inervación regula, directa o indirectamente, es decir por los propios nervios o por la ausencia de actividad, los niveles musculares de BDNF.

Tabla 5.8. Cantidades de BDNF en el músculo gastrocnemius de ratón a diferentes edades determinado por ELISA en condiciones de normalidad y después y después de sección del nervio isquiático 10 días. Las cantidades se expresan en pg/ml.

Controles	10 días (5)	40 días (5)	90 días (5)	6 meses (4)	12 meses (5)
BDNF	76 ± 15	129 ± 22	216 ± 19	197 ± 31	104 ± 26
SECCION NERVIOSQUIATICO		30 días + 10 días SNI	80 días + 10 días SNI		12 meses + 10 días SNI
BDNF		100 ± 13	167 ± 21		72 ± 9

5.4. La estructura del músculo esquelético no se afecta por el déficit de TrkB y levemente por la ausencia de BDNF

La última parte del estudio consistió en el análisis de la estructura y ultraestructura del músculo gastrocnemius de ratones de 10 días de edad, portadores de mutaciones no funcionantes en los genes que codifican para BDNF y TrkB. Esta parte del trabajo puede arrojar luz sobre el papel del BDNF y su receptor en la formación del aparato nervioso del músculo y de las propias fibras musculares.

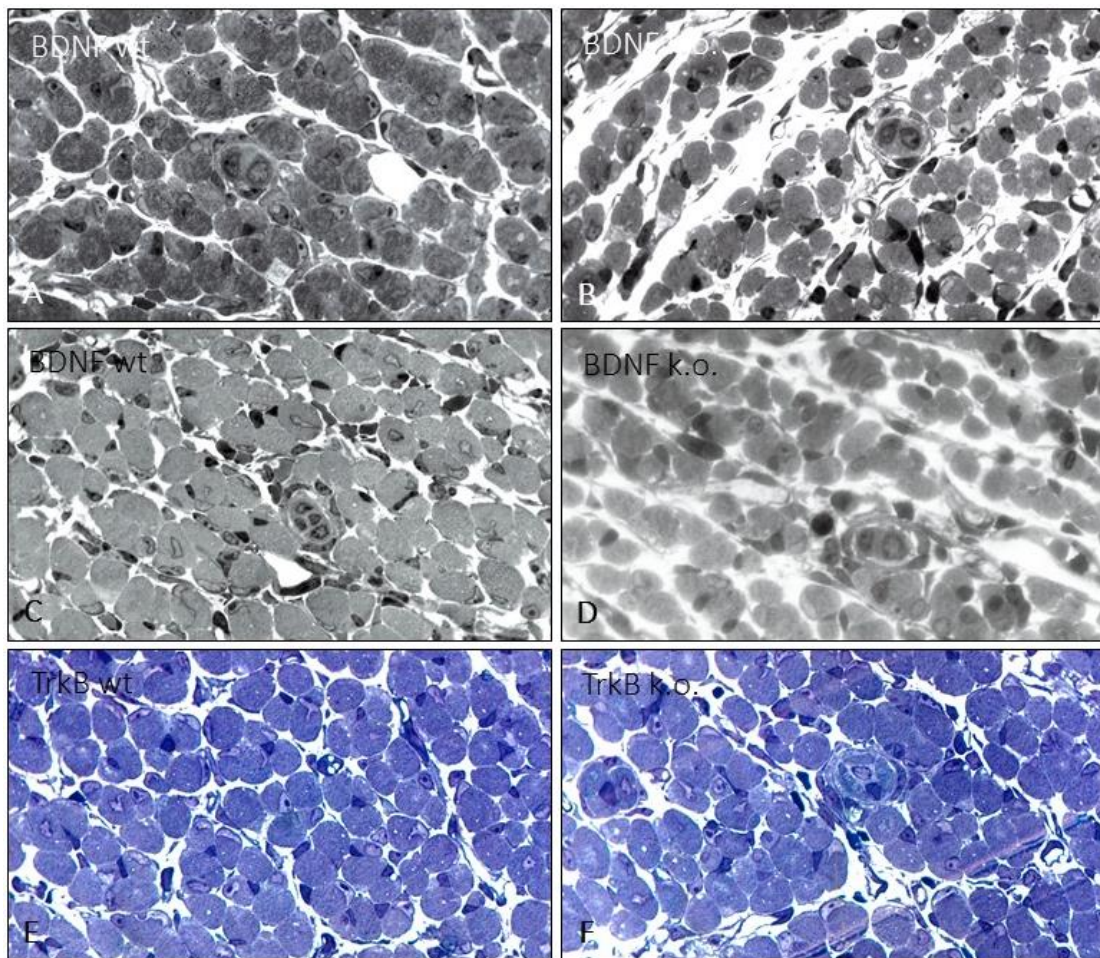


Figura 5.2. Estructura del músculo gastrocnemius de ratons de 10 días de genotipo salvaje (A,C,E) y portadores de una mutación no funcional en los genes que codifican para BDNF (B,D) y TrkB (F)

A nivel estructural, en los músculos de los animales portadores de una mutación en el gen que codifica para BDNF se ha observado un menor tamaño de las células musculares con aumento de los espacios intercelulares. Aparentemente, no hay alteraciones en la morfología de las fibras nerviosas que llegan al músculo y los husos neuromusculares están bien desarrollados y presentan una morfología idéntica a la de los animales de genotipo salvaje (Fig. 5.2A-D). Por lo que respecta a los animales deficientes en TrkB, no se han apreciado diferencias respecto a los animales de genotipo salvaje (Fig. 5.2E-F).

