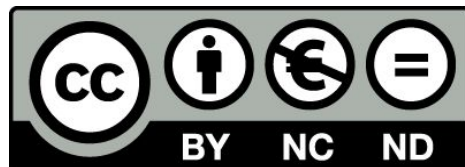


# Ejercicio y envejecimiento: cambios transcripcionales y epigenéticos en un modelo murino de envejecimiento acelerado

Maria Jesús Álvarez López



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència ***Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.***

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia ***Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.***

This doctoral thesis is licensed under the ***Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.***

**EJERCICIO Y ENVEJECIMIENTO:  
CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES Y  
EPIGENÉTICOS EN UN MODELO MURINO DE  
ENVEJECIMIENTO ACELERADO**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**MARÍA JESÚS ÁLVAREZ**

---

**2015**

**FACULTAD DE FARMACIA**

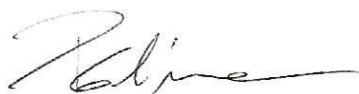
**Departamento de Farmacología y Química Terapéutica**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA**

**EJERCICIO Y ENVEJECIMIENTO:  
CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES Y EPIGENÉTICOS  
EN UN MODELO MURINO DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO**

Memoria presentada por María Jesús Álvarez López  
para optar al título de doctora por la Universidad de Barcelona

Directora




Perla Kaliman

Co-directora



Mercè Pallàs Lliberia

Doctoranda



M<sup>a</sup> Jesús Álvarez López

**MARÍA JESÚS ÁLVAREZ LÓPEZ**  
2015



Es verdad, pues: reprimamos  
esta fiera condición,  
esta furia, esta ambición,  
por si alguna vez soñamos.  
Y sí haremos, pues estamos  
en mundo tan singular,  
que el vivir sólo es soñar;  
y la experiencia me enseña,  
que el hombre que vive, sueña  
lo que es, hasta despertar.

Sueña el rey que es rey, y vive  
con este engaño mandando,  
disponiendo y gobernando;  
y este aplauso, que recibe  
prestado, en el viento escribe  
y en cenizas le convierte  
la muerte (¡desdicha fuerte!):  
¡que hay quien intente reinar  
viendo que ha de despertar  
en el sueño de la muerte!

Sueña el rico en su riqueza,  
que más cuidados le ofrece;  
sueña el pobre que padece  
su miseria y su pobreza;  
sueña el que a medrar empieza,  
sueña el que afana y pretende,  
sueña el que agravia y ofende,  
y en el mundo, en conclusión,  
todos sueñan lo que son,  
aunque ninguno lo entiende.

Yo sueño que estoy aquí,  
destas prisiones cargado;  
y soñé que en otro estado  
más lisonjero me vi.  
¿Qué es la vida? Un frenesí.  
¿Qué es la vida? Una ilusión,  
una sombra, una ficción,  
y el mayor bien es pequeño;  
que toda la vida es sueño,  
y los sueños, sueños son.

“La vida es sueño”  
Pedro Calderón de la Barca (1600-  
1681)



En primer lugar me gustaría agradecerle a mi directora de tesis la Dra. Perla Kaliman por su confianza en mí desde el primer día. Aún sin tener el expediente más brillante apostó por mí y me dio la oportunidad de llevar a cabo uno de mis sueños. Gracias a su apoyo, su seguimiento y sus enseñanzas, no solo a nivel científico sino también en la vida en general, he crecido como persona y como investigadora bajo su tutela. Ha sido durante este tiempo y será en un futuro, un ejemplo para mí. Cada vez que recuerdo aquella llamada preguntándome si seguía interesada en formar parte de su laboratorio la emoción me inunda por dentro, gracias a ella he vivido una de las etapas más enriquecedoras de mi carrera y de mi vida.

También me gustaría agradecer a mi co-directora de tesis la Dra. Mercè Pallàs, sin su confianza y apoyo esta tesis no hubiera sido posible, gracias por sus consejos y sus ideas, siempre acompañados de una sonrisa y buen humor. También a la Dra. Rosa M<sup>a</sup> Escorihuela y los miembros de su grupo en la UAB: Sandra, Jaume e Igor; por formar parte de esta colaboración y ser parte fundamental de este proyecto. A la Dra. Coral Sanfeliu por acogernos en un momento difícil y hacernos sentir parte de su grupo desde el primer día.

Sin duda, quiero hacer mención especial a mis compañeros de laboratorio María Umpierrez, Marco Castro y Marta Cosín por ser mis camaradas en esa lucha que hemos vivido entre poyatas. Por hacerme mucho más ameno el trabajo diario y estar conmigo codo con codo en todo momento. Por las risas y buenos ratos que hemos pasado durante estos años y ser parte esencial en mi día a día y en mi tesis. En especial a Marta, por aportar ese empuje y esa chispa de optimismo, por su bondad, buen humor y todo su cariño. Por ser el yin de mi yin-yang en el laboratorio y una auténtica amiga fuera de él.

Al Dr. Richard Davidson y Dr. Antoine Lutz por esa fantástica colaboración internacional en un proyecto tan emocionante e innovador, gracias al cual pude vivir una increíble y enriquecedora experiencia en Madison (Wisconsin). A la Dra. Marcelina Párrizas y Dra. Rosa Gasa por su apoyo científico y técnico. A los compañeros del CSIC: Sara, Rubén y Bego por acogernos con tanto cariño en nuestra reciente invasión y a los compañeros que tuvimos en IDIBAPS, vecinos de laboratorio y amasadores de masa fuera de él: Bea, Diego, Juan, Julia, Laura, Lorena, Marcel, María, Mattia, Núria, Patricia, Thomas y todos los demás que pasaron por allí.

A mi familia por su apoyo moral en todo momento. A mi madre por todo su amor y ánimos, por su dedicación, preocupación constante y por aquella frase: “Estamos aquí para ti y si no lo haces ahora no lo harás nunca” que me animó a arriesgarme a luchar por mi sueño. A mi padre por ser un ejemplo de bondad y equilibrio y ser el pilar de esta familia, y a mi hermano por cuidarme desde que llegué a este mundo y por todo su cariño. Sin vosotros y sin vuestro esfuerzo yo no estaría donde estoy, os lo debo todo y os quiero muchísimo. Aunque no sea demasiado común, también como parte de mi familia, a mi perro Mojito por su amor y fidelidad incondicional.

A mis amigos hospitalenses: Ely, Ana, Robert A., Unanue, David, Juan, Marina, Robert V., Sergi y Arnau; y a los no-hospitalenses: Gemma y Héctor, Sergi y Andrea; por crecer conmigo, por ser como una familia para mí, por amenizar mis ratos de ocio y preguntarme constantemente como llevo mi tesis, aunque alguno de ellos ni siquiera supiera que es eso de la epigenética. También agradecer a mi buen amigo Alex, quien me ha ayudado en el diseño de la portada de esta tesis.

Y finalmente a todas aquellas personas que, aunque no he mencionado, han formado parte de éste viaje y sin las cuales nada habría sido lo mismo.

Muchísimas gracias a todos, de corazón.



Este trabajo ha estado financiado por el proyecto SAF2010-15050 (Perla Kaliman) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) con la colaboración del proyecto DPS 2008-06998-C02 (Merce Pallàs y Rosa M.Escorihuela) (MINECO).  
Y por la beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya (FI-DGR2011).



## ÍNDICE:

<b>ABREVIATURAS</b> .....	11
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>1. El proceso de envejecimiento</b> .....	15
1.1. Teorías del envejecimiento .....	15
1.2. Características del proceso de envejecimiento .....	17
1.2.1. Estrés oxidativo .....	17
1.2.2. Inflamación .....	18
1.2.3. Senescencia celular .....	19
1.2.4. Acortamiento de telómeros .....	19
<b>2. Envejecimiento y neurodegeneración</b> .....	21
2.1. La enfermedad de Alzheimer .....	21
2.2. Factores de riesgo y procesos implicados en su aparición .....	23
2.2.1. Factores genéticos .....	23
2.2.2. Factores ambientales .....	24
2.2.3. Envejecimiento acelerado .....	25
2.2.4. Degeneración y desconexión de redes neuronales .....	26
2.2.5. Trastorno metabólico por disfunción mitocondrial .....	27
2.2.6. Disfunción en la barrera hemato-encefálica .....	27
2.2.7. Disfunción en sistema inmune .....	27
2.2.8. Agentes infecciosos .....	28
2.3. El modelo de ratón SAMP8 .....	29
<b>3. Epigenética y envejecimiento</b> .....	31
3.1. Definición y mecanismos .....	31
3.1.1. Metilación del ADN .....	31
3.1.2. Modificaciones de histonas .....	33
3.1.3. ARNs no codificantes .....	39
3.2. Modificaciones epigenéticas asociadas a envejecimiento .....	41
3.2.1. Metilación del ADN .....	41
3.2.2. Modificaciones de histonas .....	42
3.2.3. microARNs .....	43

<b>4. Ejercicio físico y envejecimiento</b>	45
4.1. Modelos experimentales de ejercicio físico	45
4.2. Efectos del ejercicio físico en modelos murinos y humanos	47
4.2.1. Sistemas periféricos	47
4.2.2. Sistema nervioso central	48
4.2.3. Ejercicio físico, envejecimiento y Alzheimer	50
4.3. Ejercicio y epigenética	51
<b>OBJETIVOS</b>	53
<b>RESULTADOS</b>	57
<b>Capítulo 1.</b> Disminución de la expresión de Rcor2 en un modelo de senescencia acelerada y su posible función como regulador de la inflamación asociada al envejecimiento	61
<b>Capítulo 2.</b> El ejercicio físico a largo plazo modula la expresión génica en hipocampo de ratones hembra senescentes	85
<b>Capítulo 3.</b> Alteraciones epigenéticas en hipocampo de ratones SAMP8 y su modulación tras una intervención de ejercicio físico voluntario	107
<b>DISCUSIÓN</b>	137
El modelo SAMP8: ventajas y limitaciones	140
Inflammaging y epigenética, ¿causa o consecuencia del envejecimiento?	141
El papel de la remodelación de cromatina en longevidad y senescencia	143
La matriz extracelular, diana del ejercicio físico en cerebro	145
Mejoras del ejercicio físico y su relación con la vía de BDNF	148
Epigenética y estilo de vida	149
<b>CONCLUSIONES</b>	151
<b>ANEXO-I</b>	155
<b>ANEXO-II</b>	159
<b>REFERENCIAS</b>	165

**ABREVIATURAS**

<b>A<math>\beta</math></b> : proteína beta-amiloide	<b>HSV1</b> : virus del herpes simple tipo 1
<b>AICD</b> : <i>APP intra cellular domain</i>	<b>IGF1</b> : <i>insulin-like growth factor 1</i>
<b>ALDH1A2</b> : <i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2</i>	<b>IL</b> : interleucina
<b>APP</b> : proteína precursora amiloide	<b>JARID</b> : <i>Jumonji/ARID domain-containing protein</i>
<b>AR</b> : receptor de andrógenos	<b>JMJD</b> : <i>Jumonji Domain-Containing Protein</i>
<b>ARNm</b> : ARN mensajero	<b>LPS</b> : <i>Lipopolysaccharid</i>
<b>ASC</b> : proteína asociada a apoptosis <i>speck-like</i>	<b>LSD1</b> : <i>lysine-specific demethylase 1</i>
<b>BACE</b> : <i>beta-site APP cleaving enzyme</i>	<b>LZTFL1</b> : <i>leucine zipper transcription factor-like protein 1</i>
<b>BDNF</b> : <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	<b>MAP</b> : proteína asociada a microtúbulos
<b>BHE</b> : barrera hemato-encefálica	<b>MCPs</b> : <i>monocyte chemoattractant proteins</i>
<b>BMI</b> : índice de masa corporal	<b>miARNs</b> : microARNs
<b>CLU</b> : <i>clusterin</i>	<b>MIPs</b> : <i>macrophage inflammatory proteins</i>
<b>COL1A</b> : colágeno tipo 1 alfa	<b>NEP</b> : neprilisina
<b>CRP</b> : proteína C-reactiva	<b>NRN1</b> : neuritina
<b>CR1</b> : <i>complement receptor 1</i>	<b>PADs</b> : Peptidilarginina deiminasa
<b>DDR</b> : <i>DNA damage response</i>	<b>PBMCs</b> : células mononucleares de sangre
<b>DMN</b> : <i>Default mode network</i>	<b>PDH</b> : deshidrogenasa de piruvato
<b>EA</b> : enfermedad de Alzheimer	<b>PET</b> : tomografía de emisión de positones
<b>EEG</b> : electroencefalografía	<b>PFK</b> : fosfofructoquinasa
<b>EZH1</b> : <i>enhancer of zeste 1 polycomb repressive complex 2 subunit</i>	<b>PICALM</b> : <i>phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
<b>FA</b> : anemia de Fanconi	<b>PSEN</b> : presenilina
<b>FAD</b> : <i>flavin adenine dinucleotide</i>	<b>PTGDS</b> : <i>prostaglandin D2 synthase</i>
<b>Fmod</b> : fibromodulina	<b>RCOR</b> : correpresor de REST
<b>fMRI</b> : resonancia magnética funcional	
<b>HAT</b> : histonas acetiltransferasas	
<b>HDAC</b> : histonas deacetilasas	
<b>HPA</b> : eje hipotálamo-pituitario-adrenal	

---

**REST:** *RE1-silencing transcription factor*

**ROS:** *reactive oxygen species*

**SAMP8:** *Senescence-Accelerated Mouse Prone 8*

**SAMR1:** *Senescence-Accelerated Mouse Resistant 1*

**SOD:** *superóxido dismutasa*

**SETD1:** *SET domain containing 1*

**SET7:** *SET domain containing 7*

**SUMO:** *small ubiquitin-related modifier*

**TNF:** *tumor necrosis factor*

**TGF:** *tumor growth factor*

# INTRODUCCIÓN

---





## 1. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

La mejora en la calidad de vida y los avances científicos y tecnológicos han permitido el aumento de la esperanza de vida. Este hecho, sumado al descenso en la tasa de natalidad en algunos países, está originando un crecimiento acelerado en el porcentaje de personas de edad avanzada con el consecuente envejecimiento de la población. Según la Organización Mundial de la Salud, el número de personas de más de 60 años en todo el mundo se ha duplicado desde 1980, y se prevé que se triplique pasando de 600 millones en el año 2000 a unos 2 billones de personas en el año 2050. Asociado al proceso de envejecimiento, el número de enfermedades crónicas se ha visto aumentado en las últimas décadas, lo que genera la necesidad de estudiar los mecanismos implicados en el proceso de envejecimiento así como estrategias que reduzcan sus síntomas y promuevan un envejecimiento saludable.

### 1.1. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso fisiológico complejo, que incluye diferentes sistemas y afecta al organismo completo. A lo largo de la historia se han ido proponiendo diferentes teorías que probablemente se complementan entre ellas para dar como resultado las características asociadas al envejecimiento observadas en personas de edad avanzada, entre las cuales se destacan problemas cardiovasculares, sarcopenia, osteoporosis, fallos metabólicos y deterioro cognitivo.

Una de las primeras teorías fue postulada por Hayflick y Moorhead en 1961, cuando observaron que los fibroblastos en cultivo se dividían un número limitado de veces. Esta observación se ha relacionado posteriormente con el acortamiento de los telómeros que se produce en cada división celular y el consecuente bloqueo del ciclo celular para evitar la inestabilidad cromosómica, denominado senescencia replicativa o celular.

Por otro lado, existe la teoría de la programación genética, en la cual la presencia de ciertos genes de senescencia expresados en diferentes momentos de la vida, regularían vías bioquímicas y metabólicas y determinarían la longevidad de una determinada especie [1, 2].

Otra de las posibles teorías, es la afectación del sistema neuroendocrino. Esta teoría se basa en la desregulación por parte del hipotálamo de la secreción hormonal y la disminución en la sensibilidad de respuesta del eje HPA (hipotálamo-pituitario-adrenal) a medida que avanza la edad [3, 4], lo cual se ha relacionado con un incremento en los niveles de cortisol [5] que desencadenaría una respuesta fisiológica en forma de cascada (Fig 1).

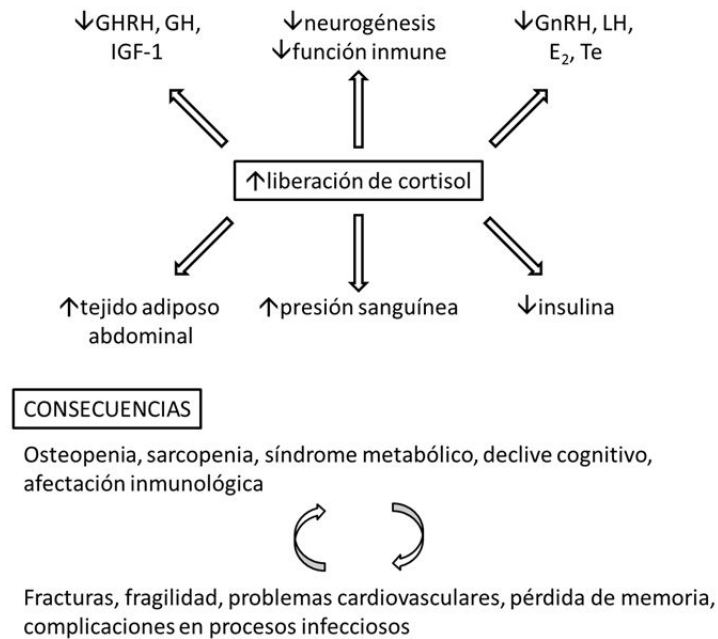


Figura 1. Posibles secuelas clínicas y resultados adversos en diversos sistemas del cuerpo, de la excesiva activación del eje HPA e incremento de cortisol. (Figura traducida de Veldhuis et al. [6])

Una de las teorías más conocidas y estudiadas, es la que identifica la acumulación de radicales libres, producidos por el metabolismo energético mitocondrial, como principales causantes de toxicidad y daño celular (*stress-induced theory*) [7]. Se ha visto que los radicales libres pueden provocar alteraciones en la secuencia del ADN [8], en la estructura de membranas celulares por la afectación en lípidos [9], y acumular daños en el ADN mitocondrial, lo cual afecta a la cadena de transporte de electrones y puede reducir la eficiencia energética celular [10-12].

Por último, una mayor sensibilización de las membranas a la peroxidación lipídica y el aumento en el grado de insaturación de ácidos grasos de membrana también se ha propuesto como mecanismo determinante del proceso de envejecimiento y longevidad en diferentes especies como *C.elegans*, *D.melanogaster*, roedores e incluso en humanos [13, 14]. La composición de membrana de las diferentes especies estudiadas muestra un

promedio similar en la longitud de la cadena de los ácidos grasos (18 átomos de carbono), en la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados (40:60) y en la distribución de fosfolípidos [15]. Sin embargo, los cambios en la resistencia a la peroxidación lipídica hallados en los organismos más longevos parecen estar determinados por la reducción en la actividad de desaturasas que conlleva a cambios en el tipo de ácidos grasos insaturados presentes en la membrana [16].

## 1.2. CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

En 1962, B. Strehler [17] propuso cinco criterios para definir las características del envejecimiento que se siguen utilizando como guía para la identificación de biomarcadores de senescencia. Dichos criterios implican que para que un proceso sea considerado parte del envejecimiento, las alteraciones que provoca deben ser acumulativas, progresivas, intrínsecas, deletéreas para las funciones biológicas y universales (observadas en todos los miembros de la especie). El proceso de envejecimiento se desarrolla de manera progresiva durante el ciclo vital del individuo y la afectación de órganos y sistemas incluye varios fenómenos moleculares y fisiológicos a la vez influenciados por factores genéticos y ambientales.

### 1.2.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) y las defensas antioxidantes del organismo (como la catalasa, GSH-peroxidasas y reductasas o la SOD, superóxido dismutasa) en favor de los factores oxidantes. Las ROS interactúan con biomoléculas celulares como los fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos, afectando a su estructura y funcionalidad y provocando fallos que pueden desencadenar en daños tisulares y celulares.

La producción de ROS se da principalmente durante el proceso de transformación de NADH o succinato en ATP. A lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial, en concreto en los complejos I y III [18, 19], los electrones derivados de la fosforilación oxidativa pueden reaccionar con el oxígeno (O<sub>2</sub>) u otros aceptores de electrones, generando radicales libres [20], lo cual se ha correlacionado negativamente con la longevidad en diferentes especies [21]. Las ROS también se producen en otros compartimentos celulares, como los microsomas, peroxisomas o en las oxidasas

dependientes de NADPH ligadas a membrana. Sin embargo, las mitocondrias son especialmente sensibles a las alteraciones asociadas al envejecimiento especialmente debido a los efectos de las ROS sobre el ADN mitocondrial [22, 23].

Una de las observaciones que apoyan este hecho, es que los errores en ADN mitocondrial se acumulan con la edad. Esto viene dado tanto por errores de replicación como por fallos en la reparación. Es en este último mecanismo donde se ha sugerido que las ROS tienen un papel relevante, ya que pueden producir rotura de simple o doble cadena en el ADN, dando como resultado mutaciones puntuales e incluso deleciones de fragmentos de ADN mitocondrial que pueden producir disfunciones, como se ha observado en cerebro, músculo esquelético y corazón [24].

### 1.2.2. Inflamación

Una de las principales características del proceso de envejecimiento, es la reducción global en la respuesta a factores de estrés acompañada de un incremento progresivo en el estado proinflamatorio, recientemente denominado como *inflammaging* [25]. La inmunosenescencia parece estar caracterizada por una reorganización funcional del sistema inmune donde algunos mecanismos disminuyen su eficiencia y otros permanecen no alterados o incluso más activos [26, 27].

Los niveles de citoquinas proinflamatorias como la interleucina (IL)-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) y TGF $\beta$  (*tumor growth factor*) [28-30] se ven alterados durante el envejecimiento. Asimismo, se observa una afectación en la respuesta inmunitaria caracterizada por una reducción del número de células B maduras, menor afinidad de los anticuerpos producidos [31], un aumento en la proporción de células B de memoria [32-34], una reducción del repertorio de células T y CD4+ *helper* [35, 36] y un desequilibrio hacia células CD8+, las cuales son productoras de citoquinas proinflamatorias [37-39]. Un sistema inmunitario poco eficiente a su vez propicia el desarrollo de estados de inflamación crónica.

### 1.2.3. Senescencia celular

La senescencia celular es un proceso de respuesta frente a estímulos estresantes o daños ocurridos en la célula, que provoca el bloqueo del ciclo y división celular [40-42], pudiendo afectar al potencial regenerativo del tejido [43, 44]. Los mecanismos subyacentes de este proceso incluyen la regulación paracrina por parte de las células senescentes hacia células sanas de su alrededor mediante la secreción de IL-1 $\beta$  o TGF $\beta$  [45, 46], la pérdida de estructura y organización por la acción de las proteasas secretadas por las células senescentes [47] y el aumento del ambiente inflamatorio por la secreción de factores de crecimiento, citoquinas y quemocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, MIPs (*macrophage inflammatory proteins*) y MCPs (*monocyte chemoattractant proteins*) [41, 48].

Existen varios factores desencadenantes de senescencia celular entre los cuales se incluyen cambios de expresión de genes supresores de tumores [49, 50], cambios metabólicos [51, 52] o remodelación de la cromatina inducida por factores epigenéticos [53, 54], entre otros. La vía de señalización más conocida por la cual las células dejan de dividirse es mediante la activación de la respuesta a daños en ADN (DDR). En esta vía, diferentes tipos de quinasas bloquean la progresión del ciclo celular mediante la estabilización de p53 y la activación transcripcional de la quinasa dependiente de ciclina p21 [55, 56]. También se ha observado senescencia celular por vías independientes a DDR, las cuales implican p19<sup>Arf</sup> y p16<sup>Ink4a</sup> [49, 57] o la activación de la deshidrogenasa de piruvato mitocondrial (PDH) [58]. Además, las vías efectoras de p53-p21 y p16<sup>Ink4a</sup>-RB, pueden actuar conjuntamente en el mantenimiento de procesos de senescencia [59, 60].

### 1.2.4. Acortamiento de telómeros

Los telómeros son estructuras de heterocromatina situados en la parte final de los cromosomas, cuya función es protegerlos frente a mecanismos de reparación y degradación [61, 62]. Están formados por repeticiones en tándem de la secuencia de nucleótidos TTAGGG y un complejo compuesto por 6 proteínas llamado telosoma o shelterina [63-65]. Estas proteínas son esenciales ya que el silenciamiento de la mayoría de ellas es letal en las primeras etapas embrionarias [66-68]. La enzima responsable de

la síntesis de telómeros es la telomerasa, formada por un componente de ARN (TERC) y una subunidad catalítica proteica con actividad de transcriptasa reversa (TERT) [69].

Tras cada división celular, los telómeros se acortan por la incapacidad de las polimerasas de ADN de replicar completamente los extremos de las moléculas de ADN lineal [70]. El acortamiento telomérico causa pérdida en la funcionalidad de las células madre de los tejidos, afectando a su renovación y funcionalidad [71-73]. Paralelamente, también se activa la maquinaria de respuesta a daños en ADN (DDR) que reconoce el final de los cromosomas como roturas de doble cadena induciendo procesos de senescencia celular [74, 75]. Se ha asociado el acortamiento de telómeros con enfermedades como el síndrome de Zinsser-Cole-Engman o disqueratosis congénita, el síndrome de Werner, síndrome de Bloom, ataxia–telangiectasia, anemia de Fanconi (FA) o fibrosis pulmonar, entre otros [76, 77]. También se han descrito evidencias de un acortamiento telomérico en enfermedades crónicas frecuentes como varios tipos de cáncer [78-80], hepatitis crónica [81, 82], declive cognitivo [83] y la enfermedad de Alzheimer (EA) [84], y en personas con problemas cardiovasculares e hipertensión [85-89] y diabetes tipo II [90, 91].

Por otro lado también se ha observado que ciertos hábitos de vida pueden afectar a la longitud telomérica. Factores como el tabaco [92-94], el consumo de carne procesada [95] y un elevado índice de masa corporal (BMI) [96-98] se han asociado con el acortamiento en la longitud telomérica. Otros en cambio, como elevados niveles de vitamina D [99], folato [100] o ácidos grasos como el omega-3 [101] muestran relación con mayores niveles de longitud telomérica. El ejercicio físico [102, 103], la reducción de estrés mediante la meditación [104] o cambios en varios patrones de estilo de vida [105] también provocan un descenso en el ratio de acortamiento telomérico, sugiriendo que el efecto de este tipo de intervenciones puede ser de gran importancia en la prevención de los efectos perjudiciales asociados al envejecimiento.

## 2. ENVEJECIMIENTO Y NEURODEGENERACIÓN: LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las células del sistema nervioso, al igual que las del resto del cuerpo, están afectadas por el proceso de envejecimiento fisiológico. Sin embargo, existe variabilidad interindividual en este proceso. El equilibrio entre los sistemas neuronales afectados y la eficacia de los mecanismos de reparación y compensatorios, es lo que determina la aparición de procesos patológicos que pueden dar como resultado declive cognitivo y neurodegeneración.

Las células del sistema nervioso, debido a su morfología y fisiología, son especialmente vulnerables al estrés oxidativo [106, 107], alteraciones en la homeostasis energética [108], acumulación de daños [109, 110] y lesiones en ácidos nucleicos [111, 112], lo cual provoca que sean más susceptibles al envejecimiento. Además, modificaciones postranslacionales en proteínas neuronales como la carbonilación, la nitración, y la unión covalente de productos de peroxidación lipídica [113], se dan durante el proceso de envejecimiento y de forma más acusada en personas afectadas por la enfermedad de Alzheimer [114].

### 2.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1907 [115] y en la sociedad actual es el tipo de demencia más frecuente, comprendiendo el 60-90% de los casos [116]. Se trata de un desorden multifactorial en el cual tanto factores genéticos como ambientales interaccionan produciendo declive cognitivo y neurodegeneración.

Existen dos variantes de la enfermedad: la forma familiar o de aparición temprana, y la forma esporádica o de aparición tardía. La forma familiar se manifiesta antes de los 65 años, mientras que la esporádica suele aparecer a partir de los 60-65 años [114]. Sin embargo, ambas formas comparten ciertos rasgos que se han determinado como características clínico-patológicas que definen la enfermedad [117-123]:

- Placas de beta-amiloide (A $\beta$ ): El péptido beta-amiloide fue descubierto en 1984 por Glenner y se origina a partir del procesamiento de la proteína precursora

amiloide (APP) mediante distintas proteasas que actúan de forma secuencial (alfa-, beta- y gamma-secretasas). La APP es una proteína transmembranal con un extremo amino-terminal situado hacia el exterior de la célula y un extremo carboxi-terminal situado hacia el citoplasma. Se localiza principalmente en las sinapsis entre neuronas y podría actuar como regulador en la formación de las mismas y en plasticidad sináptica [124, 125]. Se distinguen dos vías principales de procesamiento de la APP:

- a- Vía no-amiloidogénica: en esta vía una alfa-secretasa de la familia de las metaloproteasas (ADAM10 de manera constitutiva y ADAM17 de manera regulada) corta la APP en el aminoácido 687 liberando la parte extracelular de la APP en forma de péptido soluble.
- b- Vía amiloidogénica: en este caso la primera lisis la lleva a cabo una beta-secretasa (*beta-site APP cleaving enzyme*, BACE) en el aminoácido 671, liberando una porción extracelular soluble de menor tamaño.

Seguidamente, y de manera común a ambas vías, actúa una gamma-secretasa (presenilina, PSEN) que procesa el fragmento anclado a la membrana de la APP en los aminoácidos 712, 714 o 715. En el caso de la vía no-amiloidogénica se libera el péptido p83. En cambio, en la vía amiloidogénica el fragmento generado es un péptido de 40, 42 o 43 aminoácidos, denominado beta-amiloide ( $A\beta$ ), el cual es insoluble y forma agregados que componen las placas neuríticas presentes en la EA. Finalmente también es liberada la región intracelular del APP (*APP intra-cellular domain*, AICD).

- Ovillos neurofibrilares de proteína Tau: la proteína Tau pertenece a la familia de proteínas MAP (proteínas asociadas a microtúbulos) y se une a microtúbulos de citoesqueleto estabilizándolos. Las proteínas Tau se caracterizan por tener facilidad en fosforilarse, permitiendo así su movilidad dentro de los axones de las neuronas. En la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías se produce un fenómeno de hiperfosforilación que es el responsable de la formación intracelular de ovillos de neurofibrillas helicoidales, los cuales comprometen la capacidad de la neurona de transmitir mensajes nerviosos y pueden conducir finalmente a muerte neuronal y neurodegeneración [126, 127].



- Declive cognitivo y conductual progresivo: en un inicio se ve afectada la memoria a corto plazo, dificultad en la realización de tareas simultáneas o en la resolución de problemas. A medida que la enfermedad avanza, se pueden observar cambios en el patrón de sueño, trastornos del lenguaje, irritabilidad y cambios de humor y afectación en la memoria a largo plazo. La pérdida neuronal puede llegar al punto en el que no se mantengan las funciones esenciales y desencadenar en la muerte del individuo [128-130].

## 2.2. FACTORES DE RIESGO Y PROCESOS IMPLICADOS EN LA APARICIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

### **2.2.1. Factores genéticos**

Son los principales causantes de la forma familiar de la EA. Las mutaciones más descritas y estudiadas afectan a los genes que codifican para el APP y presenilinas 1 y 2 y se transmiten con carácter mendeliano autosómico dominante. Representan aproximadamente el 5% de los casos de EA [116].

El gen *APP* contiene 19 exones, la combinación de los cuales puede dar lugar hasta 8 isoformas de la proteína. La isoforma predominante en tejido nervioso es la APP695, la cual es posteriormente procesada por alfa-, beta- y gamma-secretasas. La lisis mediante  $\alpha$ -secretasas produce un péptido que no está presente en las placas amiloides, en cambio  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas dan lugar al péptido  $\beta$ -amiloide [131]. Según la hipótesis de la cascada amiloide, la deposición de péptidos  $A\beta_{42}$  se da en las fases iniciales de la enfermedad, dando lugar a la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares, los cuales atraen proteínas adicionales como la APOE, ubiquitinas, o proteínas del complemento que promueven la muerte celular y demencia [118, 132].

Se han identificado varias mutaciones en el gen que codifica para APP [133] siendo la V171 una de las más estudiadas ya que se estima que incrementa de 1.5 a 1.9 veces la frecuencia de producción de fragmentos  $A\beta$  de mayor tamaño [134].

Recientemente, se ha descrito una mutación menos frecuente en el gen de APP (A673T) que parece ser protectora para la EA. La mutación afecta a la región sobre la

cual actúan las  $\beta$ -secretasas, reduciendo en un 40% la formación de péptidos amiloidogénicos *in vitro* [135].

Por otro lado, las presenilinas (PSEN) 1 y 2 forman parte del complejo responsable de la actividad  $\gamma$ -secretasa [136]. Todas las mutaciones que afectan al gen de *PSEN1* aumentan la actividad  $\gamma$ -secretasa, incrementando también la producción de  $A\beta_{42}$  [137-139]. Las mutaciones en el gen *PSEN2* son menos frecuentes pero actúan al mismo nivel que las de *PSEN1*, estimulando la actividad  $\gamma$ -secretasa [140].

En cuanto a la forma esporádica de la EA, la variación alélica en el gen *APOE- $\epsilon 4$*  fue la primera variante que se estableció como marcador de riesgo [141] ya que aumenta el riesgo de dos a tres veces cuando se presenta en heterocigosis y hasta 15 veces en homocigosis [142]. Sin embargo su frecuencia en la población se estima que ronda el 27% [143].

Otros genes recientemente identificados como posibles marcadores asociados a la EA son las variantes en los genes *clusterin* (CLU), *complement receptor 1* (CR1) y *phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein* (PICALM) [144].

### 2.2.2. Factores ambientales

La teoría que relaciona la exposición a metales como el aluminio con la aparición de la EA ha sido descartada por una gran parte de la comunidad científica debido a la inconsistencia de los trabajos previos que mostraban una relación con la patología [145], la ausencia de efectos adversos a nivel cognitivo ante la exposición a aluminio demostrada en algunos estudios [146-150], las diferencias toxicocinéticas existentes entre los modelos animales y los humanos, y por último, la teoría de que los efectos de la exposición al aluminio influyen en la progresión de la patología pero no en la causalidad de la misma, ya que los factores y procesos determinantes en la aparición de la EA se dan varios años antes de la detección de los síntomas clínicos.

Sin embargo, algunos autores siguen trabajando en esta hipótesis y han demostrado la presencia de ciertas características en modelos celulares y animales y mediante estudios epidemiológicos que sugieren una posible correlación con la EA [151, 152]. Entre ellas cabe destacar la acumulación de agregados amieloides [153-157]; la

activación de la vía pro-inflamatoria del factor NF- $\kappa$ B [158, 159]; la presencia de muchos de los déficits observados en la EA tras la exposición a aluminio [160-163]; la relación entre la cantidad de aluminio ingerido en el agua y la incidencia de EA [159, 164]; y finalmente la utilización de la deferoxamina, antioxidante y quelante de iones trivalentes de hierro y aluminio, como una de las estrategias terapéuticas más efectivas para la EA [165, 166].

Otro de los determinantes ambientales que se han relacionado con la EA es la presencia de traumatismos craneoencefálicos que frecuentemente conllevan la extensión del daño producido por la liberación de citoquinas inflamatorias y la activación de microglía [167]. Por ejemplo, se ha asociado la producción de APP como respuesta cerebral al daño neuronal estableciendo una posible modulación en la progresión de la EA [168-170].

Por último, se ha visto que déficits nutritivos y metabólicos afectan a procesos de homeostasis neuronal y sináptica [171, 172], siendo así factores potencialmente implicados en la aparición y/o progresión de la EA [173-176]. Tanto el índice de masa corporal [177, 178], el consumo de antioxidantes [179-181], los niveles de vitamina B12 y homocisteína [182-184], de vitamina D [185, 186], y de ácidos grasos [187-190] se han asociado con el riesgo de padecer declive cognitivo y EA.

### **2.2.3. Envejecimiento acelerado**

Esta teoría se basa en el hecho de que los cambios patológicos característicos de la EA se presentan también en el proceso natural de envejecimiento fisiológico, con la única diferencia del grado de severidad en cada caso [191]. En individuos que no presentan declive cognitivo, se ha observado una reducción del volumen y peso del cerebro, así como pérdida de sinapsis y dendritas en áreas específicas durante el proceso de envejecimiento fisiológico [192]. Por otro lado, el principal componente molecular de las placas seniles es el péptido  $\beta$ -amiloide [193], producto de la escisión de la proteína precursora amiloide (APP) [194] que también se encuentra presente en individuos sanos mayores de 60 años [195]. Sin embargo, la presencia de ovillos neurofibrilares durante el envejecimiento fisiológico es un tema que aún genera controversia [196-199]. Otros procesos presentes durante el envejecimiento fisiológico

que parecen estar implicados en la aparición de la EA son la descomposición de la mielina [200] y la muerte celular en el locus caeruleus el cual es el encargado de proporcionar noradrenalina al cortex y estimular la microglia para suprimir la producción de A $\beta$  [201, 202].

En general, los estudios realizados hasta ahora indican que las diferencias entre un envejecimiento normal y la EA son de carácter cuantitativo más que cualitativo [203]. No obstante, la distribución de los rasgos patológicos parece diferir entre los individuos control y los pacientes de EA, siendo más localizada en áreas del lóbulo temporal durante el envejecimiento fisiológico, y propagándose a zonas de hipocampo y áreas de asociación cortical en la EA [204, 205].

#### **2.2.4. Degeneración y desconexión de redes neuronales**

Se basa en definir la EA como un síndrome de desconexión caracterizado por la desorganización de las conexiones aferentes y eferentes entre el hipocampo, la corteza cerebral y el resto del cerebro [204, 206-209]. Esta teoría se fundamenta en el hecho de que los principales marcadores moleculares de la enfermedad (en especial los ovillos neurofibrilares) se concentran en zonas cerebrales donde se producen las conexiones corticocorticales, como son las neuronas piramidales en capas III y V de áreas temporal, parietal y en lóbulo frontal. Por otro lado, se ha observado mayor vulnerabilidad a los procesos de desconexión en corteza entorrinal, área CA1 hipocampal y la amígdala, mientras que las zonas sensoriales primarias parecen ser las menos afectadas [209], y la función de la denominada *Default mode network* (DMN) también se ha descrito dañada en pacientes afectados por la EA [210].

Además, las diferentes técnicas de neuroimagen (electroencefalografía, EEG; tomografía de emisión de positones, PET; y resonancia magnética funcional, fMRI); así como estudios neuropsicológicos con tareas que requieren la integridad de las conexiones entre hemisferios y dentro de cada hemisferio por separado, han apoyado la hipótesis de desconexión tanto entre zonas anteriores y posteriores, como entre hemisferios [211-215].

### **2.2.5. Trastorno metabólico por disfunción mitocondrial**

La disfunción mitocondrial se postula como posible causa de la EA puesto que uno de los primeros cambios detectados es la modificación en la forma y tamaño de las mitocondrias, además de detectarse deficiencias en la actividad de enzimas mitocondriales como la Fosfofructoquinasa (PFK) o la Piruvato-deshidrogenasa [216]. Asimismo, la presencia de ciertos haplotipos mitocondriales se ha descrito como factor de riesgo de EA [217]. Sin embargo, la hipótesis de una cascada mitocondrial parece ser más una consecuencia del proceso amiloidogénico que una causa primaria de la enfermedad [218].

### **2.2.6. Disfunción en la barrera hemato-encefálica**

La integridad de la barrera hemato-encefálica (BHE) se ha encontrado afectada en enfermedades neurodegenerativas, entre las cuales está la EA [219]. Se ha sugerido que la presencia de A $\beta$  y la interrupción en la integridad de la barrera hemato-encefálica pueden ser factores sinérgicos en el desarrollo de la EA. Por un lado, la acumulación de A $\beta$  puede causar toxicidad endotelial y aumento en la adhesión de monocitos, lo cual agravaría el daño en la BHE. Por otro, la propia disfunción en la BHE produce acumulación de A $\beta$  por la filtración directa de esta sustancia [220, 221], insuficiencia en los mecanismos para su excreción e inducción del procesamiento del precursor de APP [222, 223]. Todo esto parece provocar patología vascular asociada a las deposiciones de A $\beta$  que podrían conducir a neurodegeneración y demencia [224].

Además, otra medida que se suele utilizar para detectar daños en la integridad de la BHE es la proporción de albúmina en líquido cefalorraquídeo respecto al total en suero [225], la cual se ha encontrado aumentada en pacientes de la EA [226-228].

### **2.2.7. Disfunción en sistema inmune**

Recientemente se han publicado varios trabajos que relacionan la presencia de marcadores inflamatorios, tanto a nivel nervioso como a nivel sistémico, con la patogenéesis de la EA [229-232]. Algunos estudios observacionales y meta-análisis muestran la asociación existente entre el aumento de marcadores inflamatorios y el riesgo de padecer demencia [233].

Se ha descrito que la activación de la microglia en cerebros de EA se asocia al depósito de A $\beta$  [234]. Alrededor de las placas de amiloide en cerebros con EA se han detectado agrupaciones de microglia y astrocitos activados [235, 236], y una sobreexpresión de una variedad de citoquinas inflamatorias como la IL-1 [237], IL-6 [238], TNF- $\alpha$  [239] o TGF- $\beta$  [240].

También se ha relacionado la EA con patologías caracterizadas por procesos de inflamación crónica y factores de riesgo vascular como la hipertensión, la diabetes mellitus o la arterioesclerosis [241-244]. Se ha sugerido que la presencia simultánea de disfunción cerebrovascular y la EA [245-248] puede conllevar efectos sinérgicos en la progresión de la demencia [249, 250].

### 2.2.8. Agentes infecciosos

Se ha establecido que la presencia de virus del herpes simple tipo 1 (HSV1) es más frecuente en ancianos que en personas jóvenes y de mediana edad [251, 252], probablemente como consecuencia del declive en sistema inmune durante el envejecimiento. De hecho se ha demostrado que el virus HSV1 puede activarse en el cerebro de manera periódica y recurrente en periodos de estrés, o de cierta inmunodeficiencia, causando muerte neuronal [253, 254] y en presencia de APOE puede facilitar la acumulación de A $\beta$  y Tau-fosforilada [255, 256].

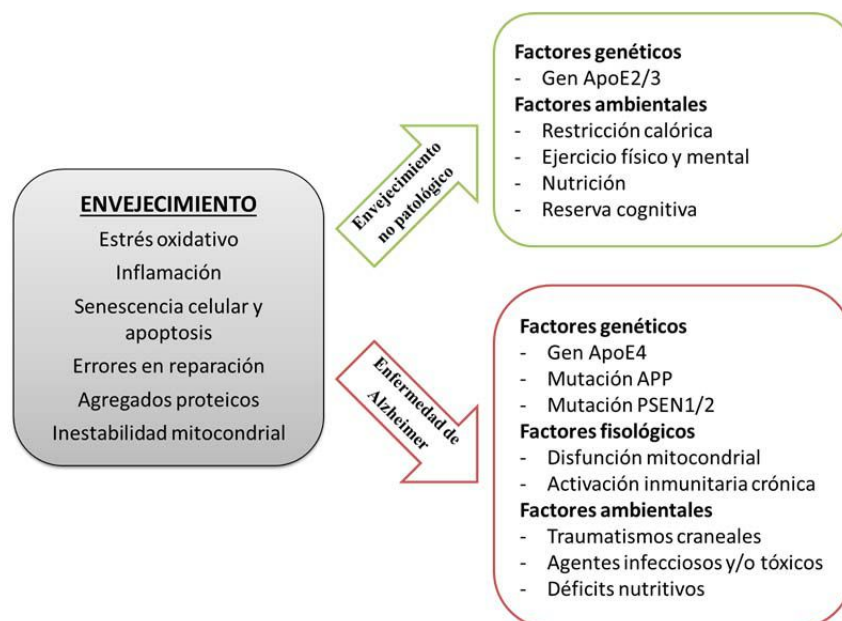


Figura 2. Factores de riesgo implicados en la aparición y progresión de la enfermedad de Alzheimer (figura inspirada en Mattson y Magnus [257]).

### 2.3. LOS RATONES SAMP8: UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Los ratones SAMP8 (*Senescence-Accelerated Mouse Prone 8*) son un modelo murino de envejecimiento acelerado que fue seleccionado fenotípicamente a partir de la cepa AKR/J por el Dr. Takeda y sus colaboradores en la Universidad de Kyoto [258]. Durante el mantenimiento de la colonia, observaron que ciertos animales presentaban signos propios de un proceso de envejecimiento acelerado, como son un descenso en la actividad motora, pérdida y empeoramiento en el aspecto del pelo, lordosis y un acortamiento significativo de la longevidad. Mediante cruzamiento entre hermanos establecieron nuevas series de animales (series P) que mantenían estos rasgos de generación en generación, mientras que los cruzamientos entre individuos aparentemente sanos establecieron las series R (resistentes). Basándose en los fenotipos patológicos que expresaban y su longevidad establecieron diferentes líneas P y R.

Los ratones SAMP8 presentan de manera prematura los rasgos propios de un proceso de envejecimiento además de un acortamiento significativo de su esperanza de vida. A nivel cognitivo, los ratones SAMP8 muestran déficits en aprendizaje y memoria espacial [259-261], deterioro en la adquisición y ejecución de tareas de evitación pasiva y activa [262, 263], de condicionamiento por miedo (*fear conditioning*) [264] y de reconocimiento de objetos [265, 266]. A nivel histológico, los ratones SAMP8 presentan pérdida neuronal, reducción en la densidad de espinas dendríticas, patrones de degeneración espongiiforme, microgliosis y astrogliosis en hipocampo y otras regiones cerebrales (Tabla 1). También se han detectado en cerebro de ratones SAMP8 la acumulación de A $\beta$  [267-269] y la hiperfosforilación de Tau [270, 271]. Además, los ratones SAMP8 presentan alteraciones en la barrera hematoencefálica, reducción de la población de células de Purkinje en cerebelo [272] y aumento de estrés oxidativo por disfunción mitocondrial [270, 273-276], alteraciones de los ritmos circadianos y aumento en marcadores inflamatorios [276, 277]. Por todo esto, los ratones SAMP8 se consideran un buen modelo de envejecimiento acelerado y de enfermedad de Alzheimer [278-280].

En la mayoría de estudios que emplean el modelo SAMP8, los ratones SAMR1 (*Senescence-Accelerated Mouse Resistant 1*) son utilizados como modelo control puesto que son genéticamente similares a los primeros pero muestran un fenotipo de envejecimiento normal.

Tipo	Localización	Método	Característica	Edad (meses)	Referencias
Pérdida neuronal	Hipocampo	Fraccionador óptico	El número de células piramidales en CA1 se redujo en un 15,6%	8	[261]
			El número celular en giro dentado y CA3 se redujo un 20%	8	
	Corteza cerebral	Tinción de Nissl	Pérdida neuronal acusada Pérdida neuronal	5 10	[270, 281]
	Prosencefalo	Inmunotinción	Descenso de neuronas colinérgicas en región septal	8	[282]
Pérdida espinas dendríticas	Hipocampo	Tinción de Golgi	Reducción de 6,6-24% en densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1	8	[283, 284]
			Descenso y empeoramiento	6 y 9	
Espongiosis	Tronco encefálico y médula espinal	Microscopía óptica	Aparición vacuolas dendríticas	1-2	[285]
			Degeneración espongiiforme	4 y 8	
	Cerebro completo	Microscopía óptica	Degeneración espongiiforme	11	[285]
	Hipocampo	Microscopía óptica	Presencia de vacuolas	10	[286]
Microgliosis	Corteza cerebral	Inmunohistoquímica	Aumento células OX6+	5	[270]
Astroglíosis	Corteza cerebral	Inmunohistoquímica	Mayor número astrocitos GFAP+ alrededor de vasos sanguíneos	5	[270]
			Hipocampo	Inmunohistoquímica	
	Tronco encefálico y médula espinal	Inmunohistoquímica	Mayor número astrocitos GFAP+ en zonas con vacuolas	2	[285]
			Astrocitosis	4 y 8	
	Materia blanca	Inmunohistoquímica	Astrocitosis	11	[285]

Tabla 1. Características de la enfermedad de Alzheimer detectadas en SAMP8 (Traducida de Cheng et al. [280]).



### 3. EPIGENÉTICA Y ENVEJECIMIENTO

#### 3.1. DEFINICIÓN Y MECANISMOS

La epigenética es la ciencia que estudia los mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica, de manera estable pero potencialmente reversible y sin que conlleve alteración de la secuencia de nucleótidos del ADN [288]. Estos procesos se pueden dar directamente sobre las moléculas de ADN, como en el caso de la metilación de ADN; sobre las proteínas implicadas en el empaquetamiento de la cromatina, como la modificación de histonas; o sobre la funcionalidad del ARN mensajero producido, mediante los llamados ARNs no codificantes entre los cuales se incluyen los microARNs.

##### 3.1.1 Metilación del ADN

El ADN de los vertebrados sufre modificaciones covalentes que consisten en la adición de grupos metilos en los nucleótidos de citosina, principalmente en los pares de bases con secuencia CpG [289, 290]. En menor medida, se ha descrito también la metilación del ADN en pares de bases con secuencias CpA y CpT, en plantas [291], en células madre embrionarias en *Drosophila* [292] y estadios iniciales del desarrollo embrionario de ratón [293].