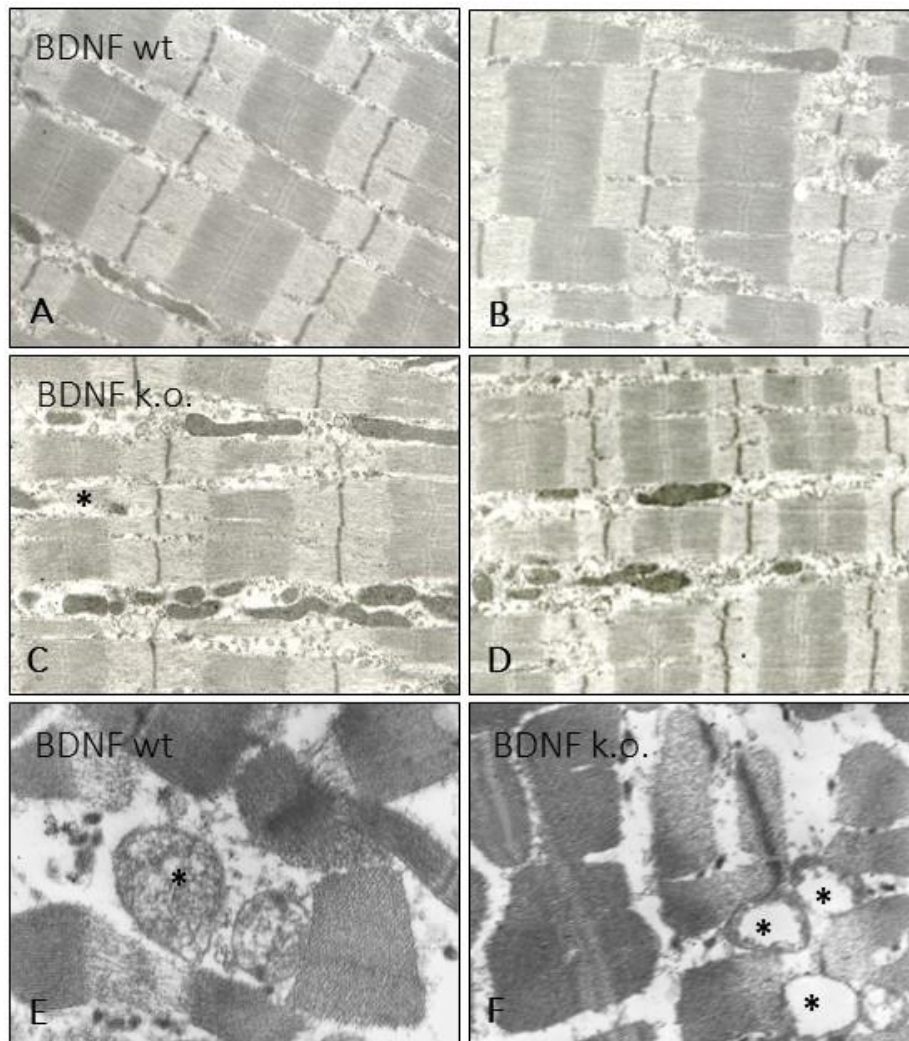


Figura 5.3. Estructura del músculo gastrocnemius de ratons de 10 días de genotipo salvaje (A,B,E) y portadores de una mutación no funcional el gen que codifica para BDNF (C,D,F)

Cuando se analiza la ultraestructura de los músculos de los animales deficientes en BDNF se observa que en los espacios intercelulares hay pequeños acúmulos de material electrón denso, de naturaleza desconocida, pero los sarcómeros poseen un aspecto compatible con la normalidad (Fig. 5.3A-D). Ocasionalmente en algunas células musculares se han observado anomalías mitocondriales (Fig. 5.3E-F).

En general, pues, puede afirmarse que el músculo esquelético humano expresa BDNF a nivel de mRNA y proteico, que la cantidad de proteína detectable tiene variaciones con la edad, estando reducida en los animales más viejos. El ejercicio, por su lado, eleva los niveles de BDNF en el músculo, especialmente en los sujetos viejos, y la denervación reduce los niveles de BDNF proteico muscular.

6.

Discusión

6. DISCUSIÓN

6.1. Consideraciones generales

Durante las últimas décadas están cambiando radicalmente los conceptos y conocimientos de la fisiología del músculo esquelético. Las últimas investigaciones demuestran que, además de su papel sobre las palancas óseas, y por tanto en el movimiento, es un órgano endocrino orquestador del metabolismo, que libera moléculas que ejercen una acción a distancia en los diferentes órganos diana así como una acción paracrina en el propio tejido muscular (Iizuka et al., 2014; Jiménez-Maldonado et al., 2018; Legard y Pedersen, 2019). En este contexto, el BDNF a pasado de ser una neurotrofina en el sentido clásico de término, a una miocina o “factor de ejercicio” con acciones bien establecidas sobre el metabolismo, inflamación o el sistema inmunitario (Pedersen, 2011, 2019; Delezie y Handschin, 2018; Lee y Jun, 2019).

El BDNF muscular ejerce sus funciones de forma paracrina/autocrina y endocrina. Las primeras pueden estar implicadas en la miogénesis y consecuentemente en los procesos de reparación muscular después de lesiones o en situaciones en las que se produce sarcopenia, como por ejemplo en el envejecimiento. Las que ejerce a distancia regulan diferentes tejidos y órganos, entre ellos el cerebro. Por ello si se logra conocer en detalle cómo funciona el sistema BDNF/TrkB muscular y se potencia su funcionamiento, se pueden lograr importantes beneficios terapéuticos sobre todo en la vejez, cuando la masa muscular y algunas funciones cognitivas se deterioran. Por otro

lado, los estudios de denervación muscular que hemos realizado pueden arrojar luz sobre si la parálisis muscular repercute en los niveles circulantes del BDNF (es decir, sobre sus funciones endocrinas) o sólo en los locales (es decir, sobre su componente de autocrinia/paracrinia). El presente trabajo de tesis doctoral está enfocado en este sentido.

6.2. [Discusión de los resultados](#)

En nuestro trabajo hemos demostrado que el músculo esquelético del ratón expresa a niveles básicos el gen del BDNF y del TrkB y ninguno de ellos sufre cambios significativos de expresión a lo largo de la vida. No obstante, la expresión del gen de BDNF presenta disminuciones hasta los 6 meses y una ligera sobreexpresión en los animales más viejos; el comportamiento del gen del TrkB fue paralelo y en sentido contrario. Por tanto, estos hallazgos sugieren que ambos componentes del sistema pueden regularse por diferentes factores a lo largo de la vida. También hemos comprobado que BDNF y TrkB están presentes en el músculo esquelético a nivel de proteína a todas las edades analizadas. Las cantidades de BDNF muscular crecen progresivamente hasta los 6 meses de edad y están disminuidos respecto a los adultos, pero más elevados que en los jóvenes. Hasta donde nosotros conocemos es la primera vez que se describen los cambios edad dependientes en a nivel de mRNA y proteína en los músculos esqueléticos del ratón.

No hemos podido detectar mediante inmunohistoquímica la presencia de BDNF en el músculo esquelético. Algunos autores encuentran BDNF en las células musculares satélites (Mousavi et al., 2004; Omura et al., 2005) sobre las que participa en su

diferenciación). En base a nuestros hallazgos no podemos confirmar esos extremos. Por el contrario, si hemos detectado TrkB en el aparato nervio intramuscular y no en los miocitos, tal como ya habían observado Colombo et al. (2013), ya que según estos autores en el músculo BDNF señala por medio de p75NTR y no de TrkB. Al microscopio óptico no se puede descartar que parte de la inmunorreacción para TrkB observada se localice en las placas motrices, y se conoce que BDNF actuando a través de TrkB potencia la transmisión neuromuscular (Greising et al., 2015).

Una de las observaciones más importantes de nuestro estudio fue que el ejercicio físico, con la forma de entrenamiento realizada (30 días de ejercicio voluntario) eleva los niveles de BDNF en músculo, plasma y cerebro. Hay que aclarar desde el este momento que los incrementos en plasma no tienen por qué deberse a fuentes musculares exclusivamente ya que también puede proceder de fuentes cutáneas o viscerales (Lommatzsch et al., 2005). Y en cuanto al BDNF cerebral el incremento puede ser debido a una elevación sistémica o local cerebral. De cualquier manera, numerosos estudios apoyan que la elevación de BDNF circulante que se produce después del ejercicio es de origen muscular.