El radical metilo de la metilcitosina reside y ejerce su función en el surco mayor de la hélice de ADN, lugar donde la mayoría de las proteínas se unen. Existe una familia de proteínas que se unen específicamente al ADN metilado, son las *Methyl-CpG-binding proteins* y reclutan complejos represores en las regiones promotoras de los genes, contribuyendo al silenciamiento transcripcional. Ciertos factores de transcripción se unen a las secuencias de ADN que contienen secuencias CpG no-metiladas, de manera que la metilación de ADN en esos casos previene la unión de proteínas, inhibiendo también la transcripción. En algunos casos, como el del gen *IGF2* (insulin-like growth factor 2) silenciado en el alelo materno durante el desarrollo, la metilación del promotor activa la transcripción ya que permite la interacción entre el gen y sus potenciadores (*enhancers*) [294].

En efecto, estudios moleculares y genéticos han mostrado que la metilación del ADN está asociada con silenciamiento génico y ejerce un papel fundamental en procesos de desarrollo embrionario como la inactivación del cromosoma X en hembras o los mecanismos de *imprinting* que definen qué alelo, materno o paterno, será el que se exprese en el embrión. Además la metilación del ADN también ejerce un papel en el silenciamiento de retrotransposones endógenos y en el establecimiento de los patrones de expresión génica específicos de tejido.

Aunque los patrones de metilación del ADN se transmiten en la división celular, no son permanentes. Se pueden producir cambios en respuesta a factores externos como el entorno y también como consecuencia de procesos internos oncogénicos o de envejecimiento celular. La enzima Dnmt1 tiene actividad ADN metiltransferasa y es la responsable del mantenimiento del patrón de metilación en la división celular ya que se une preferencialmente al ADN hemimetilado, en el cual sólo una de las cadenas de ADN está metilada. La DNMT3A y DNMT3B son las metiltransferasas que se encargan del establecimiento de patrones de metilación *de novo*. La inactivación de ambos genes, *DNMT3A* y *DNMT3B*, es letal en las primeras etapas embrionarias.

El ADN en mamíferos está metilado en un 70% de los pares CpG [295], principalmente en los llamados ADN satélite, elementos repetitivos como transposones, ADN presente entre genes y exones. Como excepción está el caso de las islas CpG, las cuales contienen secuencias ricas en pares CpG y se suelen situar en los promotores génicos. Su estado de metilación obedece a otro tipo de regulación, ya que es su metilación la que determina la actividad transcripcional del gen.

La represión de la transcripción viene dada, tanto por la imposibilidad de los factores de transcripción de unirse a la hebra de ADN como por la atracción de complejos correpresores específicos de zonas metiladas. Existen varios ejemplos de esto, la proteína MeCP2 reconoce y se une al ADN metilado y atrae a su vez la unión del complejo corepresor mSin3a, dependiendo así de la deacetilación de histonas para ello [296, 297]. MBD1 actúa conjuntamente con la metiltransferasa SETDB1 durante la replicación del ADN [298] lo que conlleva también a cambios de metilación de histonas. MBD2 por su parte forma parte del complejo MeCP1 el cual incluye al complejo corepresor NuRD que contiene diferentes deacetilasas de histonas y otras

proteínas remodeladoras. Cada proteína de reconocimiento y unión a zonas metiladas de ADN parece ser específica de secuencia ya que no se ha encontrado solapamiento ni competición entre ellas [299]. Además, la metilación del ADN parece estar asociada con otras marcas epigenéticas como la trimetilación en histona H3 lisina 9 (H3K9me3) [300-302].

### 3.1.2 Modificaciones de histonas

El ADN, de aproximadamente unos dos metros de longitud es empaquetado en apenas unas pocas micras en el núcleo de la célula. Para conseguir este nivel de compactación, la doble hélice se pliega alrededor de los nucleosomas, unidad básica de la cromatina [303]. Los nucleosomas están formados por un octámero de proteínas compuesto por 4 pares de histonas (H2A, H2B, H3 y H4), alrededor de las cuales se enrollan 147 pares de bases de ADN. Entre cada uno de los nucleosomas existe un ADN espaciador, de entre 0 y 80 pares de bases que otorga flexibilidad a la fibra de cromatina. Posteriormente, estos nucleosomas son empaquetados unos sobre otros mediante la acción de la histona H1 formando lo que se conoce como "fibra de 30nm".

Los extremos N-terminales de las histonas son flexibles y quedan expuestos fuera del nucleosoma donde pueden sufrir modificaciones covalentes en sus residuos por la adición de grupos metilo o acetilo, entre otros. Estas modificaciones pueden actuar en *cis*, afectando la conformación de la propia cromatina; o en *trans*, impidiendo la unión de ciertos factores de transcripción o alterando los sitios de reconocimiento para atraer otros efectores específicos. Todo ello da como resultado la activación o silenciamiento de la expresión génica de la región donde se localizan.

#### 3.1.2.1 Metilación

La metilación de histonas es un mecanismo complejo, ya que se puede dar tanto en lisinas como en argininas y puede tener como resultado la activación o el silenciamiento de la expresión génica dependiendo del tipo de histona, el aminoácido en que se encuentre y la cantidad de grupos metilo que contenga. Las lisinas pueden estar mono- (me1), di- (me2) o tri- (me3) metiladas, mientras que las argininas pueden estar mono- (me1) o di- (me2) metiladas. Las enzimas implicadas en añadir grupos metilo a los residuos de histonas son las metiltransferasas y las que los eliminan, las demetilasas, y

ambos tipos son específicos del residuo que modifican. La metilación en lisinas (K) ha sido ampliamente caracterizada en los residuos de histona H3 lisinas 4, 9, 27, 36 y 79 e histona H4 lisina 20 [304]. En general la metilación en H3K4, H3K36 y H3K79 está relacionada con activación transcripcional y el resto con silenciamiento, sin embargo se ha descrito que ciertas marcas como la H3K36 o la H3K9 pueden actuar activando o reprimiendo en función de si la modificación se da en el promotor o en la zona de codificación de la proteína [305]. Además, las modificaciones en H3K79 y H4K20 se han asociado también a procesos de reparación de ADN. En la Tabla 2 se enumeran las metilaciones de histonas más descritas y el tipo de actividad que se les asocia.

<b>Residuo modificado</b>	<b>Enzima metiltransferasa</b>	<b>Enzima demetilasa</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
H3K4	MLL1, MLL2, MLL3, MLL4, MLL5, SET1A, SET1B, SETD7, ASH1	LSD1, JARID1A, JARID1B, JARID1C	Activación transcripcional	[306-311]
H3K36	SET2, NSD1, SYMD2	JHDM1a, JHDM1b, JMJD2A, JMJD2C	Activación transcripcional (elongación)	[312-316]
H3K79	DOT1	n/c	Activación transcripcional (elongación) DDR	[317-319]
H3K9	SUV39H1, SUV39H2, SETDB1, EHMT1, EHMT2/G9a, CLL8	LSD1, JHDM2a, JHDM2b, JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C, JMJD2D	Silenciamiento transcripcional en zona promotora Heterocromatinización Puede estar presente en zona codificante de genes activos	[300, 305, 312, 315, 316, 320-328]
H3K27	EZH2	KDM6A, KDM6B	Silenciamiento transcripcional Inactivación cromosoma X	[327, 329]
H4K20	SUV420H1, SUV420H2	n/c	Silenciamiento transcripcional Heterocromatinización y DDR	[330, 331]
H3R2	PRMT6	JMJD6? (no está clara su función como demetilasa)	Represión transcripcional y bloqueo de la marca H3K4me3	[332-336]
H3R17	PRMT4	n/c	Activación transcripcional	[337]
H3R26	PRMT4	n/c	n/c	[338]
H3 R8	PRMT5	n/c	Represión transcripcional	[339, 340]
H4R3	PRMT1, PRMT5, PRMT6	JMJD6? (no está clara su función como demetilasa)	PRMT1 activación transcripcional PRMT5 represión transcripcional PRMT6 activación transcripcional	[332, 336, 339, 341-344]

Tabla 2. Metilación de histonas (n/c, no conocida)

La trimetilación en H3K4 ha sido una de las marcas epigenéticas más estudiadas. Se localiza principalmente en el extremo 5' de los genes y está relacionada con activación transcripcional [345]. Para su establecimiento, es necesaria la acción conjunta de la ARN polimerasa II, previamente fosforilada en serina 5 del dominio carboxiterminal, y la enzima metiltransferasa que es la que tiene la función catalítica. También se ha descrito que la monoubiquitinización de H2B en lisina 120 parece estar implicada en el establecimiento de esta marca epigenética, ya que el estado conformacional que adquiere el nucleosoma al estar ubiquitinizado permite la metilación en H3K4 por SET1 [346, 347]. Además, la metilación en H3K4 parece influir en el establecimiento de otras marcas epigenéticas. Por ejemplo, la metilación en H3K9 por la metiltransferasa SUV39H es prevenida *in vitro* si H3K4 está metilada y H3S10 fosforilada, impidiendo así el silenciamiento génico en genes transcripcionalmente activos. Otra de las marcas ampliamente estudiada es la metilación en H3K36, la cual se localiza principalmente en la región codificante de los genes y parece ser necesaria durante la transcripción para la eficiencia en la fase de elongación por parte de la ARN polimerasa II. Por su parte, la metilación en H3K79 es poco frecuente ya que se encuentra localizada en el núcleo del nucleosoma y no en las colas de las histonas.

La trimetilación en histona H3 lisina 9 es una marca asociada a silenciamiento génico que parece estar implicada también en el el proceso de heterocromatización [348, 349] y metilación del ADN [304, 346]. La metilación en histona H3 lisina 27 se encuentra principalmente en genes de eucromatina, zona de heterocromatina pericentromérica y en el cromosoma X inactivado en mamíferos y ha sido asociada a diferentes tipos de cáncer [304]. La metilación en histona H4 lisina 20 está presente en las zonas de heterocromatina pericentromérica y parece requerir la presencia previa de metilación en histona H3 lisina 9.

La primera enzima caracterizada responsable de la demetilación de las lisinas fue LSD1 (o KDM1A, lysine (K)-specific demethylase 1A) [310]. Pertenece a la familia de las aminooxidasas dependientes de FAD (*flavin adenine dinucleotide*) y se encarga de eliminar grupos metil de histona H3 lisina 4 mono- o dimetilada, con lo que se relaciona principalmente con represión génica. Sin embargo, LSD1 también parece tener un papel en activación génica del receptor de andrógenos (AR) [322, 350, 351].

Otro grupo de demetilasas comparten una estructura catalítica común denominada *JmjC-domain*. A diferencia de LSD1, el mecanismo de acción de estas enzimas no requiere de un grupo  $\epsilon$ -amino susceptible de ser protonado. Por esto, pueden actuar en todos los grados de metilación existentes (mono-, di- y trimetilación).

Por último, la metilación en argininas se ha relacionado con la regulación positiva y negativa de la transcripción. Los residuos H4R3, H3R2, H3R17 y H3R26 [352, 353] se han relacionado con la activación transcripcional y son captados por factores de transcripción como p53 o NF $\kappa$ B. En cambio, H3R8 y H4R3 se asocian con represión génica [339, 342].

### 3.1.2.2 Acetilación

La adición de grupos acetilos a los extremos expuestos de las histonas se suele asociar con una activación transcripcional. Se considera que la neutralización de la carga positiva de la lisina por la acetilación, reduce la fuerza de la unión entre las histonas y el ADN, lo cual crea una relajación de la cromatina haciéndola más accesible a los factores de transcripción [354]. Por otro lado, la acetilación en residuos de lisina es una marca reconocida por los bromodominios presentes en proteínas de unión a la cromatina [355] que a su vez, pueden formar parte de otros complejos remodeladores de cromatina [356].

En general, los factores activadores de expresión génica reclutan histonas acetiltransferasas (HAT) que incorporan grupos acetilos (Tabla 4), y los factores represores atraen la unión de histonas deacetilasas (HDAC) que eliminan grupos acetilos (Tabla 5).

Residuo modificado	Enzima acetilasa	Función	Referencia
H2AK5	CBP/P300, TIP60	Activación transcripcional	[357, 358]
H2BK12	CBP/P300	Activación transcripcional	[358, 359]
H2BK15	CBP/P300	Activación transcripcional	[358, 359]
H3K9	GCN5, PCAF	Activación transcripcional	[360-362]
H3K14	CBP/P300, GCN5, MYST2, PCAF, TIP60	Activación transcripcional TIP60 en DDR	[357, 358, 363-365]
H3K18	CBP/P300, PCAF	Activación transcripcional y DDR	[337, 358]
H4K5	HAT1, CBP/P300, GCN5, MYST2, TIP60	Posicionamiento histonas Activación transcripcional DDR	[357, 358, 363, 364, 366-368]
H4K8	CBP/P300, GCN5, MYST2, TIP60	Activación transcripcional y DDR	[357, 358, 363, 364, 366, 367, 369-371]
H4K12	HAT1, GCN5, MYST2, TIP60	Posicionamiento histonas Silenciamiento telomérico Activación transcripcional DDR	[357, 358, 363, 364, 366-369, 371]
H4K16	GCN5, MYST1, TIP60	Activación transcripcional y DDR	[357, 363, 364, 366, 370, 372]

Tabla 4. Enzimas implicadas en la acetilación de histonas

Clase	Enzima
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8
IIA	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9
IIB	HDAC6, HDAC10
IV	HDAC11
III	SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7

Tabla 5. Enzimas implicadas en la deacetilación de histonas

Existen dos grandes grupos de acetiltransferasas, las nucleares o tipo A y las citosólicas o tipo B (entre las cuales se incluye la HAT1, que acetila las histonas solubles cuando son sintetizadas antes de ser importadas al núcleo). Dentro de las acetiltransferasas nucleares se han descrito tres familias clasificadas según las regiones conservadas que contienen en su secuencia: GNAT que acetila H3; MYST que acetila H4 y CBP/p300 que puede acetilar H3 y H4 [373]. CBP/p300 tiene la propiedad de auto-acetilarse incrementando así su actividad y además, puede acetilar otros sustratos diferentes a las histonas entre ellos algunos factores de transcripción [374]. Las diferentes familias de HAT no comparten homología en sus secuencias, sin embargo como característica común presentan una estructura tridimensional globular con un núcleo central que permite la unión del cofactor acetil-coenzima A (Ac-CoA) [375].

Existen cuatro familias de HDACs. Las de tipo I, II y IV no requieren cofactor para deacetilar, mientras que la de tipo III requieren del cofactor NAD<sup>+</sup> como parte de su mecanismo de catalización. En general no presentan mucha especificidad en cuanto al residuo acetilo que eliminan y están presentes en numerosos complejos represores. Regulan procesos de proliferación celular, diferenciación, senescencia, apoptosis, cáncer, metabolismo y funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria [376, 377].

### 3.1.2.3 Fosforilación

La fosforilación de proteínas juega un papel clave en vías de señalización celular. En 1991 el Dr. Mahadevan y sus colaboradores observaron que la estimulación del ciclo celular y activación de la transcripción de los genes “immediate-early” correlacionaba con la fosforilación de histona H3 [378]. Se han identificado varias quinasas que actúan en este residuo, como la MSK1/2 y la RSK2 [379-381]. El residuo de serina 10 en histona H3 es una marca mantenida entre especies desde levaduras a humanos y ha sido especialmente caracterizada en *Drosophila* [382], donde se ha descrito que su fosforilación tiene un papel importante en la regulación de la transcripción y en procesos de condensación cromosómica desplazando a la proteína de unión HP1 [383].

### 3.1.2.4 Otras modificaciones

La ubiquitinación y la sumoilación son modificaciones post-traduccionales que, a diferencia de la metilación, acetilación y fosforilación, incrementan en aproximadamente dos tercios el tamaño de las histonas. La ubiquitinación consiste en la adición de una molécula de ubiquitina formada por 76 aminoácidos y una glicina, y puede ser una marca represora o activadora, en función del lugar en el que se posicione. Por ejemplo, la monoubiquitinación en H2B es activadora transcripcional [384-386] y está relacionada con el establecimiento de metilación en H3K4 [387, 388]. La monoubiquitinación en H2A, en cambio, es una marca asociada al silenciamiento génico [389]. La sumoilación es la adición de una proteína llamada SUMO (small ubiquitin-related modifier) de 11kDa, es una marca represiva que actúa bloqueando los residuos de lisina que no pueden ser metilados o ubiquitinados, de este modo las



enzimas HDACs son atraídas y se encargan de eliminar los grupos acetilo presentes en esa región de cromatina [390].

La desiminación es la conversión del aminoácido arginina en citrulina por acción de las Peptidilarginina deiminases (PADs). En concreto se ha demostrado que la PADI4 puede llevar a cabo esta reacción en las argininas presentes en histonas [391, 392]. Por otro lado, la aparición de citrulina en histona H3 y H4 correlaciona con la desaparición de la metilación en argininas *in vivo*, y podría actuar como un antagonista del efecto activador de la transcripción dependiente de la metilación de argininas.

### 3.1.3 ARNs no codificantes

Los ARN no codificantes se dividen en función de su tamaño en lncARNs (*long non-coding* ARNs) y sncARNs (*short non-coding* ARNs) de más y menos de 200pb, respectivamente. Dentro de los sncARNs se incluyen los snoARNs (de 70 a 100 nucleótidos que actúan modificando otros ARN como el ribosomal y el de transferencia), los piARNs (de 26 a 31 nucleótidos que forman complejos de ARN y proteínas piwi y actúan en el silenciamiento de retrotransposones y otros genes de células germinales), los siARNs (de 20 a 25 nucleótidos que actúan como pequeñas moléculas de ARN de interferencia silenciando la expresión génica), y los microARNs (miARNs).

Los microARNs se identificaron por primera vez en *C.elegans* [393] y corresponden a fragmentos de ARN no codificante de entre 18 y 25 nucleótidos que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional [394]. Los microARNs son inicialmente transcritos en forma de miARN primario (pri-miARN) el cual forma una estructura de bucle. Seguidamente, este precursor es procesado en el núcleo por la enzima DROSHA para formar el pre-miARN de unos 70 nucleótidos de tamaño que será exportado al citoplasma por la enzima Exportina 5 y procesado por la enzima DICER para formar ARN de doble cadena (miARN-miARN\*). La hebra de ARN que llevará a cabo la regulación génica es incluida dentro del complejo miRISC. Por su parte, la hebra complementaria (marcada con un asterisco en la nomenclatura clásica) se creía que era simplemente degradada pero nuevos trabajos apuntan hacia un posible papel como modulador de la función celular [395, 396].

Los miARNs reconocen un ARN mensajero (ARNm) en base a la homología de secuencias [397]. En función del nivel de complementariedad, el silenciamiento de expresión se producirá mediante la degradación del ARNm (en el caso de que la complementariedad de bases sea total) [398-400], o por bloqueo del acceso de la maquinaria de la traducción en los ribosomas [401-403].

El análisis de expresión y funcionalidad de los microARNs mediante plataformas basadas en microarrays de expresión, secuenciación y PCR a tiempo real, ha revelado el papel de los miARNs como factores reguladores de vías de señalización imprescindibles para la homeostasis y diferenciación celular, regulación epigenética y respuesta frente a daños en el ADN, entre otros [404-406]. Actualmente existen varias bases de datos de miARNs, entre las cuales destaca miRBase (<http://www.mirbase.org/>) por ser una de las más actualizadas y con mayor cantidad de información sobre las secuencias de miARNs maduros, precursores, localización, predicción de genes diana y bibliografía. También hay disponibles otras páginas como GOMir ([http://www.bioacademy.gr/bioinformatics-/GOMir/bioinformatics\\_home.htm](http://www.bioacademy.gr/bioinformatics-/GOMir/bioinformatics_home.htm)) especializadas en predicción de genes dianas y agrupación mediante categorías ontológicas.

La mayoría de miARNs son específicos de tejido [394, 407]. En sistema nervioso central los microARNs modulan procesos de gran relevancia funcional [408-411] como la neurogénesis [412, 413], crecimiento de dendritas [414, 415] y formación de espinas dendríticas [416, 417]. La especificidad de expresión en cerebro se da a diferentes niveles. Se ha observado que el hipocampo y el córtex son dos áreas del cerebro especialmente ricas en expresión de miARNs, y se ha sugerido su implicación en el establecimiento de la memoria y en procesos de plasticidad neuronal [418]. El tipo celular también es uno de los determinantes en la expresión de ciertos miARNs, ya que los circuitos glutamatérgicos y las neuronas GABAérgicas tienen perfiles de expresión diferenciales de otros tipos neuronales [419, 420].

Asimismo, la localización dentro de la neurona también es un rasgo específico de cada miARN. Por ejemplo miR-26a se encuentra enriquecido en dendritas [421], mientras que otros como miR-200c, miR-339, miR-7 o miR-137 se localizan principalmente en la región sináptica; o miR-15bm, miR-16 y miR-221 que se encuentran en el axón neuronal [422].

## 3.2. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS ASOCIADAS AL ENVEJECIMIENTO

### 3.2.1 Metilación ADN

Con el proceso de envejecimiento se produce una reducción de los niveles globales de metilación en el ADN así como un aumento en zonas específicas. Estudios comparativos entre grupos de diferentes edades de sangre humana [423-427] y otros tejidos [428-430] corroboran estos resultados.

Sorprendentemente, la hipometilación asociada a envejecimiento se produce principalmente en los denominados transposones (*transposable repetitive elements*). La propiedad principal de los transposones es insertarse en diferentes partes del genoma de manera autónoma, pudiendo provocar cambios en la expresión del gen donde se inserta o incluso afectando de manera irreversible su funcionalidad si rompe su secuencia durante la transposición. Alguno de ellos, como por ejemplo *Alu* y *L1*, suelen encontrarse reprimidos, de manera que la eliminación de metilación en el ADN asociada a envejecimiento en estos elementos supone un incremento en la inestabilidad genómica. Otras regiones sensibles a la hipometilación durante el envejecimiento incluyen regiones promotoras ricas en CpG de genes inflamatorios como *IGF2* [431], *TNF* [432], *iNOS* y *TLR2* [426].

A su vez, durante el envejecimiento también se observa una hipermetilación en ciertas regiones del genoma. Por ejemplo, se han descrito alteraciones en el patrón de metilación de islas CGs en genes reguladores de la transcripción [427], específicos de tejido [433], implicados en desarrollo y diferenciación [434], apoptosis [435], senescencia [436] o asociados con cáncer [437]. En un estudio llevado a cabo por Bocklandt y colaboradores [438] se identificaron 3 genes (*EDARDD*, *TOMIL1* y *NPTX2*) de un total de 88 relacionados con el proceso de envejecimiento con una relación entre el patrón de metilación y la edad que se ajustaba a un modelo de regresión lineal, pudiéndose considerar candidatos para predecir la edad fisiológica con una precisión de 5.2 años.

Por otra parte, también se ha descrito un descenso de los niveles de las enzimas DNMT1 y DNMT3a y un incremento de DNMT3b en células somáticas durante el envejecimiento [439, 440]. En ratones se ha visto que la insuficiencia de DNMT1 [424]

y DNMT3a [441] provoca alteraciones en el aprendizaje y la memoria de manera dependiente a la edad. En *Drosophila*, la sobreexpresión de DNMT2 (la única metiltransferasa de ADN presente en esta especie) provoca un incremento en la esperanza de vida de hasta el 58% [442]. Sin embargo, el enzima DNMT2 de mamíferos no actúa como metiltransferasa de ADN sino de ARN [443]. Aún así, estos resultados indican que la metilación en ADN puede ser importante para determinar la esperanza de vida. Sin embargo, algunos autores sugieren una regulación más compleja para explicar los cambios observados en el estado de metilación en el ADN durante el envejecimiento, en la cual se incluyen otros factores como el efecto del entorno y los hábitos de vida o la localización del gen estudiado [444].

### 3.2.2 Modificaciones de histonas

Algunas de las modificaciones de histonas que afectan el envejecimiento y la longevidad incluyen enzimas y cofactores responsables de acetilación y metilación de histonas. *Caenorhabditis elegans* es una especie de nematodo muy utilizado en genética del desarrollo y longevidad ya que posee ciertas características que lo hacen un buen modelo de estudio. Presenta un aspecto transparente a contraluz, facilitando su observación bajo el microscopio; posee muchos de los órganos y sistemas de otros organismos; tiene un mantenimiento muy fácil a nivel de alimentación y reproducción y tiene una esperanza de vida de entre dos o tres semanas permitiendo estudiar los procesos de envejecimiento y longevidad en un plazo de tiempo muy corto. Por ejemplo, la sobreexpresión de la histona deacetilasa SIR-2, responsable de la acetilación en H4K16, se ha asociado con un aumento en la longevidad de *C.elegans* [445-447].

El estado de metilación de histonas parece ser un determinante de la longevidad en *C.elegans*. Por ejemplo la inhibición de las metiltransferasas ASH-2 y SET-2 se ha asociado con una reducción global en los niveles de H3K4me3 que extiende la esperanza de vida. En cambio, la inhibición de la demetilasa RBR-2 reduce la longevidad [448, 449]. Además, la inhibición de UTX-1, enzima responsable de demetilar la marca de silenciamiento H3K27me3, aumentó la esperanza de vida [450, 451].

En mamíferos la alteración del homólogo a SIR-2, SIRT1, produce mejoras en la respuesta a estrés, la supervivencia celular mediante la regulación de p53 [452] y el metabolismo [453] pero tiene muy poco efecto en términos de longevidad [454, 455]. De manera similar, la inhibición de las histonas deacetilasas HDAC de clase I y II en ratón no produce cambios en la longevidad, pero revierte el declive en aprendizaje y memoria asociado a envejecimiento, relacionados con cambios en los niveles de H4K12ac en regiones codificantes y de inicio de la transcripción [456].

La deacetilasa SIRT6 que modifica los residuos de H3K9 y H3K56, es un factor necesario en la reparación de ADN dañado, y se ha observado que su deficiencia afecta a la longevidad y causa envejecimiento prematuro [457]. Por último, en primates y líneas celulares humanas, también se han encontrado asociaciones entre envejecimiento y aumento global en los niveles de H3K4me2 [458], H4K20me2 y H3K79me2 [459], y reducción global en H3K9me3 y H3K27me3 [460, 461] y aumento en acetilación global de histonas [462, 463].

Otro de los procesos alterados durante el envejecimiento es el sistema de reparación de daños del ADN, el cual requiere la presencia de ciertas modificaciones en histonas en particular la fosforilación en H2AX [464]. Esta modificación esta aumentada con la edad en roedores y modelos humanos con envejecimiento prematuro [465-467].

### 3.2.3 microARNs

Recientemente se ha comenzado a describir la implicación de los microARNs en la longevidad y los procesos de envejecimiento [468]. En general, la expresión global de los miARNs va disminuyendo con la edad mientras que algunos específicos asociados a patologías propias del envejecimiento, aumentan su expresión [469].

En *C.elegans* se han identificado unos 200miARNs de los cuales más del 50 % contienen secuencias conservadas en humanos y más del 25 % son sensibles al envejecimiento [470, 471]. Entre estos últimos, los niveles de expresión de mir-71, mir-246 y mir-239 pueden provocar cambios de hasta un 47% en la esperanza de vida [472], algunos aumentándola (mir-239) y otros disminuyéndola (lin-4, mir-71 y -238) [473, 474]. Otros microARNs como let-7 o miR-1, conservados en organismos superiores, también se relacionan con procesos de envejecimiento [475].

Una de las vías de señalización modulada por algunos de estos microARNs, es la vía de la insulina/IGF, ampliamente asociada a la regulación de la senescencia [472, 474]. Algunas mutaciones en genes implicados en la vía de señalización de la insulina/IGF modifican la esperanza de vida en *C.elegans* [476], *Drosophila* [477] y ratón [478]. Entre los microARNs que regulan esta vía se encuentran lin-4 que modula la expresión de DAF-16 (inhibidor transcripcional que se activa por IGF-1) [479], miR-216a, miR-217 y miR21 que regulan PTEN (inhibidor de la vía de Akt mediante defosforilación de PIP<sub>3</sub>) [480, 481] y miR-1, miR-320 y miR-206 que inhiben la expresión de IGF-1 [482, 483].

Otra vía de gran importancia en la modulación de la longevidad afectada por la expresión de microARNs es la vía de TOR [484]. Esta vía estimula el crecimiento celular y bloquea la autofagia en respuesta al contexto nutricional y la presencia de factores de crecimiento [485]. La inhibición de la vía de TOR aumenta la longevidad en levadura [486], *C.elegans* [487, 488], *Drosophila* [489] y ratón [490].

También es importante destacar la acción de los microARNs sobre SIRT1, factor con un papel importante en longevidad y envejecimiento. Entre ellos se encuentran miR-217 cuya expresión aumenta con la edad [491], miR-34a regulado a su vez por p53 (diana de SIRT1) [492], miR-199a [493] y miR-132 [494].

Por último, diversos microARNs se han relacionado con la manifestación de algunas patologías crónicas asociadas al envejecimiento. Por ejemplo, miR-1, miR-122 y miR-375 se han relacionado con hipertrofia e insuficiencia cardíaca [495-497], miR-1 y miR-206 con hipertrofia muscular y sarcopenia [498-500] y miR-21, con regulación del perfil lipídico [501, 502]. A nivel de sistema nervioso central, varios estudios han mostrado variaciones en el patrón de expresión de miARNs en modelos de EA [503-505]. Por ejemplo, se ha descrito la disminución de miR-124 en cerebros de pacientes de Alzheimer [506], y alteraciones de miR-101 que modula la proteína precursora amiloide (APP) [507], y de miR-195, miR-107, miR-298 o miR-29a/b-1, implicados en el control traduccional de la enzima beta-secretasa 1 (BACE) [508-511].

## 4. EJERCICIO FÍSICO Y ENVEJECIMIENTO

Una de las principales recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud es mantener un estilo de vida físicamente activo a lo largo de toda la vida. En jóvenes, hasta los 17 años se recomienda invertir un mínimo de 60 minutos diarios en actividades físicas de intensidad moderada que incluyen juegos, deportes y actividades recreativas y educación física. En adultos de 18 a 64 años, se recomiendan 150 minutos semanales de actividad física aeróbica moderada o bien 75 minutos de intensidad elevada, con el fin de mejorar las funciones cardiorrespiratorias y musculares y la salud ósea. También se recomienda la incorporación de actividades de fortalecimiento muscular un mínimo de dos veces por semana. En el caso de adultos de más de 65 años, se recomienda mantener una actividad física activa coherente con el estado de salud la persona, mediante actividades recreativas o de ocio, desplazamientos y paseos, y otras actividades realizadas en el contexto familiar y comunitario. De igual forma que en individuos adultos, las recomendaciones mínimas en personas de edad avanzada son de 150 minutos semanales, teniendo especial importancia en este grupo de edad las actividades de refuerzo muscular y la incorporación de actividades de mejora de equilibrio. Numerosos estudios muestran los beneficios psicoemocionales y neurofisiológicos del ejercicio físico [512] con particular interés en los efectos saludables durante el envejecimiento [513-515].

### 4.1. MODELOS EXPERIMENTALES DE EJERCICIO FÍSICO

Existen diferentes métodos para valorar la actividad física en humanos, siendo los más empleados la valoración personal mediante cuestionarios, el uso de sensores de movimiento, medidas de la tasa metabólica y de otras características cardiorespiratorias. Uno de los métodos utilizados es la evaluación del gasto energético durante las actividades cotidianas de la persona en periodos prolongados de tiempo mediante la administración de agua que contiene isótopos de oxígeno e hidrógeno marcados [516]. Aunque este método proporciona ciertas ventajas en la valoración durante la vida normal de los sujetos de estudio en periodos prolongados de tiempo, no aporta información del tipo, frecuencia, duración e intensidad de la actividad física realizada. Otro método utilizado es la observación directa o a través de grabaciones de las principales actividades cotidianas, aunque este método se suele utilizar sólo en

grupos pequeños y actividades específicas. El uso de sensores de movimiento, como podómetros y acelerómetros, también es uno de los métodos escogidos en el estudio de la actividad física en humanos. Mediante este tipo de herramientas, se puede obtener información sobre la frecuencia e intensidad de la actividad física realizada [517]. Sin embargo, el uso de estos dispositivos requiere el análisis de una gran cantidad de datos y no indican el tipo específico de actividad realizada. Existen también medidas indirectas para evaluar la actividad física, como la frecuencia cardíaca o la capacidad aeróbica del individuo ( $VO_2$ ) [518]. Sin embargo, estas medidas están influenciadas por el nivel de entrenamiento previo del sujeto y requieren del estudio previo de las características de cada individuo [519]. Además, hay que tener en cuenta que factores de tipo emocional, temperatura y humedad, nivel de deshidratación e incluso posturales durante la realización de la actividad física, pueden afectar a estos parámetros [520].

Dadas las limitaciones metodológicas de los estudios en humanos, existen dos estrategias principales para el estudio de los efectos del ejercicio físico utilizando roedores como modelo experimental: ejercicio forzado utilizando una cinta ergométrica y ejercicio voluntario basado en ruedas de actividad [521].

El ejercicio físico forzado implica extraer al animal de la jaula y colocarlo sobre una cinta ergométrica variando la velocidad y el tiempo de exposición según el diseño experimental. Las ventajas de este tipo de ejercicio son la posibilidad de controlar la duración y la intensidad del ejercicio realizado por cada animal, además de la posibilidad de mantener a los animales estabulados en grupos o aislados en cajas individuales. Por el contrario, hay que tener en cuenta que los resultados de este tipo de ejercicio pueden verse influidos por la manipulación realizada sobre el animal al colocarlo en la cinta [522] y por la aparición de respuestas de estrés si se utilizan métodos de motivación con descargas eléctricas [523, 524].

En los modelos de ejercicio físico voluntario, los animales tienen acceso libre a ruedas de actividad que permiten controlar el nivel de ejercicio realizado. Para ello, las ruedas de actividad poseen un imán conectado a un interruptor electrónico colocado en el eje de la rueda, la señal que emite es enviada a un concentrador que transmite los datos a un ordenador por un sistema de transmisión sin cables, y mediante un *software* específico se contabiliza la actividad y tiempo de cada giro. Las ventajas de este tipo de



ejercicio son que no es necesario aplicar descargas eléctricas ni motivación de ningún tipo a los animales y no genera estrés *per se* ya que la actividad depende de la voluntad del propio animal [525]. Sin embargo, este tipo de intervención conlleva algunos inconvenientes ya que se suele observar heterogeneidad en la cantidad de ejercicio realizado por cada animal [526] y además los animales deben mantenerse en jaulas individuales para poder cuantificar correctamente el ejercicio realizado por cada uno. Este aislamiento puede incrementar los niveles de estrés y ansiedad de los roedores [527-529], así como conductas depresivas [530], llegando a afectar las capacidades cognitivas y fisiológicas de los animales [531-533].

## 4.2. EFECTOS DEL EJERCICIO FÍSICO EN MODELOS MURINOS Y EN HUMANOS

### **4.2.1. Sistemas periféricos**

Gran cantidad de estudios epidemiológicos han mostrado una fuerte correlación negativa entre el ejercicio físico aeróbico y el riesgo cardiovascular [534-541] tanto en individuos sanos [542-548] como en individuos de edad avanzada o con enfermedades cardíacas [549-551]. Además, los efectos del ejercicio físico no parecen estar influenciados por la presencia de marcadores genéticos asociados con déficits cardiovasculares [549, 552-554] mostrando el potencial terapéutico de este tipo de práctica sobre la salud cardiovascular. Sorprendentemente, algunos estudios muestran una mayor protección del ejercicio físico en mujeres que en hombres [555, 556]. La actividad física moderada es la que mayor impacto tiene sobre el riesgo de enfermedades coronarias [554] y por ello es la que se recomienda en la mayor parte de guías públicas de salud [512, 557]. La hipertensión es uno de los principales factores de riesgo en la aparición de enfermedades cardiovasculares [558] y se ha demostrado que hábitos de vida saludables como la pérdida de peso y una actividad física habitual contribuyen positivamente a la disminución y control de la presión sanguínea [559-564].

Por otro lado, la incidencia de diabetes mellitus tipo 2 está inversamente relacionada con el ejercicio físico [565-567] y la mortalidad debida a esta enfermedad llega a ser el doble en personas sedentarias independientemente del peso corporal que tengan [568-570]. No sólo se ha visto esta relación a nivel epidemiológico, dos estudios intervencionales mostraron una reducción de hasta el 58% en marcadores de riesgo de

padecer diabetes [571, 572]. Todo ello puede estar relacionado con el hecho de que, tanto el ejercicio aeróbico como el anaeróbico [573, 574], aumentan la captación de glucosa mediante el transportador GLUT-4, presente en las células musculares, de manera independiente a la insulina [575].

El ejercicio aeróbico también da lugar a cambios en los niveles de lípidos y lipoproteínas en circulación [576-578]. El resultado más consistente entre los estudios realizados en humanos es la reducción de los niveles de lipoproteínas de baja densidad (low-density lipoprotein, LDL) [579-583], otro de los principales marcadores de riesgo de fallo cardíaco.

En cuanto al sistema inmune y estado inflamatorio, el ejercicio físico agudo e intenso induce una respuesta inflamatoria transitoria debido a la estimulación muscular tras el esfuerzo realizado. Sin embargo, una actividad regular y moderada reduce los niveles de marcadores inflamatorios como la proteína C-reactiva (CRP) [584-588], comunmente asociada a un elevado riesgo de infarto cardíaco y cerebrovascular [589] y otras citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  y IL-6 [590]. El ejercicio físico también parece tener un efecto inhibitorio sobre factores trombogénicos y estimula el potencial fibrinolítico, lo cual contribuye a reducir el riesgo de trombosis [591-593].

#### **4.2.2 Sistema nervioso central**

Numerosas evidencias indican que el ejercicio físico aeróbico tiene efectos positivos a nivel cognitivo en individuos adultos de más de 55 años [594], produciendo mejoras en atención y memoria [595]. También se ha observado un aumento de materia gris en la zona prefrontal y temporal y de materia blanca en la zona anterior del cuerpo calloso [596-599], ambas áreas importantes para la ejecución de tareas de atención selectiva que son especialmente sensibles al envejecimiento [600-602].

Estudios de resonancia magnética funcional (fMRI) han mostrado un aumento en el volumen hipocampal de individuos sanos de entre 59 y 81 años de edad [603], así como mejoras en memoria espacial [604] en respuesta a la actividad física. Por ejemplo, en un estudio randomizado reciente se observó un aumento de un 2% en el volumen hipocampal de individuos sanos de entre 55 y 80 años de edad tras un entrenamiento aeróbico [605] asociado a un aumento en los niveles del factor neurotrófico BDNF en

suero y a mejoras en funciones de aprendizaje y memoria. En un estudio realizado por Pereira y colaboradores [606] se analizaron los efectos tras 2 semanas de ejercicio físico voluntario en ratón y 12 semanas de entrenamiento aeróbico en humanos. Mediante resonancia magnética (MRI) describieron un aumento en la irrigación sanguínea en el giro dentado hipocampal en ambos modelos experimentales, que en ratón pudieron correlacionar con aumento en procesos de neurogénesis y en humanos con mejoras en aprendizaje y memoria. Los efectos del ejercicio sobre la memoria y el volumen del hipocampo [607, 608] también se han observado en niños de 10 años de edad.

Los modelos animales permiten el estudio de las vías moleculares y los cambios a nivel celular producidos en el cerebro en respuesta al ejercicio físico. El aumento en la proliferación celular y la supervivencia neuronal en giro dentado es uno de los efectos observados más consistentes tras intervenciones de ejercicio físico [609-614] tanto en animales de edad media [611] como de edad avanzada [615]. Incluso animales recién nacidos de madres que han practicado ejercicio físico durante la gestación, muestran mayor supervivencia celular en hipocampo [616, 617]. También se ha descrito el aumento de células progenitoras neuronales en otras regiones como el área paraventricular de los ventrículos laterales [613, 618, 619]. Los efectos del ejercicio sobre la neurogénesis se ha asociado a una mayor vascularización en corteza cerebral [620], estriado [621] e hipocampo [622], y al aumento en los niveles de IGF1 en hipocampo [623] y de IGF1 [610] y VEGF en suero [624], reforzando la idea de que las respuestas centrales y periféricas al ejercicio físico actúan de forma coordinada.

El factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) es una neurotrofina implicada en la excitabilidad neuronal, la plasticidad sináptica y el mantenimiento de funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje [625-628]. El aumento de BDNF es uno de los marcadores más validado a nivel experimental en modelos de ejercicio físico y que tanto en expresión génica como en niveles de proteína de BDNF muestran un aumento en sus niveles en hipocampo tras intervenciones de ejercicio físico [629, 630]. La práctica de ejercicio físico de tan sólo una semana ya provoca mejoras en las funciones cognitivas de ratones jóvenes y de edad avanzada, y esto se ha asociado al aumento en la expresión de los genes *Bdnf*, *sinapsina*, *Mapk* y *Crf1*, implicados en procesos de memoria y plasticidad sináptica [626]. Además, se ha observado que la práctica de ejercicio físico facilita el aumento de

expresión del factor *Bdnf* en intervenciones posteriores y produce una respuesta más eficiente [631].

A nivel psicoemocional, el ejercicio voluntario facilita la asimilación de situaciones nuevas reduciendo los comportamientos relacionados con ansiedad [632-634] y parece ejercer un efecto antidepresivo, descrito tanto en modelos de roedores [635] como en humanos [636-638], el cual se asocia al aumento de BDNF [639] y de VGF [640].

#### **4.2.3 Ejercicio físico, envejecimiento y Alzheimer**

El ejercicio físico produce una serie de beneficios en sistema nervioso central que están implicados en el mantenimiento y mejora cognitiva. Estas observaciones han suscitado interés en el contexto de la prevención y tratamiento de la EA [641-643].

En humanos, diferentes meta-análisis realizados han demostrado que el ejercicio físico tiene un efecto positivo sobre la cognición y que existe una relación entre la actividad física y las mejoras cognitivas tanto en individuos sanos como en pacientes con signos de demencia propios de la EA [594, 644, 645]. Estudios realizados en personas en un estadio temprano de la EA han mostrado un aumento en el volumen del hipocampo [605, 646, 647] y corteza cerebral [596, 600, 648], así como una mejora en las habilidades cognitivas que puede llegar a perdurar hasta 6 meses después de finalizar la intervención de ejercicio [649]. También se ha observado una mejora en la conectividad entre corteza cerebral e hipocampo [650-652] y en la vascularización en hipocampo [606]. Además, se ha estimado que la práctica regular de ejercicio físico podría llegar a reducir el riesgo de padecer la EA hasta en un 45% [653] y que el inicio de una actividad física desde edades tempranas tendría un mayor impacto [654]. Incluso se ha comprobado que la practica de ejercicio puede asociarse con menores niveles de A $\beta$  en humanos [655], especialmente en individuos con predisposición genética a padecer la enfermedad [656].

En modelos animales, se han observado mejoras de memoria y aprendizaje y una disminución en el depósito de placas de A $\beta$  en corteza cerebral e hipocampo tras 5 meses de ejercicio voluntario [657]. También se han observado mejoras en memoria (*fear conditioning test*) y un aumento en la expresión del gen *Lztfl1* (*leucine zipper transcription factor-like protein 1*) asociado a crecimiento de neuritas en el modelo

SAMP8 de envejecimiento y EA tras 4 meses de ejercicio voluntario [658]. Estos ratones también presentan mayores niveles de SIRT1 en hipocampo y corteza cerebral de ratones después de 6 meses de ejercicio voluntario moderado que provocaron una activación de la vía de AMPK y mejoras en la función mitocondrial en hipocampo [659]. Por último, en este mismo modelo se observaron mejoras en la actividad locomotora y la función sensorimotora, así como mejoras en factores implicados en revascularización (VEGF $\alpha$ ), función mitocondrial (*Sirt1-Ampk-Pgc1 $\alpha$* ) y metabolismo energético (*Glut4* y *Cd36*) en músculo esquelético [660].

#### 4.3. EJERCICIO Y EPIGENÉTICA

Algunas de las mejoras observadas en metabolismo, inflamación y sistema nervioso en respuesta a la práctica de ejercicio físico se han relacionado recientemente con cambios a nivel epigenético implicados en la metilación del ADN, metilación y acetilación de histonas y la expresión de diferentes microARNs.

A nivel global, se ha descrito un descenso en los niveles de metilación del ADN en regiones promotoras de genes relacionados con vías metabólicas en respuesta al ejercicio físico en músculo esquelético [661, 662], como por ejemplo el receptor gamma activador de peroxisomas (PPAR- $\gamma$ ), el coactivador 1 alfa (PGC-1 $\alpha$ ) o el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) [661]. También se ha observado que durante la práctica de ejercicio se produce un cambio en la localización intracelular de las desacetilasas de histonas HDAC4 y HDAC5, posiblemente mediado por la fosforilación mediante AMPK. Esto produciría una disociación del factor MEF2, permitiendo su unión a histonas acetiltransferasas y el posterior aumento de expresión de *Glut4* observado en músculo esquelético en respuesta al ejercicio [663, 664]. En cuanto a la expresión de miARNs en músculo esquelético, se ha observado una reducción de varios miARNs implicados en metabolismo y procesos de fosforilación oxidativa [665].

Por otro lado, el ejercicio moderado se ha asociado con un retraso en la hipometilación durante el proceso de envejecimiento en genes implicados en respuesta inflamatoria como la proteína asociada a apoptosis *speck-like* (ASC) [666], implicada en la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18. También se han descrito cambios en la expresión de 34 microARNs en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) implicados en la regulación de vías inflamatorias [667].

A nivel de sistema nervioso central, se han descrito cambios epigenéticos asociados a la expresión de BDNF. Tras una intervención de una semana de ejercicio se detectó una demetilación la región promotora del gen de *Bdnf* y una correlación entre el aumento de expresión de dicho factor y los niveles de acetilación en histona H3 en hipocampo [668]. El ejercicio también produjo una disminución en los niveles de HDAC5, enzima implicada en la modulación del gen de *Bdnf* en un modelo murino de depresión [669]. La acetilación de histonas es uno de los mecanismos principales en sistema nervioso central para el establecimiento de la memoria y plasticidad sináptica [376, 670, 671] y se ha asociado a declive cognitivo y neurodegeneración [672-674] y la EA [675]. La proporción HAT/HDAC en hipocampo se ha visto alterada en respuesta al ejercicio físico, hacia un estado de hiperacetilación [676], lo cual se relaciona con un efecto neuroprotector en memoria y cognición [677]. De hecho, en ratas se observaron mejoras en el rendimiento en tareas que producen cierto estrés (como la natación forzada o la exposición a un entorno nuevo) tras una intervención de 4 semanas de ejercicio físico voluntario, que correlacionaron con la fosfoacetilación en histona H3 y la inducción del gen *c-Fos* en neuronas de la región hipocampal del giro dentado [678].

Por último, mientras que el envejecimiento reduce los niveles de SIRT1 [679, 680], se ha descrito un aumento de los mismos en corazón y tejido adiposo de ratas de edad avanzada tras 8 semanas de ejercicio forzado [681] y en músculo esquelético tanto en ratas jóvenes como de edad avanzada después de 6 semanas de ejercicio forzado [682]. En humanos, también se han detectado mayores niveles de SIRT1 en músculo esquelético [683, 684] y sangre periférica [685] tras la realización de actividades físicas de elevada intensidad.

Las evidencias obtenidas hasta el momento ponen de manifiesto el potencial terapéutico del ejercicio físico como estrategia de prevención y tratamiento de patologías asociadas al envejecimiento. Los efectos beneficiosos del ejercicio sobre los diferentes sistemas periféricos y el sistema nervioso central lo convierten en un modelo adecuado para comprender mejor los efectos protectores del estilo de vida activo sobre el proceso global de envejecimiento y la neurodegeneración.

## **OBJETIVOS**

---





El actual envejecimiento de la población y el consecuente aumento de enfermedades crónicas asociadas al mismo, establecen como prioritario el estudio de los mecanismos presentes durante este proceso, así como la búsqueda de acciones terapéuticas que favorezcan un envejecimiento saludable, como el ejercicio físico. La epigenética, por su implicación funcional y su modulación ambiental podría ser el mediador de los efectos beneficiosos de la práctica de ejercicio físico.

En este contexto, el **objetivo principal** de este proyecto fue identificar marcadores de envejecimiento en el modelo murino de senescencia acelerada SAMP8 y su control SAMR1, y su posible regulación mediante la práctica de ejercicio físico.

Dentro de este eje temático, los **objetivos específicos** planteados fueron:

1. Estudiar los mecanismos epigenéticos asociados a neuroinflamación y senescencia.
2. Analizar las alteraciones transcripcionales en hipocampo sensibles a ejercicio físico moderado en un contexto de envejecimiento y neurodegeneración.
3. Identificar factores de regulación epigenética asociados a envejecimiento y su modulación por la práctica de ejercicio físico moderado.



## **RESULTADOS**

---



Los resultados de esta tesis se agrupan en 3 capítulos. Todos ellos se corresponden a artículos ya publicados. Cada capítulo contiene el artículo original precedido de un resumen de los resultados y conclusiones principales. Las figuras, tablas y referencias se encuentran en el artículo original correspondiente adjuntado al final de cada capítulo.



## **I**

**Disminución de la expresión de Rcor2 en un modelo de senescencia acelerada (ratones SAMP8) y su posible función como regulador de la inflamación asociada al envejecimiento**





---

Los resultados presentados en este capítulo se incluyen en el siguiente artículo publicado:

**Rcor2 underexpression in senescent mice: a target for inflammaging?**

*Journal of Neuroinflammation*, 11:126 (2014)

**María J Alvarez-López**, Patricia Molina-Martínez, Marco Castro-Freire, Marta Cosín-Tomás, Rosa Cristòfol, Marcelina Párrizas, Rosa María Escorihuela, Merce Pallàs, Coral Sanfeliu y Perla Kaliman.

Contribución: Purificación de ARN y estudios de expresión génica por Real Time PCR, ensayos con células C6 y supervisión de los resultados de transfección, así como análisis estadístico de todos los resultados presentados, participación en la interpretación de resultados y en la elaboración del manuscrito.