Los hallazgos de nuestro estudio relativos a el aumento del BDNF en el músculo como consecuencia del ejercicio están de acuerdo con los de Yu et al. (2017) y de Matthews et al. (2009) que vieron que el ejercicio eleva de la expresión de mRNA-BDNF y del BDNF musculares. Pero no podemos afirmar si la mayor o menor expresión de BDNF condicionada por el ejercicio depende del tipo de fibras (Jiménez-Maldonado et al.,

2016) ni tampoco si los cambios guardan relación con la modalidad de ejercicio (Jiménez-Maldonado et al., 2018; Antunes et al., 2019)

También hemos encontrado, en consonancia con la mayoría de las investigaciones, que el ejercicio aumenta los niveles plasmáticos de BDNF (Ferris et al., 2007; Yarrow et al., 2010; Yu et al., 2017; Pereira et al., 2018). Pero no faltan estudios que no encuentran cambios ni en el BDNF y la expresión del gen de BDNF después del ejercicio (Walsh et al., 2015).

Otro hallazgo de sumo interés es el aumento en la cantidad de BDNF en el hipocampo-cerebro tras el ejercicio; y aunque la elevación se encuentra en todas las edades fue particularmente significativa en los animales de mayor edad.

Actualmente se acepta que el ejercicio mejora las funciones cognitivas y que esta mejoría se debe, entre otras cosas, a un aumento del BDNF cerebral que favorece la neurogénesis y sinaptogénesis en el adulto y la plasticidad sináptica (Szuhany et al., 2015; Venezia et al., 2016; Kim et al., 2019). Pero como ya comentamos en párrafos anteriores no se sabe si el aumento en cerebro es por el BDNF sanguíneo (Rojas Vega et al., 2006; Rasmussen et al., 2009; Loprinzi y Frith, 2018) o por síntesis local. Recientemente se ha demostrado que las miocinas liberadas por los músculos tras el ejercicio regulan la síntesis de BDNF en el giro dentado del hipocampo (Phillips et al., 2014). Y utilizando técnicas de imagen no invasivas se ha observado el incremento de BDNF en las regiones específicas del cerebro después del ejercicio (Krabbe et al., 2007; Seifert et al., 2010).

Nuestros hallazgos, dado el papel que el BDNF desarrolla en el cerebro, sugieren que el ejercicio puede ser una excelente terapia para mejorar las funciones cognitivas deterioradas en el curso del envejecimiento normal y en las enfermedades neurodegenerativas que cada vez tienen mayor incidencia en la población (Campos et al., 2016; Miyamoto et al., 2018).

Hasta donde nosotros conocemos no existen estudios que vinculen la expresión y cantidad de BDNF muscular a la inervación. Nuestro estudio es el primero en demostrar que la inervación reduce de forma dramática el BDNF muscular. Este dato debe de ser analizado en profundidad en futuros estudios ya que podría tener interés en la recuperación funcional en pacientes que hayan sufrido lesiones nerviosas o medulares, ya que BDNF favorece la regeneración axónica en estas situaciones (Sabatier et al., 2008; Gordon, 2009; Zhang et al., 2000; Wilhelm et al., 2012; Willand et al., 2016).

Por último, hemos analizado la estructura y ultraestructura de los músculos de animales deficientes en BDNF y TrkB. Mientras que los segundos fueron completamente normales, los de los animales deficientes en BDNF mostraron cambios estructurales relacionados posiblemente con la función de autocrinia/paracrinia dentro del músculo. Pero teniendo en cuenta que no se conoce ninguna miopatía asociada a la ausencia de BDNF no se puede explicar el origen de los cambios observados y son necesarios ulteriores estudios para aclararlos.

6.3. Limitaciones del estudio y futuras línea de investigación

Aunque se han cumplido los objetivos propuestos al inicio del trabajo, a lo largo del desarrollo del mismo se han ido apreciado algunas deficiencias en el modelo que serán subsanadas en estudios próximos. Consideramos que es imprescindible incrementar el número de animales para llegar a conclusiones definitivas y poder establecer la significación estadística de los resultados.

Por otro lado, somos conscientes de que los resultados obtenidos en ratón nunca son extrapolables a humanos. Por ello, dado el interés de los hallazgos, nos planteamos en un futuro próximo repetir el estudio en sangre de sujetos voluntarios.

7.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

Tras el análisis detallado de los datos obtenidos de la experimentación y de la oportuna discusión de los mismos con los datos existentes en la literatura científica, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- El músculo esquelético del ratón expresa los dos componentes del sistema de neurotrofinas BDNF/TrkB a nivel de mRNA y de proteína, y ambos son detectables a lo largo de las diferentes edades analizadas (desde los 10 días hasta los 12 meses).
- 2.- El BDNF fue indetectable mediante técnicas de inmunohistoquímica en el músculo esquelético y el TrkB se localizó en células del aparato nervioso intramuscular.
- 3.- El entrenamiento, mediante ejercicio voluntario, durante 30 días produce aumento de los niveles proteicos de BDNF en músculo, plasma y cerebro, siendo las elevaciones más significativas en los animales de mayor edad.
- 4.- Los niveles de BDNF muscular son regulados al menos en parte por la inervación, ya que la sección del nervio isquiático los reduce significativamente en el tejido muscular pero no en plasma o cerebro.
- 5.- La estructura y ultraestructura del músculo esquelético y del aparato nervioso intramuscular, incluidos los husos neuromusculares, del ratón no se ve afectada por el déficit de TrkB, mientras que en los animales deficientes en BDNF se ven afectadas las células

musculares son de menor tamaño, la matriz extracelular está aumentada y muestras alteraciones mitocondriales.

8.

Bibliografia

8. BIBLIOGRAFIA

- Antunes BM, Rossi FE, Teixeira AM, Lira FS. Short-time high-intensity exercise increases peripheral BDNF in a physical fitness-dependent way in healthy men. *Eur J Sport Sci.* 2019 May 4:1-8.
- Asensio-Pinilla E, Udina E, Jaramillo J, Navarro X. Electrical stimulation combined with exercise increase axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Exp Neurol.* 2009; 219: 258-65.
- Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 7: 148-55.
- Bandtlow C Dechant G. From cell death to neuronal regeneration, effects of the p75 neurotrophin receptor depend on interactions with partner subunits. *Sci STKE* 2004; 235 (pe) 24.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982; 15: 549-53.
- Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors.* 2004; 22:123-31.
- Botchkarev VA, Metz M, Botchkareva NV, Welker P, Lommatzsch M, Renz H, Paus R. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 act as “epitheliotrophins” in murine skin. *Lab Invest.* 1999; 79: 557-72.
- Bronfman FC, Fainzilber M. Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep.* 2004; 5: 867-71.
- Campos C, Rocha NB, Lattari E, Paes F, Nardi AE, Machado S. Exercise-induced neuroprotective effects on neurodegenerative diseases: the key role of trophic factors. *Expert Rev Neurother.* 2016; 6:1-12.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4: 299-309.
- Chevrel G, Hohlfeld R, Sendtner M. The role of neurotrophins in muscle under physiological and pathological conditions. *Muscle Nerve* 2006; 33, 462-76.
- Clow C, Jasmin BJ. Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration. *Mol Biol Cell.* 2010; 21: 2182-90.