## RESUMEN

La presencia de procesos inflamatorios a nivel sistémico durante el envejecimiento es uno de los factores que contribuyen al desarrollo de patologías crónicas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a la presencia de neuroinflamación crónica están poco estudiados. En este contexto, trabajos previos han descrito la implicación de reguladores epigenéticos en inflamación y longevidad, entre los cuales se incluye el correpressor de REST, Rcor. La isoforma *Rcor1* participa en la modulación de la neuroinflamación en respuesta a la inducción por LPS (*Lipopolysaccharid*) en microglia y astrocitos [686], por su parte *Rcor2* ha mostrado tener un papel relevante en la expresión de genes inflamatorios como *Il-6*, *Ccl2* o *Mip1a* entre otros, en preadipocitos [687].

En este trabajo analizamos el impacto del factor *Rcor*, *in vivo* e *in vitro*, en procesos neuroinflamatorios asociados a envejecimiento. Los datos que se presentan muestran una interacción entre la reducción de *Rcor2* y la presencia de mayores niveles de inflamación, sugiriendo que *Rcor2* podría ser un importante regulador de estados proinflamatorios crónicos característicos del envejecimiento o el cada vez más utilizado término, *inflammaging*.

## PRINCIPALES RESULTADOS

### **4.3.1. 1.1. El modelo murino de envejecimiento acelerado SAMP8 presenta niveles exacerbados de IL-6 en suero en respuesta a LPS**

Tres horas después de la inyección intraperitoneal del lipopolisacárido LPS se analizó la respuesta inflamatoria en ratones SAMR1 y SAMP8 de 12 meses de edad. Se encontraron niveles elevados de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en suero de ambas cepas en respuesta al estímulo inflamatorio por LPS. Sin embargo, sólo se observaron efectos de cepa y tras la estimulación con LPS para IL-6, así como tendencia estadística casi significativa para la interacción entre ambos factores ( $p=0.068$ ). Además, IL-6 presentó mayores niveles a nivel basal en los ratones SAMP8 (Figura 1C del Artículo 1). Estos datos sugieren que los niveles en plasma de IL-6 pueden ser un biomarcador inflamatorio asociado al fenotipo de senescencia acelerada presente en los ratones SAMP8.

#### **4.3.2. 1.2. Los ratones SAMP8 presentan niveles reducidos de expresión de *Rcor2* en linfocitos, corteza cerebral, hipocampo y astrocitos**

Con el objetivo de describir un posible mecanismo responsable del fenotipo inflamatorio observado en los ratones SAMP8, se estudió la expresión génica de *Rcor1* y *Rcor2* en estos animales y en sus controles SAMR1. Se hallaron niveles mínimos de expresión génica de la isoforma del correpresor de REST, *Rcor2*, en linfocitos de los ratones SAMP8 desde edades tempranas (Fig 2B del Artículo 1), en astrocitos provenientes de animales de 2 días de edad, y en hipocampo y corteza cerebral de animales adultos (Fig 3 del Artículo 1). Además, los niveles reducidos de *Rcor2* en astrocitos SAMP8 estaban acompañados de un aumento en los niveles basales de *Il-6* (Fig 3G del Artículo 1). Asimismo, confirmamos una correlación inversa entre la expresión génica de *Rcor2* y de *Il-6* tras la administración de LPS en hipocampo de ratones SAMR1 (Fig 4 del Artículo 1) y en la línea celular C6 (Fig 5 del Artículo 1).

#### **4.3.3. 1.3. El silenciamiento de *Rcor2* en astrocitos provoca un aumento de expresión de *Il-6***

Para determinar la relación causal entre la disminución de RCOR2 y el aumento de IL6, se silenció la expresión de *Rcor2* en astrocitos de SAMR1 y SAMP8. En primer lugar se observó que el silenciamiento de *Rcor2* produjo un incremento en la expresión de *Il-6* de manera basal, reforzando la hipótesis de que RCOR2 actúa reprimiendo procesos inflamatorios (Fig 6 del Artículo 1). En segundo lugar, la activación de estas células mediante LPS e interferón gamma produjo una reducción de la expresión de *Rcor2* y un aumento de *Il-6*; siendo el aumento de *Il-6* en respuesta a LPS mayor en las células en las que se silenció *Rcor2* (Fig 7 del Artículo 1). Todo ello indica que tanto el estímulo inflamatorio por LPS como la reducción de *Rcor2* son factores que incrementan la expresión de la citoquina proinflamatoria *Il-6*.

#### **4.3.4. 1.4. Alteración en factores de regulación de metilación de histonas en el modelo SAMP8 (resultados no publicados relacionados con el artículo 1)**

Recientemente se ha descrito la implicación de la metilación en histona H3 y de los genes que la regulan en la longevidad de *C. elegans* y *D.melanogaster* [448, 449, 688].

Como se ha descrito en el Artículo 1 los ratones SAMP8 de 9 meses de edad muestran un aumento en los niveles de trimetilación en histona H3 lisina 4 en linfocitos, hipocampo y corteza cerebral respecto a sus controles SAMR1 (Figura suplementaria 2 del artículo 1).

Estos datos en la cepa de envejecimiento acelerado SAMP8 concuerdan con la observación de que mayores niveles de trimetilación de histona H3 reducen la longevidad en otras especies [448, 449, 688]. Para estudiar en más detalle la implicación de dicho mecanismo en el fenotipo senescente SAMP8, hemos cuantificado la expresión génica de algunos de los factores reguladores del estado de metilación de histonas en linfocitos, hipocampo y corteza cerebral de ratones de 9 meses de edad de la cepa SAMP8 y su control SAMR1 (ver Anexo 1). Se escogieron factores pertenecientes al complejo represor de REST y algunas de las demetilinas y metiltransferasas reguladoras del estado de metilación en histona H3 (Tabla 1).

Gen	Función	Implicación en procesos y patologías asociadas a envejecimiento	Referencia
Rest	Reconoce los elementos RE1 del DNA y se une a ellos. Forma complejo con mSin3 y Rcor, silenciando la expresión génica.	Aumentan sus niveles durante el envejecimiento y disminuyen en pacientes de Alzheimer en corteza prefrontal e hipocampo.	[689, 690]
Lsd1	Demetilasa de H3K4me2/1 cuando se une a Rcor y FAD. Demetilasa de H3K9me3/2/1 cuando se une al receptor de andrógenos (AR).	Implicado en procesos de DDR, procesamiento de los extremos teloméricos, expresión de citoquinas proinflamatorias y diferentes tipos de cáncer.	[351, 691-694]
Rcor1	Co-represor, permite la unión de otros co-factores del complejo de Rest y Lsd1.	En <i>C.elegans</i> , su homólogo spr-1 (junto a los homólogos de Rest y Lsd1) se ha identificado como supresor de presenilinas. Junto a Nurr1, tiene efectos antiinflamatorios en astrocitos y microglia.	[686, 695, 696]
Rcor2	Isoforma 2 del co-represor Rcor, se une a Lsd1.	En adipocitos regula la expresión de citoquinas proinflamatorias.	[687]
Jarid1a	Demetilasa de H3K4me3/2.	Mediador de la inducción de senescencia celular por la vía del retinoblastoma.	[697]
Jarid1b	Demetilasa de H3K4me3/2/1.	Mutaciones en su homólogo rbr-2 en <i>C.elegans</i> reducen su longevidad. Mediador de la inducción de senescencia celular por la vía del retinoblastoma.	[448, 449, 697]

Gen	Función	Implicación en procesos y patologías asociadas a envejecimiento	Referencia
Jmjd1a	Demetilasa de H3K9me2/1.	Implicado en metástasis de neuroblastoma y otros tipos de cáncer.	[698, 699]
Jmjd1b	Demetilasa de H3K9me2/1.	Implicado en leucemia linfoblástica.	[700]
Jmjd2a	Demetilasa de H3K9me3 y H3K36me3.	Implicado en varios tipos de cáncer.	[701]
Jmjd2c	Demetilasa de H3K9me3 y H3K36me3.	Implicado en varios tipos de cáncer.	[701]
G9a	Metiltransferasa de H3K9me2/1 y H3K27me1. Cofactor del complejo de Rest.	Función en memoria y aprendizaje. Implicado en varios tipos de cáncer. Modulador de la expresión de NEP (degrada A $\beta$ en cerebro).	[702-705]
Setd1a	Metiltransferasa de H3K4me3/2/1.	Mutaciones en su homólogo set-2 en <i>C.elegans</i> extienden su longevidad. Sobreexpresado en cáncer de colon.	[448, 449, 706]
Setdb1	Metiltransferasa de H3K9me3.	Implicado en cáncer.	[707, 708]
Set7	Metiltransferasa de H3K4me1	Aumenta su expresión en corteza cerebral durante el envejecimiento en primates. Modula la expresión de FoxO3, mediador de longevidad a través de la vía de la insulina.	[458, 709]
Ezh1	Metiltransferasa de H3K27me3/2/1 como parte del complejo polycomb PRC2.	Necesario para el mantenimiento de células madre hematopoyéticas. Su silenciamiento suprime la expresión de citoquinas pro-inflamatorias.	[710-712]

Tabla 1. Factores estudiados reguladores del estado de metilación de histonas.

Nuestro análisis en el modelo SAMP8 ha mostrado alteraciones en varios factores implicados en el mantenimiento de marcas de metilación de histonas. Entre ellas, la metiltransferasa de histona H3 lisina 9, *G9a* presentó reducida su expresión (Fig 2A y 3G del Anexo 1), así como las demetilinas de histona H3 lisina 4, *Lsd1* y *Jarid1a* en linfocitos e hipocampo de SAMP8 respecto de su control SAMR1 (Fig 1 y 3 del Anexo 1). Por último, se detectaron alteradas únicamente en hipocampo de SAMP8 la demetilasa *Jarid1b*, que presentó disminuida su expresión respecto al control (Fig 3F del Anexo 1), y la metiltransferasa *Set7*, que mostró niveles más elevados de expresión en SAMP8 que en su control SAMR1 (Fig 3H del Anexo 1).

## CONCLUSIONES

Existe escasa información sobre los mecanismos moleculares desencadenantes de procesos de inflamación crónica, los cuales afectan a la funcionalidad de la mayoría de

órganos y tejidos, y que dan lugar a patologías asociadas a envejecimiento y neurodegeneración [713, 714].

Nuestro estudio muestra una reducción de *Rcor2* en diversos tejidos en la cepa SAMP8, alteración presente desde los primeros días de vida en linfocitos y astrocitos. RCOR forma parte del complejo de REST, cuyo papel en la preservación de cognición, el silenciamiento de genes proapoptóticos y la promoción de factores de transcripción de resistencia a estrés oxidativo se ha identificado recientemente en modelos animales y humanos de edad avanzada [690]. Estos datos sugieren que la reducción de *Rcor2* en SAMP8 podría estar ligada a su fenotipo senescente. Además, hemos demostrado que la reducción de *Rcor2* correlaciona con el aumento de la citoquina proinflamatoria *Il6* en astrocitos. Por ello, *Rcor2* debería ser considerado como una posible diana para la prevención y/o tratamiento de la inflamación crónica asociada a envejecimiento.

Paralelamente, y teniendo en cuenta el resultado mostrado en el artículo 1, donde se detectaron mayores niveles de trimetilación en histona H3 lisina 4, y que esta marca epigenética parece tener un papel importante en longevidad y envejecimiento [448, 449]; estamos estudiando las posibles alteraciones presentes en factores de regulación del estado de metilación de histonas. Hemos detectado una disminución de expresión en linfocitos e hipocampo en ratones SAMP8 de la metiltransferasa *G9a*. Esta metiltransferasa está implicada en silenciamiento génico y actúa conjuntamente en el complejo correpressor de REST con la demetilasa LSD1, la cual también hemos detectado reducida en linfocitos e hipocampo de SAMP8. Estos datos podrían indicar la existencia de una alteración en la formación y actividad de este complejo lo que daría como resultado la desregulación en funciones tan importantes como la diferenciación neuronal y plasticidad [715-718]. Además se ha identificado a *G9a* como uno de los factores de regulación de la enzima neprilisina [705], responsable de la eliminación de A $\beta$  en cerebro y una de las principales dianas terapéuticas estudiadas para la EA [719].

Asimismo, encontramos menores niveles de expresión de las demetilasas *Jarid1a* y *Jarid1b*, las cuales son homólogas a *rbr-2*. Greer y sus colaboradores mostraron en trabajos previos [448] que el silenciamiento de expresión de *rbr-2* va acompañado de un aumento en los niveles de trimetilación en H3 lisina 4 y de una reducción significativa

---

de la esperanza de vida en *C.elegans*, demostrando ser un factor crucial en la regulación de la longevidad. En conjunto, el aumento detectado en los ratones SAMP8 en la trimetilación de histona H3 y la reducción de expresión de la metiltransferasa *G9a* y de las demetilasas *Jarid1a* y *Jarid1b* nos sugieren la importante implicación del estado de metilación de histona H3 en la reducida longevidad y déficits cognitivos que muestran los ratones SAMP8. (\*Esta parte del trabajo se está completando actualmente para su futura publicación).

RESEARCH

Open Access

# Rcor2 underexpression in senescent mice: a target for inflammaging?

María J Alvarez-López<sup>1,2</sup>, Patricia Molina-Martínez<sup>1</sup>, Marco Castro-Freire<sup>3</sup>, Marta Cosín-Tomás<sup>1,2</sup>, Rosa Cristòfol<sup>1</sup>, Marcelina Párrizas<sup>3</sup>, Rosa María Escorihuela<sup>4</sup>, Merce Pallàs<sup>2</sup>, Coral Sanfeliu<sup>1,3</sup> and Perla Kaliman<sup>3\*</sup>

## Abstract

**Background:** Aging is characterized by a low-grade systemic inflammation that contributes to the pathogenesis of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD). However, little knowledge is currently available on the molecular processes leading to chronic neuroinflammation. In this context, recent studies have described the role of chromatin regulators in inflammation and longevity including the REST corepressor (Rcor)-2 factor, which seems to be involved in an inflammatory suppressive program.

**Methods:** To assess the impact of *Rcor2* in age-related inflammation, gene expression levels were quantified in different tissues and ages of the spontaneous senescence-accelerated P8 mouse (P8) using the SAMR1 mouse (R1) as a control. Specific siRNA transfection in P8 and R1 astrocyte cultures was used to determine *Rcor2* involvement in the modulation of neuroinflammation. The effect of lipopolysaccharide (LPS) treatment on *Rcor2* levels and neuroinflammation was analyzed both *in vivo* and *in vitro*.

**Results:** P8 mice presented a dramatic decrease in *Rcor2* gene expression compared with R1 controls in splenocytes, an alteration also observed in the brain cortex, hippocampus and primary astrocytes of these mice. *Rcor2* reduction in astrocytes was accompanied by an increased basal expression of the interleukin (*Il*)-6 gene. Strikingly, intraperitoneal LPS injection in R1 mice downregulated *Rcor2* in the hippocampus, with a concomitant upregulation of tumor necrosis factor (*Tnf-α*), *Il1-β* and *Il6* genes. A negative correlation between *Rcor2* and *Il6* gene expression was also verified in LPS-treated C6 glioma cells. Knock down of *Rcor2* by siRNA transfection (siRcor2) in R1 astrocytes upregulated *Il6* gene expression while siRcor2 further increased *Il6* expression in P8 astrocytes. Moreover, LPS activation provoked a further downregulation of *Rcor2* and an amplified induction of *Il6* in siRcor2-transfected astrocytes.

**Conclusions:** Data presented here show interplay between *Rcor2* downregulation and increased inflammation and suggest that *Rcor2* may be a key regulator of inflammaging.

**Keywords:** RCOR2, Aging, SAMP8, Inflammation, IL6

## Background

The process of aging is associated with a low-grade systemic inflammation defined as inflammaging [1], which is characterized by an increase of acute-phase circulating proteins and proinflammatory factors such as interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ). This condition has been connected with the onset and evolution of age-related diseases, including type 2 diabetes mellitus,

cardiovascular disease, cancer and neurodegeneration [2-4]. Indeed, the aging brain exhibits a progressive increase in inflammatory processes [5], which can be neurotoxic, altering important central functions [6] and contributing to the pathogenesis of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) [7]. The microglia plays a critical role in neuroinflammation as it represents the main type of immune cells in the brain [8]. The activation of microglia in aging models leads to the secretion of proinflammatory cytokines, which contribute to synaptic and neuronal damage as well as cognitive impairment [9,10].

\* Correspondence: pkaliman@ub.edu

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rosellón 149, E-08036 Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Recent studies using diverse experimental models have described the role of chromatin regulators in inflammation. Among them, REST corepressor (RCOR) factor seems to be involved in an inflammatory suppressive program. In mammals, two *Rcor* gene isoforms (*Rcor1/CoREST* and *Rcor2*) have so far been studied. RCOR is found in a complex with the histone demethylase lysine-specific demethylase 1A (KDM1A, previously known as LSD1), which exhibits nucleosome demethylase activity [11-13], and with the RE1-silencing transcription factor (REST), which has been recently associated with cognitive preservation and longevity [14]. RCOR1/CoREST is involved in the modulation of the expression of neuronal genes [15] while RCOR2 plays a role in embryonic stem cells (ESCs) maintenance and regulation [13]. We have recently shown that knock down of LSD1/KDM1A or its partner, RCOR2, in pre-adipocytes results in derepression of an inflammatory program with a significant increase in the expression of inflammatory genes such as *Il6*, chemokine ligand 2 (*Ccl2*), macrophage proinflammatory protein 1 $\alpha$  (*Mip1a*, also known as *Ccl3*), chemokine (C-X-C motif) ligands 5 and 10 (*Cxcl5* and *Cxcl10*), and macrophage activation 2-like (*Mpa2l*) [16]. Consistent with these findings, RCOR was also found to mediate the turnover of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and to restore LPS-activated genes to a basal expression in microglia and astrocytes [17].

Here, we examined the link between *Rcor2* and inflammation in the SAMP8 mouse model of accelerated aging and neurodegeneration. The SAMP8 strain (P8) was selected from AKR/J mice and is a well-characterized model for studying pathological brain aging [18-21]. The SAMR1 mice (R1), with a similar genetic background and normal aging characteristics, represent a suitable and widely used control model [22]. P8 mice presented signs of accelerated aging such as loss of activity, skin coarseness, alopecia, lack of hair glossiness, increased lordokyphosis, periophthalmic lesions, and systemic senile amyloidosis [23]. These mice also displayed cognitive and behavioral alterations that were accompanied by molecular features typical of Alzheimer's disease (AD), such as overproduction of amyloid-beta protein, increased tau phosphorylation, cholinergic deficits in the forebrain and increased oxidative stress [18,19,24-28]. Biomarkers of inflammation such as C-reactive protein and serum amyloid P are elevated in P8 mice [29].

Here we found that P8 mice present a spontaneous decrease in *Rcor2* gene expression, which is, at least in part, responsible for the inflamed phenotype in astrocytes. Our data show that *Rcor2* downregulation and neuroinflammation are mutually influenced processes.

## Materials and methods

### Animal care

All experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the Autonomous University of Barcelona

(Comissió Ètica d'Experimentació Animal i Humana, CEEAH, UAB), following the 'Principles of laboratory animal care', and were performed in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC). SAMP8 and SAMR1 female mice were provided by the Parc Científic, (University of Barcelona, Spain) and were maintained under standard conditions (temperature  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , humidity 50 to 60%, 12:12-h light-dark cycle, lights on at 7:00 a.m.), with food (A04, Harlan, Spain) and tap water available *ad libitum* throughout the study. Body weight (g) was measured weekly. For tissue harvesting, mice were sacrificed by cervical dislocation. The hippocampi and cerebral cortices were immediately frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further analysis. The spleen was extracted and sliced, and splenocytes were isolated through a 70- $\mu\text{m}$  cell strainer (BD Biosciences, San Jose, CA) in PBS 1X and collected following centrifugation at 1600 rpm for 5 minutes. Erythrocytes were further lysed using BD Pharm Lyse™ solution (BD Biosciences, San Jose, CA) at  $37^\circ\text{C}$  for 2 min. Cells were recovered by centrifugation and pellets were aliquoted and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for further analysis.

### Lipopolysaccharide treatment and cytokine determination

SAMP8 and SAMR1 mice (males, 12-months old,  $n = 3/\text{group}$ ) received an intraperitoneal (IP) injection of lipopolysaccharide (LPS) (2.9 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA), or an equal volume of saline. Three hours after treatment, blood samples were collected and mice were sacrificed by cervical dislocation. Tissues were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until processed.

Detection of TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  and IL6 in plasma was performed by enzyme-linked immunosorbent assay, in accordance with the protocol provided by the manufacturer (eBioscience, San Diego, CA; R&D Systems, Minneapolis, MN and Diaclone, Besançon, France respectively).

### Cell culture and transfection

Primary cultures of astrocytes were established from cerebral cortical tissue of 2-day-old SAMR1 and SAMP8, as previously described [30]. Cortices were promptly dissected free of the meninges, diced into small cubes, and dissociated by incubation for 25 min with a 0.25% trypsin/1 mM EDTA solution (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA). After a further mechanical dissociation, cells were resuspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 2.5 mM glutamine, 100 g/mL gentamycin, and 20% FBS (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were seeded at  $5 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> in T75 flasks and incubated at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> - 95% air. The culture medium was changed twice a week. The concentration of FBS was changed to 15% and 10% after 1 and 2 weeks of culture, respectively. After 3 weeks, the

flasks were shaken in an orbital shaker at 200 rpm for 4 h to dislodge microglia and, subsequently, the attached astrocyte monolayer was collected. This purified fraction contained more than 90 to 95% of astrocytes, with a minor fraction of contaminating microglia.

Astrocytes were trypsinized 1 h before transfection, distributed into 48-well plates ( $1 \times 10^5$  cells/well) and subsequently transfected with 60 nM of double-stranded siRNAs using Metafectene Pro (Biont, Martinsried, Germany) at a 1:1 ratio with the siRNA. The sequences of the siRNAs used were: 5'-GGUCUUGACUCACAGCU CAtt-3' (Sense strand) and 5'-UGAGCUGUGAGUCAAGACcTc-3' (Antisense strand) for siRCOR2; and Silencer™ negative control siRNA #1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) for siC. RNA was extracted 48 h after transfection.

Rat C6 glioma cells (purchased from the European Collection of Cell Cultures, ECACC) were cultured as monolayer and grown in F12/DMEM medium (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA), 1% non essential a/a's (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA), 1/500 gentamicin (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) and maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified environment.

For each treatment, C6 cells were seeded in a six-well plate and cultured in F12/DMEM without serum for 12 h prior to stimulation with LPS. Cells were incubated with LPS (1 µg/ml) for different time periods ranging from 30 min to 6 h.

#### Total RNA extraction

Total RNA was extracted from frozen tissues through mirVana™ RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in accordance with the manufacturer's instructions.

RNA extraction from astrocytes and C6 cultured cells was performed using TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) in accordance with the manufacturer's protocol.

The yield, purity, and quality of RNA were determined spectrophotometrically (Nano-drop Technologies, Wilmington, DE) and using the Bioanalyzer 2100 capillary electrophoresis (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

RNA samples with a 260/280 ratio and an RIN higher than 1.9 and 7.5, respectively, were selected.

#### Real-time quantitative polymerase chain reaction

Random-primed cDNA synthesis was performed at 37°C starting with 0.3 µg of RNA, using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gene expression was measured in an ABI Prism 7900HT Real Time PCR system using TaqMan FAM labeled specific probes (Applied Biosystems, Foster City, CA [see

Additional file 1]). Results were normalized to the house-keeping TATA-binding protein (*Tbp*) gene.

#### Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 19.0, www.ibm.com/software/es/analytics/spss/). An analysis of variance (ANOVA) was conducted to assess the effects of strain and specific conditions. Comparisons between groups were performed by the two-tailed Student's t-test for independent samples or the Mann-Whitney U-test as indicated.

Partial correlation (controlling for time of exposure to LPS) was used to examine the relationship between *Il-6* and *Rcor2* expression in the C6 glial cell line.

All values were expressed as mean ± standard error of the mean.  $P < 0.05$  was considered significant. Statistical outliers ( $\geq$ two standard deviations from the mean) were removed from analyses.

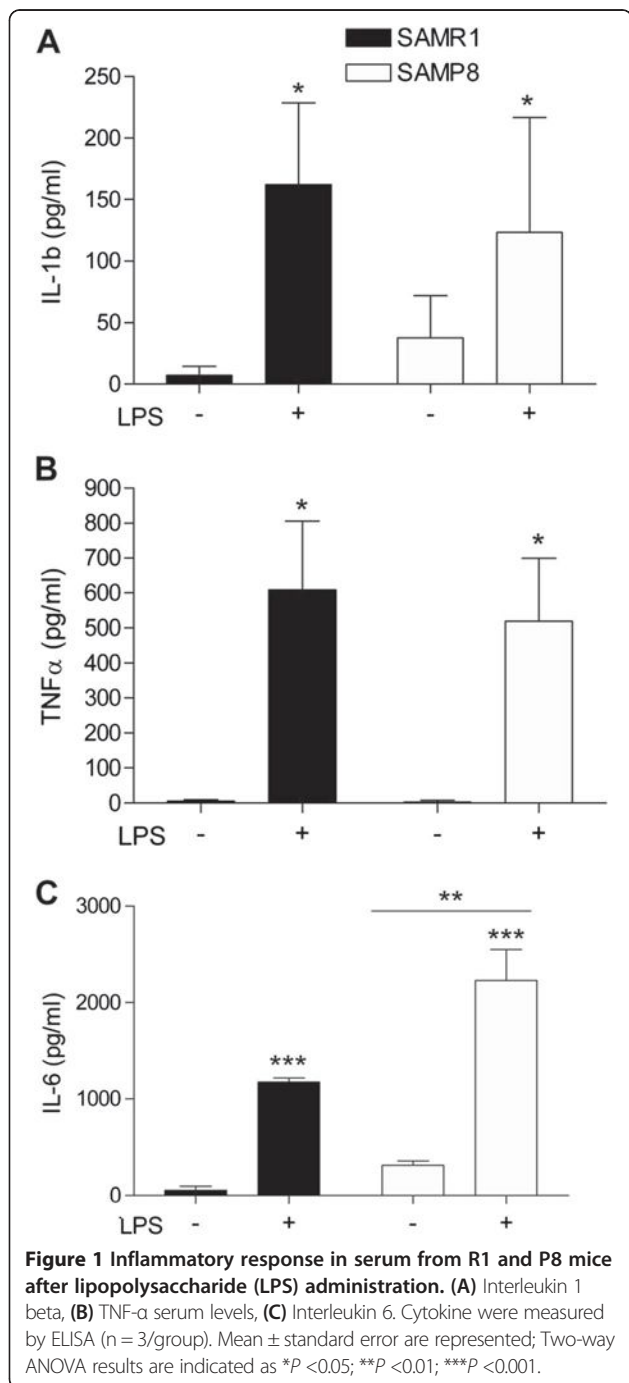
## Results and discussion

### Increased levels of IL6 in serum of P8 mice after intraperitoneal lipopolysaccharide administration

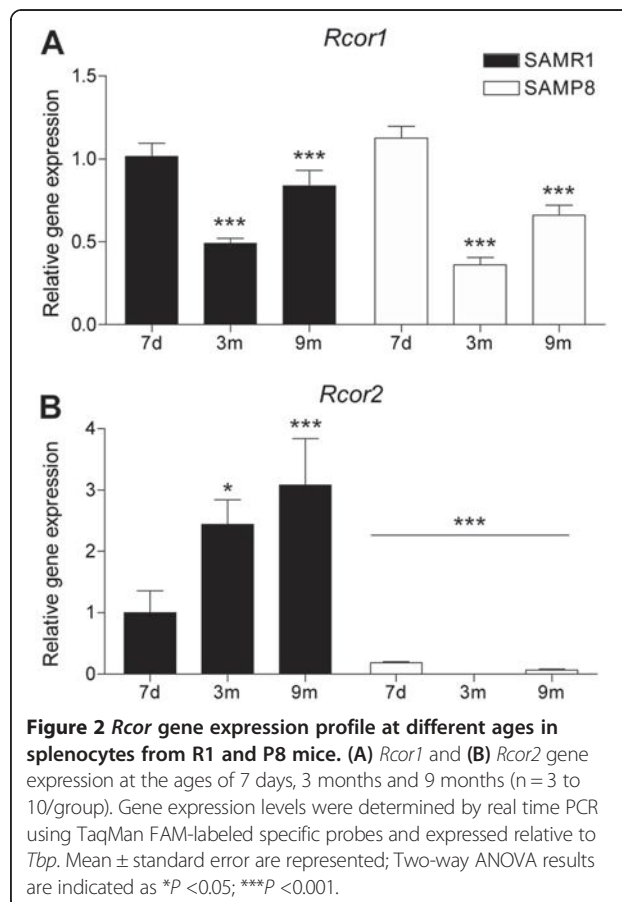
P8 senescent mice exhibited signs of systemic inflammation affecting the liver, pancreas, cochlea, bones, testes and plasma levels of several cytokines and proinflammatory factors [29,31-37]. In addition to their peripheral inflamed phenotype, a proinflammatory brain environment may be involved in the neurodegenerative traits and/or cognitive deficiency in P8 mice [38]. The inflammatory response was analyzed three hours after LPS intraperitoneal injection in 12 month-old P8 mice and age-matched R1 controls. A pronounced increase was found in IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL6 serum levels both in P8 and R1 mice in response to LPS (IL1  $\beta$ :  $F(1,7) = 0.962$ ,  $P < 0.05$ ; TNF $\alpha$ :  $H(3) = 8.389$ ,  $P < 0.05$ ; IL6:  $F(1,7) = 67.362$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 1A and B). Neither strain effect nor interaction between strain and LPS treatment was observed for IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  cytokines. In contrast, we found both strain and LPS effects for IL6 ( $F(1,7) = 12.706$ ,  $P < 0.01$ ;  $F(1,7) = 67.362$ ,  $P < 0.001$ ) as well as a strong tendency for interaction between strain and treatment ( $P = 0.068$ ). Moreover, IL6 showed increased basal levels in P8 mice ( $t(3) = -4.139$ ;  $P < 0.05$ ) (Figure 1C). These data suggest that plasma IL6 could be an inflammatory biomarker of P8 inflamed phenotype.

### Decreased *Rcor2* expression in P8 splenocytes, cortex, hippocampus and astrocytes

We explored the expression of *Rcor1* and *Rcor2* in P8 mice with the aim of elucidating a possible mechanism for their inflamed phenotype and increased response to LPS treatment. We analyzed the *Rcor* gene expression pattern in splenocytes from P8 and R1 mice at three different ages: 7 days, 3 months and 9 months. Both strains



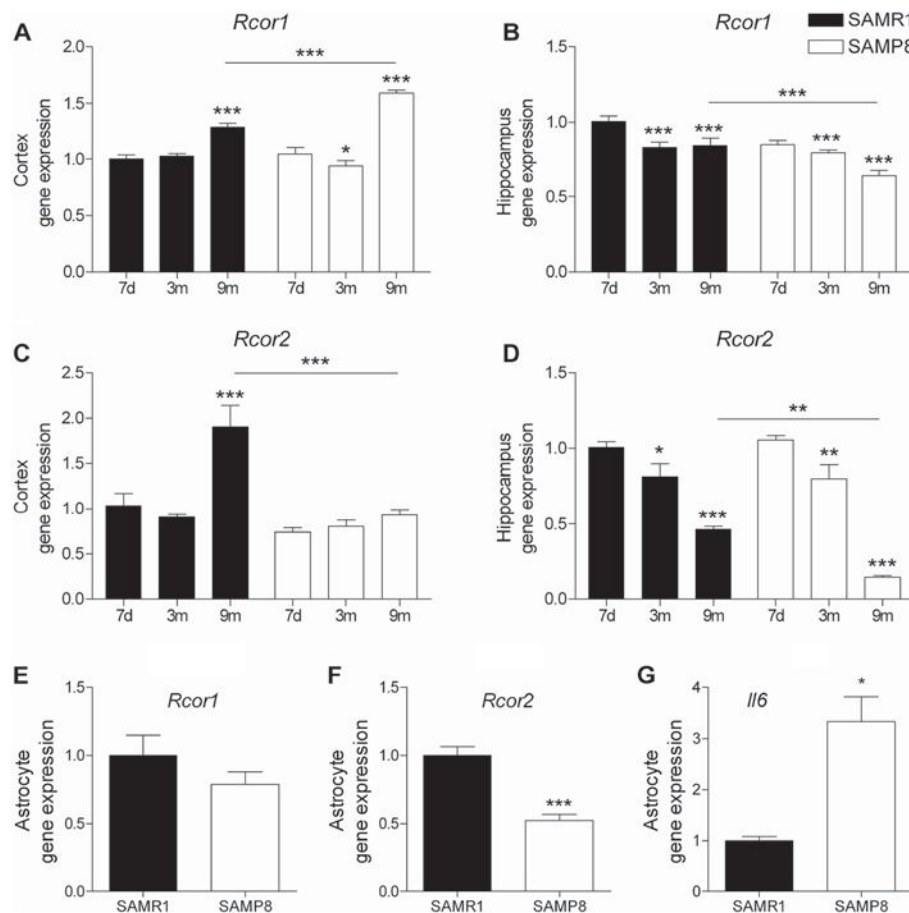
presented similar age-dependent gene expression patterns for *Rcor1* with higher levels at 7 days and 9 months compared with 3 months ( $F(2,22) = 32.306$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 2A). In contrast, R1 mice showed an age-dependent increase in *Rcor2* gene expression which was not observed in P8 mice (interaction between strain and age:  $F(2,29) = 4.279$ ,  $P < 0.05$ ) (Figure 2B). Intriguingly, P8 mice exhibited low expression levels of *Rcor2* from the first week of age and throughout the adult life. These data



indicate that *Rcor2* underexpression in splenocytes precedes most of the accelerated-aging characteristics of this model. Indeed, we found a marked effect for strain and age in *Rcor2* gene expression ( $F(1,29) = 31.620$ ,  $P < 0.001$ ;  $F(2,29) = 3.363$ ,  $P < 0.001$ ; respectively).

Chronic inflammation is associated with early development and acceleration of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease [39,40]. Therefore, we analyzed the expression of *Rcor1* and *Rcor2* in P8 cortices and hippocampi. *Rcor1* presented age effect in both cortex and hippocampus tissues ( $F(2,27) = 49.140$ ,  $P < 0.001$ ;  $F(2,32) = 12.597$ ,  $P < 0.001$ ; respectively) with a similar age-dependent expression pattern in both strains (Figure 3A and B). However, 9-month-old P8 mice, unlike R1 mice, presented slight but significant alterations in *Rcor1* levels in the cortex and in the hippocampus. On the other hand, *Rcor2* was expressed similarly in R1 and P8 brain cortices and hippocampi at 7 days and 3 months of age (Figure 3C and D).

Remarkably, a consistent characteristic among splenocytes, cortex and hippocampus was that *Rcor2* gene expression in 9-month-old P8 mice decreased significantly in comparison with R1 controls (cortex:  $P < 0.001$ ; hippocampus:  $P < 0.01$ ).



**Figure 3** *Rcor* gene expression profile in brain tissues from R1 and P8 mice. *Rcor1* and *Rcor2* gene expression was quantified in the cortex (A and C), in the hippocampus (B and D) at the ages 7 days, 3 months and 9 months (n = 4 to 8/group), and in primary cultured astrocytes (n = 6 to 9/group) (E and F) from 2 days-old mice. (G) Interleukin 6 basal gene expression levels in primary cultured astrocytes obtained from 2-day-old mice (n = 4/group). Gene expression levels were measured by real time PCR. Mean  $\pm$  standard error are represented; Two-way ANOVA results are indicated as \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

We also explored the gene expression of *Rcor1* and *Rcor2* in P8 and R1 astrocytes obtained from cerebral cortical tissue of 2-day-old mice. P8 cells showed similar *Rcor1* but decreased *Rcor2* gene expression in comparison with R1 cells ( $t(11) = 5.837$ ;  $P < 0.001$ ) (Figure 3E and F). Notably, the reduced levels of *Rcor2* in P8 compared with R1 astrocytes were accompanied by increased basal levels of *Il6* gene expression ( $t(3) = -4.734$ ;  $P = 0.016$ ) (Figure 3G).

These data show that *Rcor2* is underexpressed in different tissues and organs in P8 mice and, in some cases (namely, in splenocytes and astrocytes), this alteration is detected from early ages. Interestingly, Yankner and colleagues have recently shown that the transcriptional repressor REST (RE1-silencing transcription factor) is crucial for neuroprotection during aging [14]. It is known that REST recruitment of RCOR corepressor is required for its gene silencing activity [15]. The downregulation of *Rcor2* in immune and brain cells of the P8 senescent mice

strongly suggests that the accelerated aging in these mice, as well as their neurodegenerative phenotype, may be related to *Rcor2* deficiency.

On the other hand, RCOR is part of a chromatin remodeling complex containing the lysine specific demethylase (KDM1A), which catalyzes H3 histone demethylation as a way to repress transcription [12]. In the absence of RCOR, KDM1A demethylase activity is impaired with a concomitant increase in H3 histone methylation levels. In this context, preliminary data from our group indicate that the alteration in histone methylation levels is a candidate mechanism through which *Rcor2* could also influence the aging process in P8 mice. Indeed, P8 mice present increased levels of trimethylated histone H3 lysine 4 (H3K4me3) in splenocytes, cortex, and hippocampus (supplementary information, [see Additional file 2A-C]). Moreover, consistent with a role of *Rcor* in methylation signaling and in neuroinflammation, we have found that *Il6* upregulation in response to LPS is significantly

dependent on methyltransferase activity (supplementary information, [see Additional file 3]).

**Negative correlation between *Rcor2* and inflammatory gene expression after lipopolysaccharide (LPS) treatment in C6 glioma cells and mouse hippocampus**

To approach the possible role of *Rcor2* in neuroinflammation, we first analyzed its gene expression after an *in vivo* intraperitoneal LPS injection in 12-month-old P8 and R1 mice. While P8 hippocampus was not further responsive to the peripheral LPS treatment [see Additional file 4], R1 mice presented a significant decrease in *Rcor2* expression ( $t(12) = 2.606, P = 0.023$ ) together with an increase in *Tnfα*, *Il1β* and *Il6* gene expression levels ( $t(5.01) = -2.726, P < 0.05$ ;  $t(5.02) = -2.490, P = 0.055$ ;  $U(9) = 0.000, Z = -2.449, P < 0.05$ ; respectively) (Figure 4A-D).

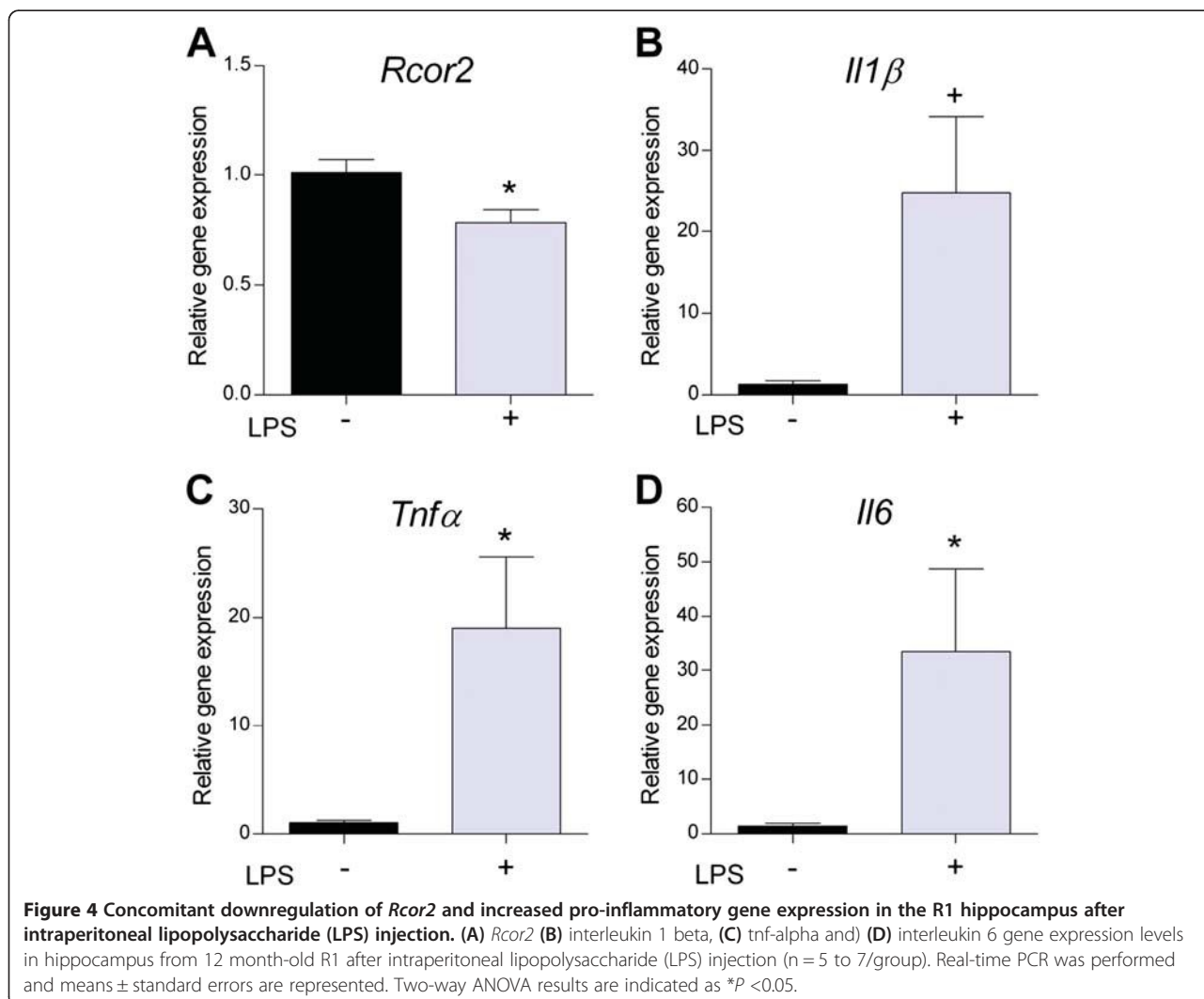
A similar effect was found in C6 glioma cells treated with LPS. C6 cells were activated with LPS for 30 min and 1, 2, 3 and 6 hours. We found a significant reduction in

*Rcor2* gene expression ( $F(5,12) = 47.332; P < 0.001$ ) with a concomitant increase in *Il6* expression in response to LPS ( $F(5,11) = 106.833; P < 0.001$ ) (Figure 5A and B, respectively). A significant correlation (controlling for time of exposure to LPS) was found between *IL-6* and *Rcor2* expression ( $\rho r = -0.512$  and  $P = 0.043$ ) (Figure 5C).

**Knock down of *Rcor2* in astrocytes upregulates *Il6* gene expression**

To determine the involvement of *Rcor2* in the modulation of *Il6* expression, we knocked down *Rcor2* in R1 and P8 astrocytes by transfection of a siRNA to *Rcor2* (si*Rcor2*) using a scrambled siRNA as a control (siC).

*Rcor2* knock down led to a 31% and 46% decrease in its expression levels in R1 and P8 astrocytes, respectively ( $F(1,7) = 10.082, P = 0.016$ ) (Figure 6A). Moreover, si*Rcor2* astrocytes showed increased *Il6* levels in both strains with significantly higher *Il6* levels in P8 compared with the R1 cells (strain:  $F(1,6) = 10.022, P < 0.05$ ) (Figure 6B).



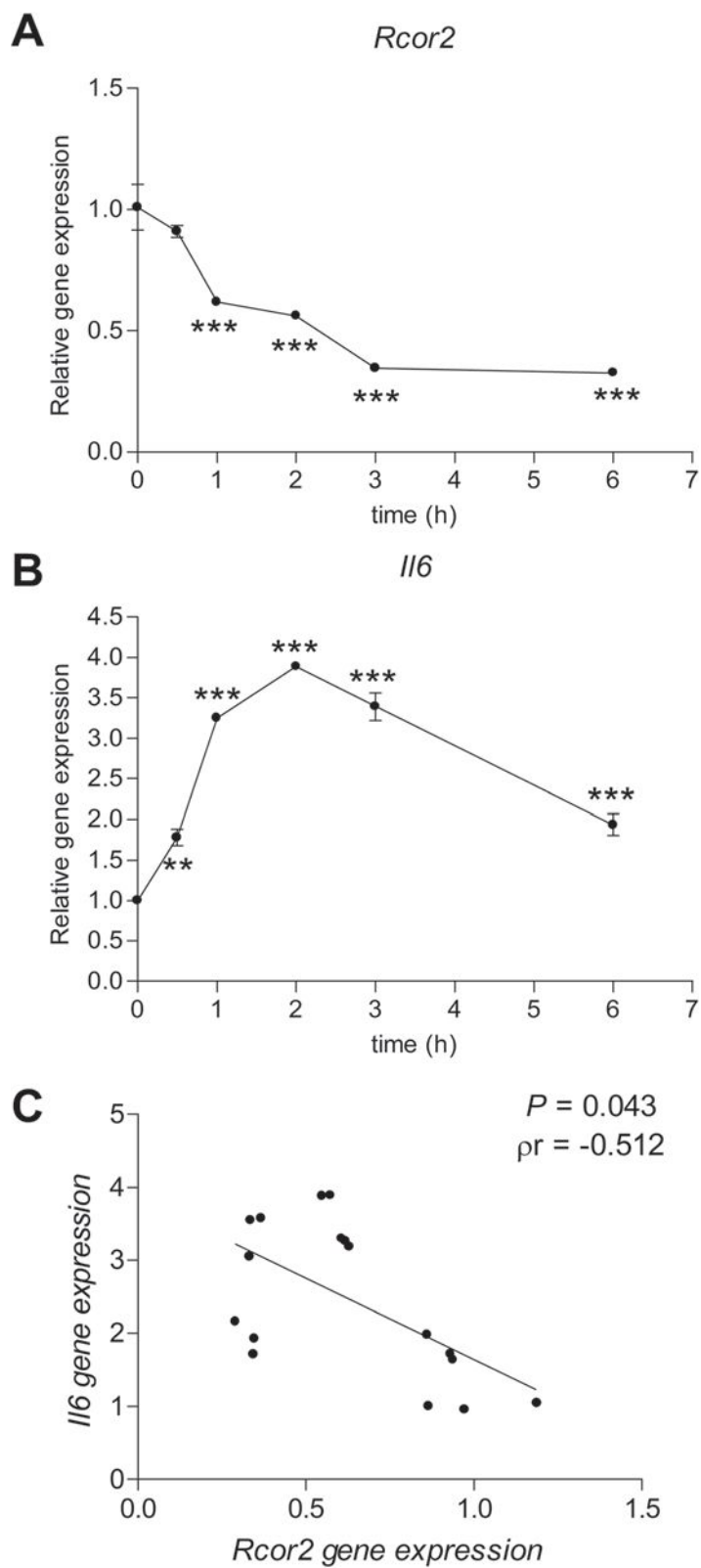


Figure 5 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Figure 5 Concomitant downregulation of *Rcor2* and increased *IL6* gene expression in lipopolysaccharide (LPS)-treated C6 glial cell line.**

(A) *Rcor2* and (B) interleukin 6 gene expression after LPS stimulation (1 µg/ml) in C6 glial cells. Gene expression levels were determined by real-time PCR. Mean ± standard error from three independent experiments are represented. One-way ANOVA results are indicated as \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001. (C) Partial correlation between *Rcor2* and *IL6* gene response after LPS treatment in C6 glial cells. *P* value (*P*) and partial correlation coefficient (*ρ*) are indicated.

Knock-down data in R1 and P8 astrocytes reinforce the notion that *Rcor* gene product acts as a repressor of an inflammatory program [16,17]. Our findings suggest that *Rcor2* underexpression may be at the root of the inflamed phenotype that characterizes the P8 strain [29].

**Interplay between *Rcor2* expression and inflammatory response in *siRcor2* astrocytes**

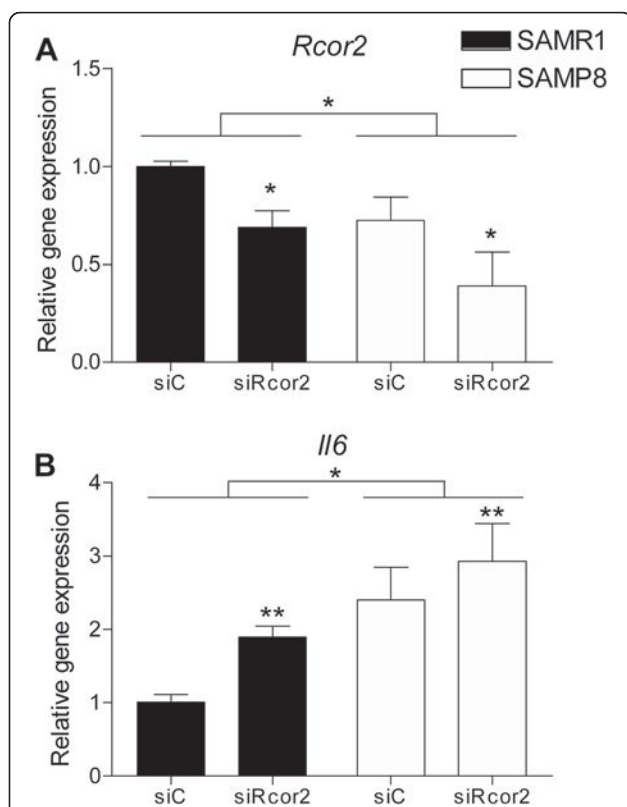
*IL6* gene expression was then analyzed in R1 and P8 astrocytes transfected with *siRcor2* following activation by LPS and Interferon gamma (IFN $\gamma$ ). Astrocytes from both strains transfected with scrambled siRNA (siC) were used as controls.