- Cobianchi S, Arbat-Plana A, López-Álvarez VM, Navarro X. Neuroprotective effects of exercise treatments after injury: the dual role of neurotrophic factors. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(4):495-518.
- Colombo E, Bedogni F, Lorenzetti I, Landsberger N, Previtali SC, Farina C. Autocrine and immune cell-derived BDNF in human skeletal muscle: implications for myogenesis and tissue regeneration. *J Pathol*. 2013; 231:190-8.
- Comim CM, Mathia GB, Hoepers A, Tuon L, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Rosa MI. Neurotrophins, cytokines, oxidative parameters and functionality in Progressive Muscular Dystrophies. *An Acad Bras Cienc*. 2015; 87:1809-18.
- Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*. 2002; 5: 1131-6.
- De la Rosa A, Solana E, Corpas R, Bartrés-Faz D, Pallàs M, Vina J, Sanfeliu C, Gomez-Cabrera MC. Long-term exercise training improves memory in middle-aged men and modulates peripheral levels of BDNF and Cathepsin B. *Sci Rep*. 2019; 9(1):3337.
- Delezie J, Handschin C. Endocrine Crosstalk Between Skeletal Muscle and the Brain. *Front Neurol*. 2018; 9:698.
- Deng P, Anderson JD, Yu AS, Annett G, Fink KD, Nolte JA. Engineered BDNF producing cells as a potential treatment for neurologic disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2016; 16:1025-33.
- De Vincenti AP, Ríos AS, Paratcha G, Ledda F. Mechanisms That Modulate and Diversify BDNF Functions: Implications for Hippocampal Synaptic Plasticity. *Front Cell Neurosci*. 2019; 13:135.
- Ferris LT, Williams JS, Shen CL. The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. *Med Sci Sports Exerc*. 2007; 39: 728-34.
- Fiuza-Luces C, Garatachea N, Berger NA, Lucia A. Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)*. 2013; 28:330-58.
- Fried K, Nosrat C, Lillesaar C, Hildebrand C. Molecular signaling and pulpal nerve development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11: 318-32.
- García-Cosamalón J, del Valle ME, Calavia MG, García-Suárez O, López-Muñiz A, Otero J, Vega JA. Intervertebral disc, sensory nerves and neurotrophins: who is who in discogenic pain? *J Anat*. 2010; 217: 1-15.

- García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, Laferla FM, Cristòfol R, Delgado-García JM, Sanfeliu C. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis.* 2011; 24: 421-54.
- García-Suárez O, Blanco-Gelaz MA, López ML, Germanà A, Cabo R, Silos-Santiago I, Ciriaco E, Vega JA. Massive lymphocyte apoptosis in the thymus of functionally deficient TrkB mice. *J Neuroimmunol.* 2002; 129: 25-34.
- García-Suárez O, Germanà A, Hannestad J, Ciriaco E, Laurà R, Naves J, Esteban I, Silos-Santiago I, Vega JA. TrkA is necessary for the normal development of the murine thymus. *J Neuroimmunol.* 2000; 108: 11-21.
- García-Suárez O, González-Martínez T, Germaná A, Monjil DF, Torrecilla JR, Laurá R, Silos-Santiago I, Guate JL, Vega JA. Expresión of TrkB in the murine kidney. *Microsc Res Tech* 2006a; 69: 1014-20.
- García-Suárez O, González-Martínez T, Pérez-Pérez M, Germaná A, Blanco-Gélaz MA, Monjil DF, Ciriaco E, Silos-Santiago I, Vega JA. Expresión of neurotrophin receptor TrkB in the mouse liver. *Anat Embryol (Berl).* 2006b; 211: 465-73.
- García-Suárez O, Pérez-Pinera P, Laurà R, Germana A, Esteban I, Cabo R, Silos-Santiago I, Cobo JL, Vega JA. TrkB is necessary for the normal development of the lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009; 167: 281-91.
- Generaal E, Milaneschi Y, Jansen R, Elzinga BM, Dekker J, Penninx BW. The brain-derived neurotrophic factor pathway, life stress, and chronic multi-site musculoskeletal pain. *Mol Pain.* 2016; 12: 1-9.
- Gill LC, Gransee HM, Sieck GC, Mantilla CB. Functional recovery after cervical spinal cord injury: Role of neurotrophin and glutamatergic signaling in phrenic motoneurons. *Respir Physiol Neurobiol.* 2016; 226: 128-36.
- Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus* 2009; 26: E3.
- Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 2003; 8:236-50.
- Glat MJ, Benninger F, Barhum Y, Ben-Zur T, Kogan E, Steiner I, Yaffe D, Offen D. Ectopic Muscle Expression of Neurotrophic Factors Improves Recovery After Nerve Injury. *J Mol Neurosci.* 2016; 58: 39-45.

Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharl M, Thoenen H. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*. 1994; 372: 266-9.

Greising SM, Stowe JM, Sieck GC, Mantilla CB. Role of TrkB kinase activity in aging diaphragm neuromuscular junctions. *Exp Gerontol*. 2015; 72:184-91.

Grundström E, Askmark H, Lindeberg J, Nygren I, Ebendal T, Aquilonius SM. Increased expression of glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA in muscle biopsies from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1999; 162:169-73.

Hallböök F, Wilson K, Thorndyke M, Olinski RP. Formation and evolution of the chordate neurotrophin and Trk receptor genes. . 2006; 68:133-44.

Hayashi N, Himi N, Nakamura-Maruyama E, Okabe N, Sakamoto I, Hasegawa T, Miyamoto O. Improvement of motor function induced by skeletal muscle contraction in spinal cord-injured rats. *Spine J*. 2019; 19:1094-105.

Hempstead BL. Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. . 2006; 3: 19-24.

Hernandez-Torres V, Gransee HM, Mantilla CB, Wang Y, Zhan WZ, Sieck GC. BDNF effects on functional recovery across motor behaviors after cervical spinal cord injury. *J Neurophysiol*. 2017; 117:537-44.

Hirsch MA, van Wegen EEH, Newman MA, Heyn PC. Exercise-induced increase in brain-derived neurotrophic factor in human Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Transl Neurodegener*. 2018; 7:7.

Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 2003; 72: 609-642.

Huh JY. The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism. *Arch Pharm Res*. 2018 ;41:14-29.

Iizuka K, Machida T, Hirafuji M. Skeletal muscle is an endocrine organ. *J Pharmacol Sci*. 2014; 125, 125-31.

Jansen P, Giehl K, Nyengaard JR, Teng K, Lioubinski O, Sjoegaard SS, Breiderhoff T, Gotthardt M, Lin F, Eilers A, Petersen CM, Lewin GR, Hempstead BL, Willnow TE, Nykjaer A. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci*. 2007; 10: 1449-57.