Notably, LPS/IFN $\gamma$  treatment further reduced *Rcor2* expression ( $F(1,14) = 47.465$ ,  $P < 0.001$ ) with a concomitant

increase in *IL6* expression in all conditions tested (siC and siRcor2 transfected R1 and P8 cells) ( $F(1,14) = 134.730$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 7B) (Figure 7A and B, a versus b; c versus d; f versus e; and g versus h).

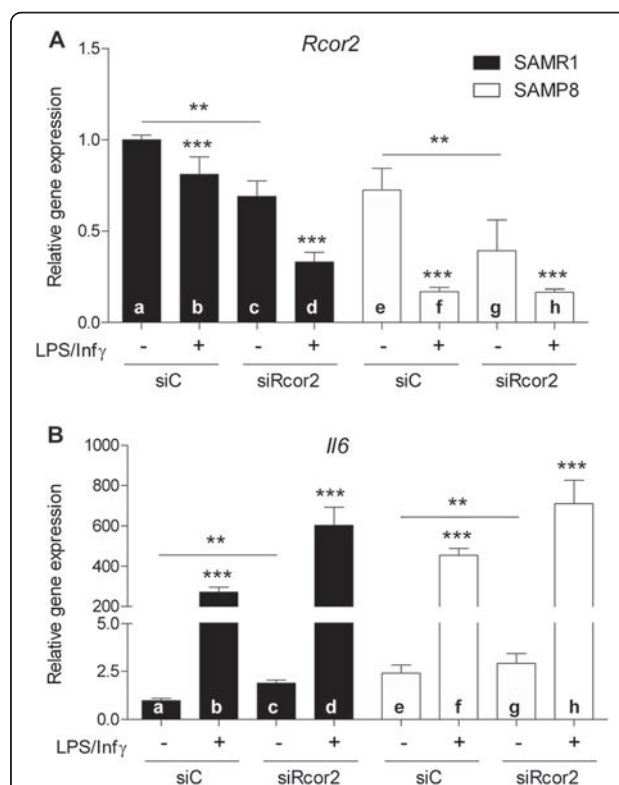
For *Rcor2*, the interaction between strain and LPS/IFN $\gamma$  stimulation was also significant ( $F(1,14) = 16.673$ ,  $P < 0.01$ ) indicating that the treatment led to a greater decrease in *Rcor2* after LPS/IFN $\gamma$  stimulation in P8 than in R1 cells. *IL6* expression in response to the stimulus was significantly exacerbated in *siRcor2* knock down astrocytes in comparison with siC-transfected cells (transfection X treatment effect:  $F(1,14) = 11.311$ ,  $P < 0.01$ ) (Figure 7B, d versus b and h versus f).

These results suggest that *Rcor2* downregulation in astrocytes induces inflammation and in turn, an



**Figure 6 Knock down of *Rcor2* in P8 and R1 astrocytes.**

(A) *Rcor2* and (B) Interleukin 6 basal gene expression levels after transfection in P8 and R1 astrocytes of a siRNA to *Rcor2* (*siRcor2*) using a scrambled siRNA as a control (siC). Gene expression levels were measured by real-time PCR. Mean ± standard error from three independent experiments are represented; Two-way ANOVA results are indicated as \**P* < 0.05.



**Figure 7 Interplay between *Rcor2* expression and inflammatory response in *siRcor2* astrocytes.**

(A) *Rcor2* and (B) interleukin 6 gene expression levels after 4.5 h lipopolysaccharide (LPS) (2 µg/ml) and interferon-gamma (3 µg/ml) stimulation in R1 and P8 astrocytes transfected with siRNA to *Rcor2* (*siRcor2*) or scrambled siRNA as a control (siC) ( $n = 3$ /group). Gene expression levels were determined by real-time PCR. Mean ± standard error are represented; Two-way ANOVA results are indicated as \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

inflammatory environment further downregulates *Rcor2*. We can conclude from our data on transfected astrocytes that the LPS/IFN $\gamma$  stimulus and *Rcor2* knock down represent independent modulators of *Il6* expression and show a synergic effect when combined.

## Conclusions

Little information is currently available on the molecular triggers of chronic low-grade inflammation, a process that affects the function of most organs and tissues including the central nervous system and is involved in aging and neurodegeneration [41,42].

RCOR is found in a complex with RE1-silencing transcription factor (REST), which plays a role in protecting the brain from age-related insults in animal models and a role in preservation of cognitive function and longevity in aging humans [14]. Taking into account the early downregulation of RCOR2 in the P8 mouse model of accelerated aging and neurodegeneration, further studies are warranted so as to examine whether the REST/RCOR complex is involved in the shorter lifespan of P8 mice as well as the role of RCOR2 in human cognition and longevity.

Our study indicates that neuroinflammation is a pathophysiological outcome of *Rcor2* downregulation in the SAMP8 mice. The fact that *Rcor2* and *Il6* presented an opposite response after an inflammatory stimulus in hippocampus and in glial cells, suggests a possible interplay between the pathways involved in the regulation of both genes. This notion is reinforced by our data showing that *Il6* gene is upregulated by *Rcor2* knock down in astrocytes. Therefore, RCOR2 may represent a potential target for the prevention or treatment of age-related chronic inflammation and neurodegeneration.

## Additional files

**Additional file 1:** List of primers and probe sets used for real time RT-PCR analysis.

**Additional file 2:** Histone H3 methylation pattern in R1 and P8 tissues.

**Additional file 3:** Methyltransferase inhibitor MTA reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced *Il6* gene expression in C6 glioma cells.

**Additional file 4:** Pro-inflammatory gene expression response in P8 hippocampus after intraperitoneal lipopolysaccharide (LPS) injection.

## Abbreviations

Rcor: REST corepressor; P8: senescence-accelerated prone 8 mouse; R1: senescence-accelerated resistant 1; LPS: lipopolysaccharide; IL: interleukin; *Tnf- $\alpha$* : tumor necrosis factor; AD: Alzheimer's disease; KDM1A: histone demethylase lysine-specific demethylase 1A; REST: RE1-silencing transcription factor; ESCs: embryonic stem cells; *Ccl2*: chemokine ligand 2; *Mip1 $\alpha$* : macrophage proinflammatory protein 1 $\alpha$ ; *Cxcl*: chemokine (C-X-C motif) ligands; NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa B; IFN $\gamma$ : Interferon gamma; Rcor: REST corepressor; P8: senescence-accelerated prone 8 mouse;

R1: senescence-accelerated resistant 1; LPS: lipopolysaccharide; IL: interleukin; *Tnf- $\alpha$* : tumor necrosis factor; AD: Alzheimer's disease; KDM1A: histone demethylase lysine-specific demethylase 1A; REST: RE1-silencing transcription factor; ESCs: embryonic stem cells; *Ccl2*: chemokine ligand 2; *Mip1 $\alpha$* : macrophage proinflammatory protein 1 $\alpha$ ; *Cxcl*: chemokine (C-X-C motif) ligands; NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa B; IFN $\gamma$ : Interferon gamma.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

Designed research: MJAL and PK; performed research: MJAL, PMM, MCF, MCT, MPar, RC, RME, MP and PK; contributed new reagents/analytic tools: MPar, RME, MP, CS and PK; analyzed data MJAL, MCF, MCT, MPar, RC, CS, and PK; wrote the manuscript: MJAL and PK. All authors read and approved the final manuscript.

## Author details

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), CSIC, Rosselló 161, E-08036 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Unidad de Farmacología y Farmacognósia. Institut de Biomedicina (IBUB), Universidad de Barcelona y CIBERNED. Facultad de Farmacia, Av Diagonal, 643, E-08028 Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rosellón 149, E-08036 Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Instituto de Neurociencias, Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal. Facultad de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), E-08193 Barcelona, Spain.

Received: 15 April 2014 Accepted: 7 July 2014

Published: 23 July 2014

## References

1. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G: **Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence.** *Ann N Y Acad Sci* 2000, **908**:244–254.
2. Cevenini E, Monti D, Franceschi C: **Inflamm-aging.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013, **16**:14–20.
3. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C: **Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity.** *Mech Ageing Dev* 2007, **128**:83–91.
4. Kaliman P, Parrizas M: **Obesity and systemic inflammation: insight on epigenetic mechanisms.** In *Role of the Adipocyte in the Development of Type 2 Diabetes*, Volume 1st. Edited by Rijeka CC. Croatia: InTech; 2011:65–88.
5. Pizza V, Agresta A, D'Acunto CW, Festa M, Capasso A: **Neuroinflammation and ageing: current theories and an overview of the data.** *Rev Recent Clin Trials* 2011, **6**:189–203.
6. Liu Y, Zhang M, Hao W, Mihaljevic I, Liu X, Xie K, Walter S, Fassbender K: **Matrix metalloproteinase-12 contributes to neuroinflammation in the aged brain.** *Neurobiol Aging* 2013, **34**:1231–1239.
7. McGeer PL, McGeer EG: **Inflammation and the degenerative diseases of aging.** *Ann N Y Acad Sci* 2004, **1035**:104–116.
8. Lee M: **Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation.** *Curr Protein Pept Sci* 2013, **14**:21–32.
9. Bardou I, Brothers HM, Kaercher RM, Hopp SC, Wenk GL: **Differential effects of duration and age on the consequences of neuroinflammation in the hippocampus.** *Neurobiol Aging* 2013, **34**:2293–2301.
10. Farso M, Menard C, Colby-Milley J, Quirion R: **Immune marker CD68 correlates with cognitive impairment in normally aged rats.** *Neurobiol Aging* 2013, **34**:1971–1976.
11. Lee MG, Wynder C, Cooch N, Shiekhattar R: **An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation.** *Nature* 2005, **437**:432–435.
12. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y: **Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1.** *Cell* 2004, **119**:941–953.
13. Yang P, Wang Y, Chen J, Li H, Kang L, Zhang Y, Chen S, Zhu B, Gao S: **RCOR2 is a subunit of the LSD1 complex that regulates ESC property and substitutes for SOX2 in reprogramming somatic cells to pluripotency.** *Stem Cells* 2011, **29**:791–801.



14. Lu T, Aron L, Zullo J, Pan Y, Kim H, Chen Y, Yang TH, Kim HM, Drake D, Liu XS, Bennett DA, Colaiácovo MP, Yankner BA: **REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease.** *Nature* 2014, **507**:448–454.
15. Andres ME, Burger C, Peral-Rubio MJ, Battaglioli E, Anderson ME, Grimes J, Dallman J, Ballas N, Mandel G: **CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:9873–9878.
16. Hanzu FA, Musri MM, Sanchez-Herrero A, Claret M, Esteban Y, Kaliman P, Gomis R, Parrizas M: **Histone demethylase KDM1A represses inflammatory gene expression in preadipocytes.** *Obesity (Silver Spring)* 2013, **21**:E616–E625.
17. Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK: **A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death.** *Cell* 2009, **137**:47–59.
18. Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX: **The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model.** *Ageing Res Rev* 2014, **13**:13–37.
19. Morley JE, Farr SA, Kumar VB, Armbrecht HJ: **The SAMP8 mouse: a model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease.** *Curr Pharm Des* 2012, **18**:1123–1130.
20. Pallas M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G: **From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8).** *J Alzheimers Dis* 2008, **15**:615–624.
21. Wang H, Lian K, Han B, Wang Y, Kuo SH, Geng Y, Qiang J, Sun M, Wang M: **Age-related alterations in the metabolic profile in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse prone 8: a spontaneous Alzheimer's disease mouse model.** *J Alzheimers Dis* 2014, **39**:841–848.
22. Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K: **Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence.** *J Am Geriatr Soc* 1991, **39**:911–919.
23. Nomura Y, Okuma Y: **Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice.** *Neurobiol Aging* 1999, **20**:111–115.
24. Morley JE, Armbrecht HJ, Farr SA, Kumar VB: **The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1822**:650–656.
25. del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Pallas M, Camins A, Vilaplana J, Pelegri C: **Cerebral amyloid angiopathy, blood-brain barrier disruption and amyloid accumulation in SAMP8 mice.** *Neurodegener Dis* 2011, **8**:421–429.
26. Takeda T: **Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice.** *Neurochem Res* 2009, **34**:639–659.
27. Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodriguez MI, Acuna-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallas M: **Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM).** *Mech Ageing Dev* 2005, **126**:1300–1304.
28. Sureda FX, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallas M: **Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8.** *Exp Gerontol* 2006, **41**:360–367.
29. Bayram B, Nikolai S, Huebbe P, Ozcelik B, Grimm S, Grune T, Frank J, Rimbach G: **Biomarkers of oxidative stress, antioxidant defence and inflammation are altered in the senescence-accelerated mouse prone 8.** *Age* 2013, **35**:1205–1217.
30. Garcia-Matas S, Gutierrez-Cuesta J, Coto-Montes A, Rubio-Acero R, Diez-Vives C, Camins A, Pallas M, Sanfeliu C, Cristofol R: **Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity.** *Aging Cell* 2008, **7**:630–640.
31. Cuesta S, Kireev R, Forman K, Garcia C, Escames G, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA: **Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8).** *Exp Gerontol* 2010, **45**:950–956.
32. Cuesta S, Kireev R, Garcia C, Forman K, Escames G, Vara E, Tresguerres JA: **Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model.** *Mech Ageing Dev* 2011, **132**:573–582.
33. Cuesta S, Kireev R, Garcia C, Forman K, Vara E, Tresguerres JA: **Effect of growth hormone treatment on pancreatic inflammation, oxidative stress, and apoptosis related to aging in SAMP8 mice.** *Rejuvenation Res* 2011, **14**:501–512.
34. Menardo J, Tang Y, Ladrech S, Lenoir M, Casas F, Michel C, Bourien J, Ruel J, Rebillard G, Maurice T, Puel JL, Wang J: **Oxidative stress, inflammation, and autophagic stress as the key mechanisms of premature age-related hearing loss in SAMP8 mouse cochlea.** *Antioxid Redox Signal* 2012, **16**:263–274.
35. Rodriguez MI, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Garcia JA, Ortiz F, Acuna-Castroviejo D: **Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice.** *J Pineal Res* 2007, **42**:272–279.
36. Wauquier F, Barquissau V, Leotoing L, Davicco MJ, Lebecque P, Mercier S, Philippe C, Miot-Noirault E, Chardigny JM, Morio B, Wittrant Y, Coxam V: **Borage and fish oils lifelong supplementation decreases inflammation and improves bone health in a murine model of senile osteoporosis.** *Bone* 2012, **50**:553–561.
37. Zhao X, Bian Y, Sun Y, Li L, Wang L, Zhao C, Shen Y, Song Q, Qu Y, Niu S, Wu W, Gao F: **Effects of moderate exercise over different phases on age-related physiological dysfunction in testes of SAMP8 mice.** *Exp Gerontol* 2013, **48**:869–880.
38. Tha KK, Okuma Y, Miyazaki H, Murayama T, Uehara T, Hatakeyama R, Hayashi Y, Nomura Y: **Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8.** *Brain Res* 2000, **885**:25–31.
39. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D: **Neuroinflammation: the role and consequences.** *Neurosci Res* 2014, **79**:C1–12.
40. Jana M, Palencia CA, Pahan K: **Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease.** *J Immunol* 2008, **181**:7254–7262.
41. Yaffe K, Kanaya A, Lindquist K, Simonsick EM, Harris T, Shorr RI, Tylavsky FA, Newman AB: **The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline.** *JAMA* 2004, **292**:2237–2242.
42. von Bernhardi R: **Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease.** *Neurotox Res* 2007, **12**:215–232.

doi:10.1186/1742-2094-11-126

Cite this article as: Alvarez-López et al.: *Rcor2* underexpression in senescent mice: a target for inflammaging? *Journal of Neuroinflammation* 2014 **11**:126.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

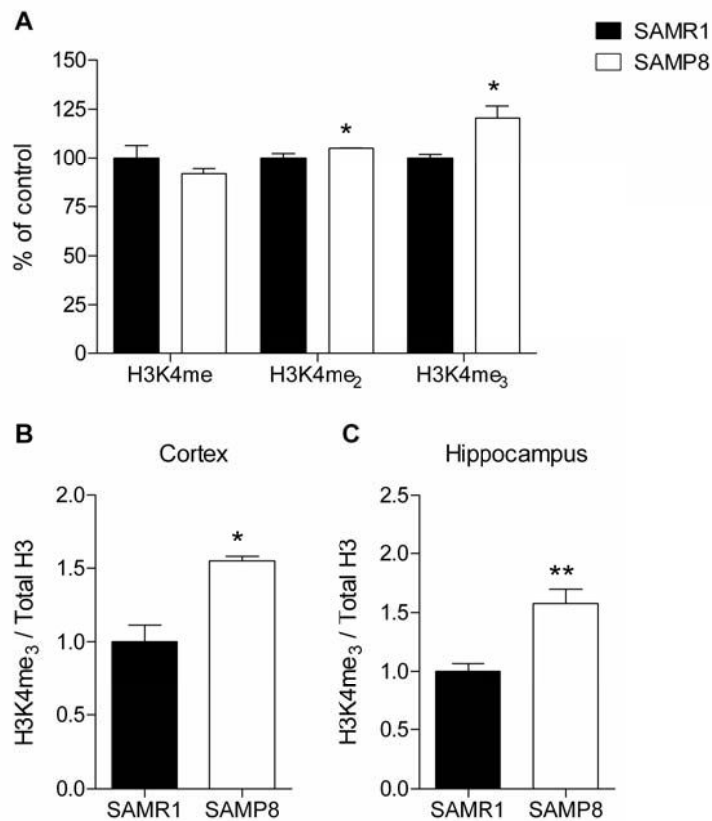


Additional file 1. List of primers and probe sets used for real time RT-PCR analysis.

Gene Symbol	Specie	Reference (ABI)	Reference Sequence ID
<i>Il16</i>	Mouse	Mm00434228_m1	NM_008361.3
<i>Il6</i>	Mouse	Mm00446191_m1	NM_031168.1
<i>Rcor1</i>	Mouse	Mm01336704_m1	NM_198023.2
<i>Rcor2</i>	Mouse	Mm00499756_m1	NM_054048.3
<i>Tnfa</i>	Mouse	Mm00443258_m1	NM_013693.2
<i>Tbp</i>	Mouse	Mm00446971_m1	NM_013684.3
<i>Il6</i>	Rat	Rn01410330_m1	NM_012589.1
<i>Rcor2</i>	Rat	Rn01454655_g1	NM_001013994.1
<i>Tbp</i>	Rat	Rn01455646_m1	NM_001004198.1

### Supplementary S2. Histone H3 methylation pattern in R1 and P8 tissues.

(A) Mono-, di- and tri-methylation in lysine 4 histone H3 (H3K4me, H3K4me<sub>2</sub>, H3K4me<sub>3</sub>) in splenocytes from 9 month-old P8 and R1 mice were determined by ELISA (n=3/group); trimethylated histone H3 lysine 4 (H3K4me<sub>3</sub>) was determined by Western blots in cortex (B) and hippocampus (C) from 9 month-old SAMP8 and SAMR1 mice and quantified by scanning densitometry (n=3/group and n=6/group, respectively). H3K4me<sub>3</sub> was corrected by total histone H3 and data was represented as mean ± SE; t-test for independent samples results are indicated as \* p<0.05.



### Materials and Methods

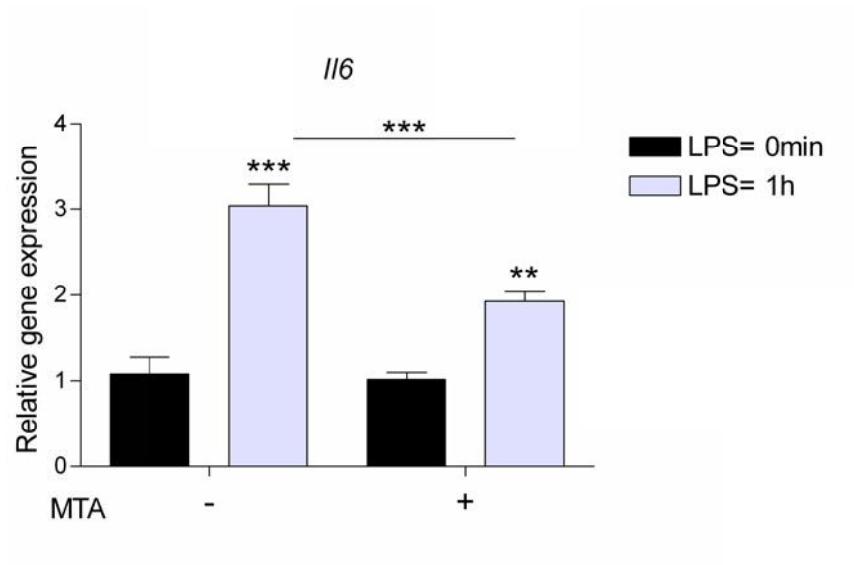
Histone proteins were extracted from splenocytes using EpiQuik Total Histone Extraction kit (Epigentek) and quantification of methylated H3K4 was performed using the EpiQuik Global Pan-Methyl Histone H3-K4 Quantification Kit (Epigentek), in accordance with the manufacturer's protocol. Data were normalized to SAMR1 levels.

Acidic histone fractions from cortices and hippocampi were obtained as described by Fischer et al. (2007). Briefly, tissues for immunoblotting were lysed in a buffer containing 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail (Pierce) and 1% Triton-X100 at 4°C for 15 min and then centrifuged 10 min at 400 x g. The remaining pellets were dissolved in the same buffer supplemented with 0.2 M HCl and incubated on ice for 30 min. After a centrifugation, the supernatants containing the histone fractions were immediately frozen at -80°C.

Histone fractions (5µg) were electrophoretically analyzed on 12% bis-Tris polyacrylamide gels and transferred to a 0.45µm PVDF membrane. Membranes were blocked with 5% BSA in PBS for 1 h and incubated overnight at 4°C with the specific primary antibodies (1:1000, Millipore). Membranes were washed and incubated with peroxidase-labeled secondary antibodies for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands were detected by autoradiography. Specific bands from Western blot were quantified by scanning densitometry using Quantity One® 1-D analysis 4.6.3 software (Bio-Rad USA, Life Science Research, Hercules, CA). Histone modifications levels were corrected by total histone 3 expression.

### Supplementary S3. Methyltransferase inhibitor MTA reduces LPS-induced IL6 gene expression in C6 glioma cells

C6 glioma cells were treated for 1 h with LPS (1 $\mu$ g/ml) in C6 in the absence or presence of methylthioadenosine (MTA) (1mM) (n=6/group). Gene expression levels were determined by real time PCR. Mean  $\pm$  standard error are represented. Pairwise comparisons with LSD adjustment from two-way ANOVA are indicated as \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.



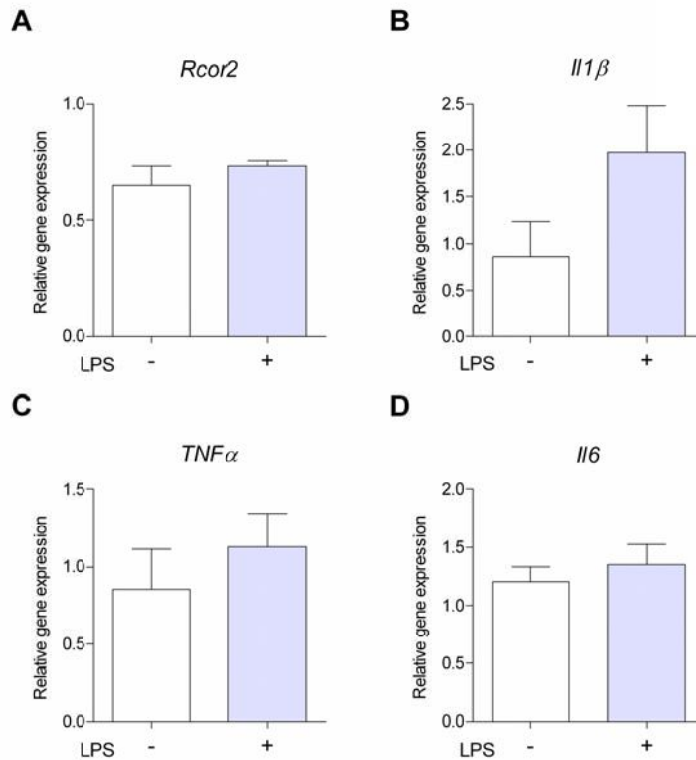
### Materials and Methods

Rat C6 glioma cells (purchased from the European Collection of Cell Cultures, ECACC) were cultured as monolayer and grown in F12/DMEM medium (Gibco-Invitrogen) supplemented with 10% foetal bovine serum (Invitrogen), 1% non essential a/a's (Gibco-Invitrogen), 1/500 gentamicine (Gibco-Invitrogen) and maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified environment.

For each treatment, C6 cells were seeded in a six-well plate and cultured in F12/DMEM without serum for 12 h prior to stimulation with LPS (1 $\mu$ g/ml) for different time periods ranging from 30 min to 6 h and exposed to MTA (1mM) or vehicle during LPS treatment when indicated.