Jiménez-Maldonado A, Cerna-Cortés J, Castro-Rodríguez EM, Montero SA, Muñiz J, Rodríguez-Hernández A, Lemus M, De Álvarez-Buylla ER. Effects of moderate- and

- high-intensity chronic exercise on brain-derived neurotrophic factor expression in fast and slow muscles. *Muscle Nerve*. 2016; 53:446-51.
- Jiménez-Maldonado A, Rentería I, García-Suárez PC, Moncada-Jiménez J, Freire-Royes LF. The Impact of High-Intensity Interval Training on Brain Derived Neurotrophic Factor in Brain: A Mini-Review. *Front Neurosci*. 2018; 12:839.
- Kim S, Choi JY, Moon S, Park DH, Kwak HB, Kang JH. Roles of myokines in exercise-induced improvement of neuropsychiatric function. *Pflugers Arch*. 2019; 471:491-505.
- Kimura T, Kaneko F, Iwamoto E, Saitoh S, Yamada T. Neuromuscular electrical stimulation increases serum brain-derived neurotrophic factor in humans. *Exp Brain Res*. 2019; 237:47-56.
- Koliatsos VE, Clatterbuck RE, Winslow JW, Cayouette MH, Price DL. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron*. 1993; 10:359-67.
- Kurebayashi Y, Otaki J. Does Physical Exercise Increase Brain-Derived Neurotrophic Factor in Major Depressive Disorder? A Meta-Analysis. *Psychiatr Danub*. 2018; 30:129-135.
- Küst BM, Copray JC, Brouwer N, Troost D, Boddeke HW. Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2002; 177:419-27.
- Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Rasmussen P, Erikstrup C, Fischer CP, Lindegaard B, Petersen AM, Taudorf S, Secher NH, Pilegaard H, Bruunsgaard H, Pedersen BK. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; 50:431-8.
- Kreber LA, Griesbach GS. The interplay between neuropathology and activity based rehabilitation after traumatic brain injury. *Brain Res*. 2016; 1640 (Pt A): 152-163.
- Lai KO, Fu WY, Ip FC, Ip NY. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci*. 1998; 11: 64-76.
- Lee JH, Jun HS. Role of Myokines in Regulating Skeletal Muscle Mass and Function. *Front Physiol*. 2019; 10:42.
- Legård GE, Pedersen BK. Muscle as an Endocrine. En: *Muscle and Exercise Physiology*. J.A. Zoladz (Ed.). Academic Press – Elsevier, pp. 285-307. 2019.

- Lee HW, Ahmad M, Wang HW, Leenen FH. Effects of exercise training on brain-derived neurotrophic factor in skeletal muscle and heart of rats post myocardial infarction. *Exp Physiol*. 2017; 102:314-28.
- León-Ariza HH, Mendoza-Navarrete MP, Maldonado-Arango MI, Botero-Rosas DA. Revisión sistemática de “miocinas y regulación metabólica”. *Apunts. Medicina de l'Esport* 2018;53: 155-62.
- Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 1987; 237: 1154-62.
- Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*. 1996; 19: 289-317.
- Liu PZ, Nusslock R. Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. *Front Neurosci*. 2018 ;12:52.
- Lommatzsch M, Quarcoo D, Schulte-Herbrüggen O, Weber H, Virchow JC, Renz H, Braun A. Neurotrophins in murine **viscera**: a dynamic pattern from birth to adulthood. *Int J Dev Neurosci*. 2005; 23:495-500.
- Loprinzi PD, Frith E. A brief primer on the mediational role of BDNF in the exercise-memory link. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2018; 39: 9-14.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6, 603-14.
- Lucini C, Castaldo L, Lamanna C, Maruccio L, Vega JA, Gargiulo G. Neuronal and non-neuronal Trk neurotrophin receptor-like proteins in *Eisenia foetida* (Annelida Oligochaeta). *Neurosci Lett*. 1999; 19: 163-6.
- Lughetti L, Lucaccioni L, Fugetto F, Predieri B, Berardi A, Ferrari F. Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review. *Neuropeptides*. 2018; 72:23-9.
- Matthews VB, Astrom MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerström T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 2009; 52: 1409-18.
- McGregor CE, English AW. The Role of BDNF in Peripheral Nerve Regeneration: Activity-Dependent Treatments and Val66Met. *Front Cell Neurosci*. 2019; 12: 522.

- Merighi A. Targeting the glial-derived neurotrophic factor and related molecules for controlling normal and pathologic pain. *Expert Opin Ther Targets*. 2016; 20:193-208.
- Miyamoto T, Hashimoto S, Yanamoto H, Ikawa M, Nakano Y, Sekiyama T, Kou K, Kashiwamura SI, Takeda C, Fujioka H. Response of brain-derived neurotrophic factor to combining cognitive and physical exercise. *Eur J Sport Sci*. 2018; 18:1119-27.
- Montaño JA, Pérez-Piñera P, García-Suárez O, Cobo J, Vega JA. Development and neuronal dependence of cutaneous sensory nerve formations: Lessons from neurotrophins. *Microsc Res Tech*. 2010; 73: 513-29.
- Mousavi K, Parry D J, Jasmin BJ. BDNF rescues myosin heavy chain IIB muscle fibers after neonatal nerve injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287: C22-C29.
- Nilsson AS, Fainzilber M, Falck P, Ibáñez CF. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett*. 1998; 424: 285-90.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004; 427: 843-8.
- Omura T, Sano M, Omura K, Hasegawa T, Doi M, Sawada T, Nagano A. Different expressions of BDNF, NT3, and NT4 in muscle and nerve after various types of peripheral nerve injuries. *J Peripheral Nerv Syst*. 2005; 10: 293-300.
- Peake JM, Della Gatta P, Suzuki K, Nieman DC. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev*. 2015; 21:8-25.
- Pedersen BK. Muscles and their myokines. *Exp Biol*. 2011; 214:337-46.
- Pedersen BK. Physical activity and muscle-brain crosstalk. *Nat Rev Endocrinol*. 2019; 15:383-92.
- Pereira ES, Krause Neto W, Calefi AS, Georgetti M, Guerreiro L, Zocoler CAS, Gama EF. Significant acute response of brain-derived neurotrophic factor following a session of extreme conditioning program is correlated with volume of specific exercise training in trained men. *Front Physiol*. 2018; 9:823.
- Phillips C, Baktir MA, Srivatsan M, Salehi A. Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8:170.

- Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol*. 2009; 94: 1062-9.
- Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006; 361, 1545-64.
- Rojas Vega S, Strüder HK, Vera Wahrmann B, Schmidt A, Bloch W, Hollmann W. Acute BDNF and cortisol response to low intensity exercise and following ramp incremental exercise to exhaustion in humans. *Brain Res*. 2006; 1121:59-65.
- Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. 2002; 67: 203-33.
- Ryan AS, Xu H, Ivey FM, Macko RF, Hafer-Macko CE. Brain-derived neurotrophic factor, epigenetics in stroke skeletal muscle, and exercise training. *Neurol Genet*. 2019; 5(3):e331.
- Sabatier M, Redmon N, Schwartz G, English A. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. *Exp Neurol*. 2008; 211: 489-93.
- Sabatier MJ, English AW. Pathways Mediating Activity-Induced Enhancement of Recovery From Peripheral Nerve Injury. *Exerc Sport Sci Rev*. 2015; 43:163-71.
- Sartini S, Bartolini F, Ambrogini P, Betti M, Ciuffoli S, Lattanzi D, Di Palma M, Cuppini R. Motor activity affects adult skeletal muscle re-innervation acting via tyrosine kinase receptors. *Eur J Neurosci*. 2013; 37:1394-403.
- Segal RA. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci*. 2003; 26: 299-330.
- Seifert T, Brassard P, Wissenberg M, Rasmussen P, Nordby P, Stallknecht B, Adser H, Jakobsen AH, Pilegaard H, Nielsen HB, Secher NH. Endurance training enhances BDNF release from the human brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298: R372–R377.
- Shibayama E, Koizumi H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol*. 1996; 148:1807-18.
- Skaper SD. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008; 7:46-62.

Son JS, Chae SA, Testroet ED, Du M, Jun HP. Exercise-induced myokines: a brief review of controversial issues of this decade. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2018;13:51-58.

Schweigreiter R. The dual nature of neurotrophins. 2006; 28: 583-94.

Stephens HE, Belliveau AC, Gupta JS, Mirkovic S, Kablar B. The role of neurotrophins in the maintenance of the spinal cord motor neurons and the dorsal root ganglia proprioceptive sensory neurons. *Int J Dev Neurosci.* 2005; 23:613-20.

Szuhany KL, Bugatti M, Otto MW. A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. *J Psychiatr Res.* 2015; 60:56-64.

Teng KK, Hempstead BL. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61: 35-48.

Tremolizzo L, Pellegrini A, Conti E, Arosio A, Gerardi F, Lunetta C, Magni P, Appollonio I, Ferrarese C. BDNF Serum Levels with Respect to Multidimensional Assessment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2016;16: 192-8.

Udina E, Cobianchi S, Allodi I, Navarro X. Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. *Ann Anat.* 2011; 193:347-53.

Venezia AC, Guth LM, Sapp RM, Spangenburg EE, Roth SM. Sex-dependent and independent effects of long-term voluntary wheel running on Bdnf mRNA and protein expression. *Physiol Behav.* 2016; 156:8-15.

Vega JA, García-Suárez O, Hannestad J, Pérez-Pérez M, Germaná A. Neurotrophins and the immune system. *J Anat.* 2003; 20: 1-19.

Verbickas V, Kamandulis S, Snieckus A, Venckunas T, Baranauskiene N, Brazaitis M, Satkunskiene D, Unikauskas A, Skurvydas A. Serum brain-derived neurotrophic factor and interleukin-6 response to high-volume mechanically demanding exercise. *Muscle Nerve.* 2018; 57: E46-E51.

Walsh JJ, Edgett BA, Tschakovsky ME, Gurd BJ. Fasting and exercise differentially regulate BDNF mRNA expression in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2015; 40:96-8.

Walsh JJ, Scribbans TD, Bentley RF, Kellawan JM, Gurd B, Tschakovsky ME. Neurotrophic growth factor responses to lower body resistance training in older adults. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016; 41: 315-23.

- Wens I, Keytsman C, Deckx N, Cools N, Dalgas U, Eijnde BO. Brain derived neurotrophic factor in multiple sclerosis: effect of 24 weeks endurance and resistance training. *Eur J Neurol.* 2016; 23:1028-35.
- Wilhelm JC, Cucoranu D, Xu M, Chmielewski S, Holmes T, Lau KS, Bassell GJ, English AW. Co-operative roles of BDNF expression in neurons and Schwann cells are modulated by exercise to facilitate nerve regeneration. *J Neurosci.* 2012; 32: 5002-9.
- Willand MP, Rosa E, Michalski B, Zhang JJ, Gordon T, Fahnstock M, Borschel GH. Electrical muscle stimulation elevates intramuscular BDNF and GDNF mRNA following peripheral nerve injury and repair in rats. *Neuroscience.* 2016; 334:93-104.
- Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, Terao S, Misume T. Expression of mRNAs for neurotrophins (NGF, BDNF, NT-3 and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, trkC) in the adult human peripheral nervous system and non-neural tissues. *Neurochem.* 1996; 21: 929-38.
- Yarrow JF, WhiteLJ, McCoy SC, Borst SE. Training augments resistance exercise induced elevation of circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF). *Neurosci Lett.* 2010; 479: 161-5.
- Yu T, Chang Y, Gao XL, Li H, Zhao P. Dynamic Expression and the Role of BDNF in Exercise-induced Skeletal Muscle Regeneration. *Int J Sports Med.* 2017; 38: 959-66.
- Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 4171-80.
- Zhang Z, Wang B, Fei A. BDNF contributes to the skeletal muscle anti-atrophic effect of exercise training through AMPK-PGC1 α signaling in heart failure mice. *Arch Med Sci.* 2019; 15:214-22.

Anexo 1. Curriculum vitae



CURRICULUM VITAE

1. DATOS PERSONALES

Colegiado N°: 398
Nombre: GORKA
Apellidos: VAZQUEZ RODRIGUEZ
DNI : 71.884.368
Fecha de Nacimiento: 24-3-80
Domicilio: Avenida de Alemania N° 11 8º G (Avilés-Asturias)
Teléfono: 679925750
E-mail: dogorka@gmail.com

2. TÍTULOS ACADÉMICOS

Diplomado en Fisioterapia, Universidad de Oviedo, 1998-2001
Grado en Fisioterapia por la Universidad de Oviedo 2011.
Master en Osteopatía Universidad Europea de Madrid 2012-2013
Master en Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria. Universidad Camilo José Cela 2014-2015

3. PUESTOS Y ACTIVIDAD DOCENTE

- Colaborador de Honor – Departamento de Morfología y Biología Celular Universidad de Oviedo, 2013-2014
- Colaborador de Honor - Escuela de Medicina del Deporte de la Universidad de Oviedo, 2001-2002.
- Máster Universitario en Biomecánica aplicada a la valoración del daño. Técnicas Avanzadas en Fisioterapia. Universidad Pontificia de Comillas, 2011-2012.
- Máster Universitario en Fisioterapia Osteopática – Universidad Europea de Madrid periodo 2010-2011, 2011-2012
- Co-director del Master en Terapia Manual. Título propio de la Universidad de Oviedo

4. ACTIVIDAD INVESTIGATORIA

-Miembro de la unidad de investigación SINPOS del cláster de biomedicina del campus de excelencia internacional de la universidad de Oviedo

5. PUBLICACIONES

Cabo R, Zichichi R, Viña E, Guerrero MC, **Vázquez G**, García-Suárez O, Vega JA, Germanà A. Calcium-activated potassium channel SK1 is widely expressed in the peripheral nervous system and sensory organs of adult zebrafish.

[Neurosci Lett](#). 2013; 25:555:62-7

Cuesta A, Del Valle ME, García-Suárez O, Viña E, Cabo R, **Vázquez G**, Cobo JL, Murcia A, Alvarez-Vega M, García-Cosamalón J, Vega JA.

Acid-sensing ion channels in healthy and degenerated human intervertebral disc.

[Connect Tissue Res](#). 2014; 55:197-204

Cabo R, Alonso P, Viña E, **Vázquez G**, Gago A, Feito J, Pérez-Moltó FJ, García-Suárez O, Vega JA.

ASIC2 is present in human mechanosensory neurons of the dorsal root ganglia and in mechanoreceptors of the glabrous skin.

[Histochem Cell Biol](#). 2015; 143:267-76

Cabo R, Alonso P, San José I, Vázquez G, Pastor JF, Germanà A, Vega JA, García-Suárez O.

Brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB are present, but segregated, within mature cutaneous Pacinian corpuscles of *Macaca fascicularis*.

[Anat Rec \(Hoboken\)](#). 2015; 298: 624-9.

- Co-autor del capítulo 6: *special aspects of prevention in children and adolescents* del libro *Prevention of injuries and overuse in sport. directory for physicians, physiotherapists, sport scientists and coaches*. Hermann O. Mayr, Stefano Zaffagnini, Springer. ESSKA 2016

- Autor de los libros: *Manual de Terapia Manipulativa Osteopática Canina y Manual de Terapia Manipulativa Osteopática Equina*.

6. COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Co-autor de las comunicaciones presentadas a **15th congreso de EFORT**:

Maestro A, Rodriguez L, Garcia-Suarez O, **Vázquez G**, Vega JA. Double bundle three Tunels ACL reconstruction

Maestro A, Rodriguez L, Garcia-Suarez O, **Vázquez G**, Vega JA. TRPV4 in healthy and injured human ACL

- Co-autor de las comunicaciones presentadas a **XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Anatómica Española**

Gago, F. Tamimi, J. Torres, L.M. Junquera, **G. Vázquez**, O. Garcia-Suarez, J.A.Vega. Micro CT: presente anatómico y futuro en el desarrollo de la investigación dental.

Gago, T. Cobo, J. Torres, I. Menéndez, **G. Vázquez**, L.M. Junquera, O. Garcia-Suarez, J.A.Vega. Mutaciones en el gen NTRK1 (trkA) en humanos y ratones: fenotipo dentario.

R. Cabo, P. López, I. San José, F. Pastor, A. Gago, **G. Vázquez**, R. Cobo, O.García-Suárez, J.A.Vega. El canal iónico polimodal TRPC6 se expresa en los corpúsculos de Meissner y se co-expresa con TRPV4.

- Co-autor de la comunicación presentada a **17th ESSKA Congress European Society of Sports Traumatology Knee Surgery and Arthroscopy**.

Maestro A., Rodríguez L., **Vázquez G.**, Garcia Suarez O., Muriel J., Rodriguez N., Pipa I., Vega J. The human cruciate ligament contains mesenchymal-like stem cells.

7. CURSOS IMPARTIDOS

- Curso de fisioterapia en el vértigo paroxístico benigno, desarrollado en la Universidad de Cádiz. 5 horas
- Curso de Experto Universitario en Macronutrición y Micronutrición aplicada a la salud y calidad de vida. Universidad de Almería. 5 horas.
- Curso de Rehabilitación Celular en el campo de la fisioterapia. Universidad San Jorge de Zaragoza, 10 horas.
- Curso de Experto Universitario en Fisioterapia Manipulativa Osteopática y Terapia Afines. Universidad de Almería, 15 horas
- Jornadas de terapia manual: Diagnóstico diferencial cervical en osteopatía. Aveiro (Portugal)
- VI curso de cirugía de nervios periféricos y plexo braquial: Terapia Manual Neural: Neurodinamia. 1 hora.
- Ciclo de Cultura y Salud, desarrollado en el Centro de Servicios Universitarios de Avilés, con el título: Fisioterapia en la mejora del rendimiento deportivo y salud, 1 hora.
- Monográfico: el pie del corredor, organizado por el Colegio profesional de Podólogos de Asturias. 1 hora
- Curso de Nutrición Celular Activa: : La micronutrición y su importancia en la terapia manual. Trastornos articulares y musculares.90 horas.
- V Jornadas Internacionales de Podología organizado por el Colegio profesional de Podólogos de Asturias, 1 hora
- VI Jornadas de Podología del Principado de Asturias, organizado por el Colegio profesional de Podólogos de Asturias, 13 horas lectivas.
- I Congreso Virtual Internacional en Salud y Calidad de Vida: Nutrición aplicada a la salud y calidad de vida, organizado por la Asociación de Docentes e Investigadores Jóvenes en Educación y Salud (ADDIJES), el Departamento de didáctica de la expresión musical, plástica y corporal de la Universidad de Granada y el grupo de investigación "Psicología, Salud y Educación (HUM-760) de la Universidad de Almería.
- Curso de Experto en Nutrición Celular Activa Nivel 2: Trastornos musculoesqueléticos y osteoarticulares, 30 horas
- Curso Terapia Manual en Cefaleas y Vértigos, organizado por el Ilustre Colegio Profesional de Fisioterapeutas de Andalucía, 40 horas.
- Curso ON LINE: Micronutrición aplicada a las alteraciones del Sistema Nervioso, organizado por el Instituto de Formación de Alimentos Funcionales (IFAF) en colaboración con la Universidad de Almería. Codirector del curso, 45 horas.
- Curso ON LINE: Micronutrición aplicada a las alteraciones del Sistema Cardiovascular, organizado por el Instituto de Formación de Alimentos Funcionales (IFAF) en colaboración con la Universidad de Almería. Codirector del curso, 45 horas.
- Curso de Terapia Manual en Cefaleas y Vértigos, organizado por el Ilustre Colegio Profesional de Fisioterapeutas de Andalucía, 20 horas.
- Máster Profesional en osteopatía, Kinesiología y suplementación en el deporte, organizado por la Escuela SANASPORT, 30 horas

- Curso de Terapia Manual en Cefaleas y Vértigos, organizado por el centro de fisioterapia Antonio Parejo, 15 horas
- Curso ON LINE: Micronutrición aplicada a las alteraciones del Sistema Nervioso - 2ª Edición, organizado por el Instituto de Formación de Alimentos Funcionales (IFAF) en colaboración con la Universidad de Almería. Codirector del curso, 45 horas.
- Postgrado Fisioterapia Invasiva Musculoesquelética, organizado por Theraform (Elda-Alicante), 15 horas.
- Postgrado en osteopatía canina, organizado por Equilibrium y La Madriguera del lobo/Tecnican, 20 horas.
- Curso de Terapia Manual en Cefaleas y Vértigos, organizado por el centro de fisioterapia Antonio Parejo. 15 horas.
- Máster Profesional en osteopatía, Kinesiología y suplementación en el deporte, organizado por la Escuela SANASPORT. 15 horas.
- Postgrado en Fisioterapia Invasiva Musculoesquelética, organizado por Theraform, 15 horas.
- Curso de Rehabilitación Celular, organizado por Theraform, 30 horas
- Curso de Nutrición Celular Activa. Laboratorios Nutergia, 270 horas.
- Curso de Rehabilitación Celular, organizado por el centro de fisioterapia Antonio Parejo. 30 horas.
- Congreso de Nutrición Celular Activa: : NCA en las alteraciones del sistema óseo y arterial: nexos de unión. 6 horas.
- Congreso de Nutrición Celular Activa: : NCA en las alteraciones del sistema nervioso, 12 horas.
- Congreso de Nutrición Celular Activa: : NCA en las enfermedades crónico-degenerativas, 12 horas.
- Congreso de Nutrición Celular Activa: : NCA en el Síndrome Fibromiálgico. 30 horas.
- Congreso de Nutrición Celular Activa: : NCA en las alteraciones de la tiroides, 6 horas.
- Curso ON LINE Antropología de la alimentación, dietoterapia y nutrición celular activa, MODULO 2: Alimentación saludable y alimentos funcionales y MODULO 5: Inflamación, dolor y reumatología. organizado por el Instituto de Formación de Alimentos Funcionales (IFAF) y avalado por la comisión de las profesiones sanitarias del sistema Nacional de salud. 30 horas
- Postgrado en Osteopatía Canina, Escuela Internacional de Osteopatía Canina, 60 horas.
- Curso de técnicas de masaje corporal, vital y terapéutico, Aulas de la Universidad Popular de Avilés (AUPA), 1.530 horas.
- Curso principios básicos de medicina deportiva y didáctica escolar, Aulas de la Universidad Popular de Avilés (AUPA), 30 horas.
- Curso de ergonomía y psico-sociología aplicada en la rama de higiene postural. PRAGMA. 90 horas.
- Cursos de osteopatía en escuelas nacionales privadas (FBEO,EOM, ITNM)
- Cursos de osteopatía animal en la escuela EQUILIBRIUM desde el año 2009. Italia.

- Cursos de osteopatía en la Accademia Internazionale di Formazione e Ricerca in Osteopatía e Medicina Manuale (AIFROMM-Italia) periodo 2010-2011, 2011-2012, 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015.

8. FORMACIÓN COMPLEMENTARIA

- Curso de actuación básica en situaciones de emergencia (primeros auxilios). Universidad de Oviedo, 45 horas.

- Curso Método de Kabat. Universidad de Oviedo, 35 horas.

- Curso de vendajes en lesiones deportivas. Patronato Deportivo Municipal Carreño. 5 horas.

- Curso Quiromasaje y técnicas básicas de Reflexología Podal. Centro Natura Vitae, 155 horas.

- I Simposium "Nutrición y Ayudas Ergogénicas en el Deporte, Últimos Avances. Organizado por la SAF y la Escuela de Medicina del Deporte, 11 horas.

- Curso de técnicas manipulativas en la columna vertebral, 50 horas.

- Curso postgrado de diagnóstico fisioterápico, 69 horas.

- Curso postgrado en método POLD de terapia manual, 60 horas.

- Curso postgrado de fisioterapia del síndrome de dolor miofascial, puntos gatillo, 34 horas.

- Curso postgrado de Masaje Cyriax, 20 horas.

- Curso postgrado de Electroterapia de alta, media y baja frecuencia, 48 horas.

- Curso monográfico sobre Movilización Neuromeningea, 20 horas.

- Curso monográfico sobre Reeducción Postural Global (RPG), 20 horas.

- Curso de Acupuntura para fisioterapeutas, medical-scientific acupuncture certificate por la World Acupuncture Foundation. 60 horas.

- Certificado en Osteopatía con un total de 1.500h acreditado por la Escuela de Osteopatía de Madrid.

- Degree in Osteopathy defendido ante el tribunal internacional de osteópatas en Zánica-Bérgamo.

- Curso de terapia manual para animales: Impartido por la Dra Emmanuelle Vandendriessche, directora de la Academia Internacional de Quiropráctica Animal. 100 horas.

- Curso de terapias miofasciales I y II (inducción craneosacra) y III (especialización) : Impartidos por el profesor Andrzej Pilat. 75 horas.

- Curso práctico-teórico de terapia craneosacral equina, 25 horas.

- Curso de Terapia Ortomolecular para fisioterapeutas, 25 horas.

- Curso de Experto en NCA expedido por el Instituto de Nutrición Celular Activa y la Asociación Francesa de Medicina Ortomolecular, 60 horas.

- Curso Superior de NCA y Neuroinmunoenterología expedido por el Instituto de Nutrición Celular Activa y la Asociación Francesa de Medicina Ortomolecular, 25 horas.
- Curso de Mesoterapia en el Aparato Locomotor para fisioterapeutas, 25 horas.
- Curso Bases y Fundamentos de la técnica Electrólisis Percutánea Intratisular (EPI) .15 horas acreditadas por la Comisión de Formación Continuada. 3,53 créditos.
- Curso de Ecografía en Rehabilitación. 40 horas de duración acreditado por la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias del Principado de Asturias con 7,8 créditos.

9. ACTIVIDAD PROFESIONAL

- Becario de la Escuela de Medicina del Deporte de Oviedo durante el año 200-2001, último año de carrera, haciéndome cargo además del equipo de baloncesto femenino Universidad de Oviedo de categoría 1ª División Femenina; Temporada 2000-2001.
- Fisioterapeuta del equipo de baloncesto femenino de la Universidad de Oviedo de categoría División de Honor; Temporada 2001-2002
- Colaborador de Honor de la Escuela de Medicina del Deporte de Oviedo el año 2001-2002, como coordinador del servicio de fisioterapia de dicha escuela.
- Fisioterapeuta del Real club Avilés de fútbol, tanto de la escuela de fútbol (categorías inferiores) como del equipo de 3ª División.
- Profesional autónomo que ejerce su trabajo en consulta privada desde hace 19 años.

10. OTROS

- Miembro del Comité organizador del XXVII Congreso Nacional de Anatomía
- Miembro del comité científico en el I Congreso Virtual Internacional en Salud y Calidad de Vida: Nutrición aplicada a la salud y calidad de vida, organizado por la Asociación de Docentes e Investigadores Jóvenes en Educación y Salud (ADDIJES), el Departamento de didáctica de la expresión musical, plástica y corporal de la Universidad de Granada y el grupo de investigación "Psicología, Salud y Educación (HUM-760) de la Universidad de Almería, celebrado del 11 al 19 de Octubre del 2018.

El abajo firmante D. Gorka Vázquez Rodríguez se responsabiliza de la veracidad de los datos contenidos en el presente curriculum, comprometiéndose a aportar, en su caso, las pruebas documentales que le sean requeridas.

En Avilés a 15 de Septiembre del 2019

Fdo: Gorka Vázquez Rodríguez

Anexo 2. Trabajo derivado de la tesis