**Supplementary S4. Pro-inflammatory gene expression response in P8 hippocampus after intraperitoneal LPS injection.**

(A) *Rcor2*, (B) interleukin 1 beta, (C) *tnf-alpha* and (D) interleukin 6 gene expression levels in hippocampus from 12 month-old R1 after intraperitoneal LPS injection (n=3-4/group). Real time PCR was performed and mean  $\pm$  standard error are represented. Two-way ANOVA results are indicated as \*  $p < 0.05$ .



**Materials and Methods**

SAMP8 mice (males, 12 month-old, n=3/group) received an intraperitoneal (IP) injection of LPS (2.9 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA), or an equal volume of saline. Three hours after treatment, blood samples were collected and mice were sacrificed by cervical dislocation. Tissues were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processed.

Detection of  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL1-}\beta$  and IL6 in plasma were performed by enzyme-linked immunosorbent assay, in accordance with the protocol provided by the manufacturer (Mediclinics, R&D Systems and BioNovarespectively).



## **II**

**El ejercicio físico a largo plazo modula la expresión génica en hipocampo de ratones hembra senescentes**





---

Los resultados presentados en este capítulo se incluyen en el siguiente artículo publicado:

**Long-Term Exercise Modulates Hippocampal Gene Expression in Senescent  
Female Mice**

*Journal of Alzheimer's Disease*, 33: 1177–1190 (2013)

**María J Alvarez-López**, Marco Castro-Freire, Marta Cosín-Tomás, Sandra Sanchez-Roig, Jaume F. Lanza, Jaume del Valle, Marcelina Párrizas, Antonio Camins, Merce Pallàs, Rosa María Escorihuela y Perla Kaliman.

Contribución: Purificación de ARN y estudios de expresión génica por Real Time PCR, análisis de los resultados obtenidos por microarrays de expresión, participación en la interpretación de resultados y en la elaboración del manuscrito.

## RESUMEN

El ejercicio físico moderado es una práctica recomendada debido a los numerosos beneficios que produce en la salud cardiovascular y metabólica, así como a nivel cognitivo y cerebral [720]. Numerosos son los trabajos que muestran en modelos transgénicos de Alzheimer los efectos preventivos y protectores de un estilo de vida activo sobre la neurodegeneración. Puesto que los ratones SAMP8 son un modelo que por sus características fenotípicas y fisiológicas está ampliamente utilizado para el estudio del deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer espontánea [273, 721], nos planteamos estudiar las implicaciones de una intervención de 6 meses de ejercicio voluntario y moderado en ratones adultos SAMP8 y sus controles SAMR1.

Nuestros datos muestran que una intervención de ejercicio voluntario y moderado a largo plazo mejora en los ratones SAMP8 rasgos fenotípicos externos asociados a envejecimiento, por ejemplo el color de la piel o el temblor físico, y promueve la vascularización y la expresión de genes neurotróficos en hipocampo. Además, el estudio de genoma murino completo por medio de microarrays de expresión permitió la identificación de posibles biomarcadores de envejecimiento sensibles al ejercicio físico.

## PRINCIPALES RESULTADOS

### **4.3.5. 2.1. El ejercicio a largo plazo induce mejoras fenotípicas en ratones SAMP8**

Con el objetivo de evaluar los efectos de la actividad física, se analizaron los rasgos fenotípicos que presentaban ambas cepas, SAMP8 y su control SAMR1, sedentarios o después de 6 meses de ejercicio moderado y voluntario. Al finalizar la intervención los ratones de todos los grupos tenían 10 meses de edad, lo cual en el caso de los SAMP8 representa un estadio muy envejecido ya que su esperanza de vida promedio es de 12 meses [721]. El fenotipo senescente propio del modelo SAMP8 afectó los niveles de ejercicio registrados en esta cepa, que fueron menores que los de su control SAMR1 (Fig 1 del Artículo 2). La evaluación de las características fenotípicas mediante el test SHIRPA, como el temblor o el aspecto de la piel, mostraron un claro deterioro en los

animales SAMP8 respecto a su control SAMR1 que fue mejorado significativamente tras la intervención de ejercicio en la cepa SAMP8 (Fig 2 del Artículo 2).

Por otro lado, se analizaron niveles de vascularización cerebral mediante inmunohistoquímica utilizando laminina como marcador y se observó una reducción en el área vascular en hipocampos de ratones SAMP8 respecto a sus controles SAMR1. Tras la intervención de ejercicio físico, el área vascular se incrementó significativamente en ambas cepas (Fig 3 del Artículo 2).

#### **4.3.6. 2.2. Aumento de expresión génica de *Bdnf* en hipocampo de ratones SAMP8 tras una intervención de ejercicio físico a largo plazo**

La disminución de expresión de BDNF y de otros componentes de su vía de señalización se ha asociado con procesos de envejecimiento [722-724] y con fenotipos característicos de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer [725, 726]. El aumento de expresión de componentes de dicha vía tras intervenciones de ejercicio físico y las mejoras cognitivas que ello conlleva ha sido descrito en numerosos trabajos previos [658, 720]. En condiciones basales (sedentarias) los ratones SAMP8 presentaron niveles reducidos de expresión de los genes *Bdnf* y de su receptor *Trkb* respecto de su control SAMR1 (Fig 4 del Artículo 2). El ejercicio físico incrementó la expresión en el gen *Bdnf* en la cepa SAMP8 pero no en SAMR1, confirmando así la eficacia de la intervención aplicada. Por el contrario, su receptor *Trkb* no mostró diferencias asociadas a la práctica de ejercicio físico a largo plazo.

#### **4.3.7. 2.3. Análisis por microarrays de expresión génica en hipocampo de ratones SAMP8 y SAMR1 tras una intervención de ejercicio físico a largo plazo**

Con el objetivo de identificar genes asociados al proceso de envejecimiento, modulables por la práctica de ejercicio físico, se llevaron a cabo estudios por microarrays de expresión de genoma murino completo en hipocampo de animales SAMP8 sedentarios y activos, utilizando ratones SAMR1 sedentarios como control de envejecimiento normal. Todos los animales analizados tenían 10 meses de edad. Los resultados obtenidos se representaron mediante diagramas de Venn que permitieron identificar 34 genes como posibles genes marcadores de envejecimiento modulables por

el ejercicio físico (Fig 5, Tabla 2 del Artículo 2). Utilizando la base de datos *Gene Ontology (GO) database*, se estableció que dichos genes se asociaban principalmente a vías relacionadas con el mantenimiento de matriz extracelular (Tabla 3 del Artículo 2).

Por último, validamos algunos de los genes candidatos que presentaban especial relevancia por su funcionalidad en sistema nervioso y en la patofisiología de la EA mediante Real Time PCR. Así determinamos la especificidad del colágeno tipo 1 alfa 1 (*Colla1*) y 2 (*Colla2*), fibromodulina (*Fmod*), la sintasa *Ptgds* y la aldehído deshidrogenasa *Aldh1a2* como posibles marcadores de envejecimiento en hipocampo que revierten sus alteraciones en respuesta al ejercicio físico moderado y mantenido (Fig 6 del Artículo 2).

#### **4.3.8. 2.4. Microarrays en corteza cerebral (resultados relacionados no publicados en el artículo)**

Es importante comentar que, aunque los siguientes datos no se incluyeron en el artículo presentado, se realizaron estudios por microarrays de expresión también en tejido de corteza cerebral, donde se hallaron 153 genes asociados a envejecimiento y modulados por ejercicio que revelaron, de igual forma que en hipocampo, vías relacionadas con matriz y espacio extracelular así como adhesión celular y diferentes tipos de uniones entre células (Anexo 2). Sin embargo, decidimos no incluir estos datos en el artículo puesto que el tejido analizado mostraba gran heterogeneidad, ya que se trataba de corteza cerebral completa; y la validación de algunos de estos genes por real time PCR no dio resultados significativos, posiblemente por las diferencias en la sensibilidad de ambas técnicas.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se muestran mejoras en respuesta a una práctica de ejercicio físico moderado y voluntario a nivel fenotípico y nervioso en ratones senescentes SAMP8 de edad avanzada. Aspectos como la vascularización de hipocampo, la expresión génica de factores neurotróficos concretos como el *Bdnf* y alteraciones en el patrón global de expresión de varios genes mediante el estudio por microarrays, ponen de manifiesto la influencia positiva de la actividad física en el estado fisiológico del individuo durante el envejecimiento.

Además, el estudio de las vías en las que se encuentran implicados los genes alterados tras el ejercicio físico, ha identificado a la matriz extracelular como elemento común de respuesta a la intervención en cerebro. Éste es un dato de gran importancia puesto que la matriz extracelular es el soporte físico para la función, homeostasis y supervivencia neuronal, y se han descrito alteraciones en los elementos que la componen en modelos de neurodegeneración y enfermedad de Alzheimer [727, 728], apuntando a que el ejercicio puede contrarrestar en parte estos procesos en sus primeras etapas.

En conclusión, nuestro estudio ha identificado nuevos candidatos de genes marcadores de envejecimiento sensibles a ejercicio físico y ha demostrado mejoras fenotípicas y moleculares que sugieren la práctica de ejercicio físico moderado como un estilo de vida saludable que puede prevenir o retardar rasgos asociados a deterioro cognitivo durante el envejecimiento.

# Long-Term Exercise Modulates Hippocampal Gene Expression in Senescent Female Mice

María Jesús Alvarez-López<sup>a</sup>, Marco Castro-Freire<sup>a</sup>, Marta Cosín-Tomás<sup>a</sup>, Sandra Sanchez-Roige<sup>b</sup>, Jaume F. Lalanza<sup>b</sup>, Jaume del Valle<sup>c</sup>, Marcelina Párrizas<sup>d</sup>, Antonio Camins<sup>c</sup>, Merce Pallás<sup>c</sup>, Rosa María Escorihuela<sup>b</sup> and Perla Kaliman<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain*

<sup>b</sup>*Facultad de Medicina, Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal, Instituto de Neurociencias, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) Barcelona, Spain*

<sup>c</sup>*Facultad de Farmacia, Unidad de Farmacología y Farmacognósia. Institut de Biomedicina (IBUB), Universidad de Barcelona y CIBERNED, Barcelona, Spain*

<sup>d</sup>*Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain*

Accepted 10 October 2012

**Abstract.** The senescence-accelerated SAMP8 mouse is considered a useful non-transgenic model for studying aspects of progressive cognitive decline and Alzheimer's disease (AD). Using SAMR1 mice as controls, here we explored the effects of 6 months of voluntary wheel running in 10-month-old female SAMP8 mice. Exercise in SAMP8 mice improved phenotypic features associated with premature aging (i.e., skin color and body tremor) and enhanced vascularization and BDNF gene expression in the hippocampus compared with controls. With the aim of identifying genes involved in brain aging responsive to long-term exercise, we performed whole genome microarray studies in hippocampus from sedentary SAMP8 (P8sed), SAMR1 (R1sed), and exercised SAMP8 (P8run) mice. The genes differentially expressed in P8sed versus R1sed were considered as putative aging markers (i) and those differentially expressed in P8run versus P8sed were considered as genes modulated by exercise (ii). Genes differentially expressed in both comparisons (i and ii) were considered as putative aging genes responsive to physical exercise. We identified 34 genes which met both criteria. Gene ontology analysis revealed that they are mainly involved in functions related to extracellular matrix maintenance. Selected genes were validated by real-time quantitative PCR assays, i.e., collagen type 1 alpha 1 (col1a1), collagen type 1 alpha 2 (col1a2), fibromodulin (fmod), prostaglandin D(2) synthase (ptgds), and aldehyde dehydrogenase (Aldh1a2). As a whole, our study suggests that exercise training during adulthood may prevent or delay gene expression alterations and processes associated with hippocampal aging in at-risk subjects.

**Keywords:** Aging, Alzheimer's disease, brain, exercise, gene, long-term, mice, microarrays, SAMP8, voluntary

## INTRODUCTION

It is now well accepted that sedentarism is a risk factor for cardiovascular and metabolic diseases and for premature mortality. Indeed, the World Health

Organization has stressed the relevance of an active lifestyle to prevent chronic diseases and promote healthy aging [1]. The regular practice of moderate physical exercise enhances cardiovascular health [2–5], decreases the impact of risk factors affecting metabolic and brain health [6–11], and protects cognitive and psychological functions [12–15]. There is increasing evidence of the beneficial effects of aerobic physical exercise on synapse and general brain

\*Correspondence to: Perla Kaliman, Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024531 Ext14; Fax: +34 934035982; E-mail: pkaliman@ub.edu.

function, at both young and old ages and in both healthy and pathological states [15, 16]. In particular, several studies using transgenic mouse models of Alzheimer's disease (AD) have demonstrated the protective effects of this healthy lifestyle against neurodegeneration [17]. The rodent cortex and hippocampus are particularly sensitive to exercise-induced modulation of genes involved in neuronal plasticity and activity [18–21]. Although transcriptional responsiveness varies over the lifetime, many brain genes still seem to be responsive to exercise in old animals and in animal models for neurodegenerative diseases [22–24]. The precise molecular pathways that sustain these processes are unknown but recent data have described that epigenetic modifications seem to be involved in the mechanisms of cognitive and stress resistance improvement associated with physical exercise [17].

The senescence-accelerated P8 (SAMP8) mouse model of aging displays many features known to occur early in the pathogenesis of chronic diseases. The SAMP8 strain was initially selected from AKR/J mice for its spontaneous differential phenotypic characteristics indicative of an accelerated aging process. SAM resistant mice (SAMR1), with a similar genetic background to SAMP8, show normal aging characteristics and have been extensively used as an appropriate control model [25]. SAMP8 mice suffer increased oxidative stress, vascular dysfunction, overproduction of amyloid- $\beta$  protein precursor (A $\beta$ PP) and amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) protein, cholinergic deficits in the forebrain, increased tau phosphorylation, and cognitive and behavioral alterations [26–28]. Therefore, the SAMP8 mouse is considered a useful model to study certain aspects of cognitive decline and AD.

Here we show that a long-term voluntary exercise intervention in adult SAMP8 mice improved external signs of phenotypic decline (i.e., skin color, coat appearance, body tremor) and enhanced vascularization and BDNF gene expression in the hippocampus. Through whole genome microarray analyses, we identified hippocampal genes that were altered in sedentary SAMP8 and reached control levels in response to exercise, therefore representing putative aging genes responsive to chronic exercise practice.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animal care*

All experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the University Autonomous of Barcelona (Comissió Ètica d'Experimentació Animal

i Humana, CEEAH, UAB), following the 'Principles of laboratory animal care', and were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

SAMP8 and SAMR1 female mice were provided by El Parc Tecnològic (Barcelona, Spain). They were maintained under standard conditions (temperature  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , humidity 50–60%, 12:12-h light-dark cycle, lights on at 7:00 a.m.), with food (A04, Harlan, Spain) and tap water available *ad libitum* throughout the study. Body weight (g) was measured weekly. Sentinels from the facility were tested regularly to ensure the facility was virus- and pathogen-free.

### *Voluntary exercise paradigm*

The running wheels (ENV-044 Mouse Low-Profile Wireless Running Wheel, Med Associates Inc.; 15.5 cm circumference;  $25^\circ$  from horizontal plane) were located in the animal colony room inside cages of 19 cm high  $\times$  27 cm wide  $\times$  40 cm deep. Wheel-running activity was monitored through a wireless transmitter system by using a Hub ( $13.70 \times 15.25 \text{ cm}^2$ ) located in the same animal colony room. Revolutions were monitored continuously although voluntary activity occurred primarily during the dark phase.

Four-month-old mice were randomly divided into four groups (R1 sedentary, R1 running, P8 sedentary, and P8 running ( $n = 14/\text{group}$ ) and housed 2–3 mice per cage in plastic Macrolon colony boxes (15 cm high  $\times$  27 cm wide  $\times$  27 cm deep) with a sawdust floor. For 6 months, three alternate days a week (Monday–Wednesday–Friday or Tuesday–Thursday–Saturday), mice were individually accommodated in large cages containing only sawdust (sedentary groups) or sawdust with a running wheel available *ad libitum* for voluntary exercise (exercise groups)

### *Modified SHIRPA test*

The day before sacrifice, the degree of senescence was evaluated according to a modified SHIRPA Test [29]. The SHIRPA is a comprehensive assessment during which a total of nine separate measurements are recorded for each animal ( $n = 14/\text{group}$ ). The mice were first weighed, and evaluated for body position (0, active; 1, inactive or hyperactive), skin color (0, pink; 1, bleached or deep red), coat appearance (0, tidy; 1, irregularities), body tremor (0, absent; 1, present), eyes closure (0, open; 1, one closed; 2, both closed), lordokyphosis of the spine (0, absent;

1, present), and lacrimation (0, absent; 1, present). The statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 15.0). The non-parametric Mann-Whitney *U* test was applied to analyze the data. Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.

#### Brain processing and tissue harvesting

Animals were decapitated and brains were dissected on ice to obtain hippocampi which were immediately frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis ( $n = 7/\text{group}$ ).

For the immunohistochemistry studies, the animals were transcardially perfused with saline buffer ( $n = 7/\text{group}$ ). Brains were dissected, fixed in methacarn (60% methanol, 30% acetic acid, 10% chloroform), dehydrated, and embedded in paraffin wax. Microtome coronal sections of 20  $\mu\text{m}$  were made and brain slices containing the central zone of the hippocampus (bregma  $-2.30$  approximately) were selected for immunostaining.

#### Total RNA extraction and DNA microarray analysis

Total RNA was extracted using *mirVana*<sup>TM</sup> RNA Isolation Kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. The yield, purity, and quality of RNA were determined spectrophotometrically (NanoDrop, USA) and using the Bioanalyzer 2100 capillary electrophoresis. RNAs with 260/280 ratios and RIN higher than 1.9 and 7.5, respectively, were selected. Gene expression analysis in hippocampus from 10-month-old sedentary SAMR1 (R1sed), sedentary SAMP8 (P8sed), and exercised SAMP8 mice (P8run) were carried out with 4 $\times$ 44 K whole mouse genome microarrays (Agilent;  $n = 5/\text{group}$ ). Total RNA (500 ng) was labeled with Cy3 dye using the Quick Amp Labeling Kit, One-Color from Agilent. Fluorescently labeled samples were hybridized to the microarray slide with 60-mer probes. Hybridization and wash processes were performed according to the manufacturer's instructions, and hybridized microarrays were scanned using an Axon 4000B scanner. GenPix Pro 6.0 extraction software was used for the detection of signals.

Raw microarray data were deposited with GEO Accession Numbers GSE36571. The R Project for Statistical Computing (<http://www.r-project.org/>) and Perl Programming Language (<http://www.perl.org/>) were used to analyze the data considering the following

Table 1

List of primers and probe sets used for real time q-PCR analysis. TaqMan FAM-labeled specific probes, Applied Biosystems (ABI)

Target	Reference (ABI)	Ref Seq ID
Aldh1a2	Mm00501306.m1	NM_009022.4
Bdnf	Mm01334042.m1	NM_001048142.1
Col1a1	Mm00801666.g1	NM_007742.3
Col1a2	Mm00483888.m1	NM_007743.2
Fmod	Mm00491215.m1	NM_021355.3
Ptgds	Mm01330616.g1	NM_008963.2
Tbp	Mm00446971.m1	NM_013684.3
TrkB	Mm00435422.m1	NM_001025074.1, NM_008745.2
Vegfa	Mm01281449.m1	NM_001025250.3, NM_001110266.1, NM_001110267.1, NM_009505.4

analysis steps: Quality control of raw data (Imageplots, MAplots, Boxplots, Density Plots, Spike-Mix, Quality Filters, Pearson Cor. coef, HCL and PCA); Data filtering; Background correction and normalization; Quality control of normalized data. Background correction and normalization were done with Bioconductor's *limma* package using the method's "minimum" and "quantile" respectively [30].

The Venn diagram was generated from the lists of differentially expressed genes showing a fold change greater than 1.5 ( $\log_2 > |0.5849|$ ) and a *p* value  $< 0.05$  in the comparison "P8sed vs. R1sed" (putative aging genes) and in the comparison "P8run vs. P8sed" (putative exercise-modulated genes). The Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery (DAVID v6.7) bioinformatics program and the Gene Ontology (GO) database were used for functional pathway enrichment analysis of the genes grouped in the intersection of the Venn diagram. GO categories with *p* values and Benjamini adjustment  $< 0.05$  were considered statistically significant.

To validate the microarray data, real-time quantitative PCR was performed on the same RNA samples.

#### Real-time quantitative PCR

Random-primed cDNA synthesis was performed at  $37^{\circ}\text{C}$  starting with 0.3  $\mu\text{g}$  of RNA, using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems). Gene expression was measured in an ABI Prism 7900HT Real Time PCR system using TaqMan FAM-labeled specific probes (Applied Biosystems, Table 1). Results were normalized to *Tbp* gene expression. Transcript variant 4 (NM\_001048142.1) corresponding to exon V of BDNF gene was analyzed.



### Immunohistochemistry

Slides with brain sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in a graded series of ethanol solutions (100, 90, and 70%) and finally washed twice with PBS for 5 min. Then, brain sections were blocked and permeabilized with PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) for 20 min. After two 5-min washes in PBS, slides were incubated with the primary antibody, rabbit anti-laminin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA; dilution 1 : 100) overnight at 4°C. They were then washed again and incubated for 1 h at room temperature in the dark with the secondary antibody, AlexaFluor 546 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; dilution 1 : 250). Finally, slides were washed, mounted using Prolong Gold (Invitrogen) anti-fade medium, allowed to dry overnight at room temperature and stored at 4°C. Image acquisition was performed with a fluorescence laser microscope (BX41, Olympus, Germany). To quantify the area of the blood vessels (VA), images were analyzed with the open-source Fiji software. Briefly, in order to exclude incidental variations, CA1 picture from each animal ( $n=4$ , 13–15 slices/group) were taken, the images were binarized (vessels = black, background = white), a region of interest was set to include all the CA1 seen in the image and the positive black area was quantified. The positive black area corresponds to the positive laminin staining and is equivalent to the amount of vessel surface in the studied region.

## RESULTS

### Long-term exercise performance induces phenotypic improvements in old SAMP8 mice

We explored the effects of 6 months of voluntary wheel running in SAMP8 mice which were 10-month-old at the end of the training. Consistent with their accelerated aging phenotype, during the intervention SAMP8 mice displayed less exercise than SAMR1 control mice (Fig. 1A) and the mean number of wheel revolutions/week for the complete intervention was significantly lower in SAMP8 mice compared with SAMR1 controls (SAMR1 =  $74296 \pm 5590$ ; SAMP8 =  $56964 \pm 5186$ ; Fig. 1B).

Taking into account the advanced age of the SAMP8 mice upon completion of the long-term intervention, we analyzed the impact of the training on a set of phenotypic traits using a modified SHIRPA test, which evaluates different aging traits (i.e., skin color, coat

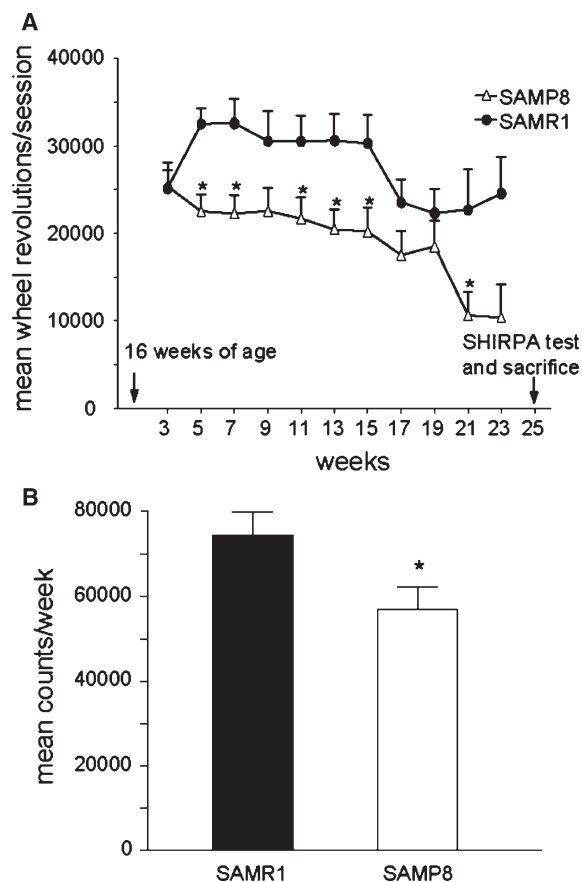


Fig. 1. Long-term exercise performance in SAMP8 and SAMR1 mice. Wheel-running activity was continuously monitored through a wireless transmitter during the 6-month intervention. A) Mean number of wheel revolutions per session was calculated as the total wheel revolutions per week/numbers of sessions of the week (ANOVA:  $F(1,26)=7.868$   $*p<0.01$ ). B) Mean number of wheel revolutions per week was calculated as the mean total wheel revolutions/total number of weeks ( $n=14$ /group;  $*p<0.05$  versus R1 run group).

appearance, body tremor, lacrimation, and others). Mean scores for lordokyphosis of the spine (hump), body tremor, and skin color were significantly higher in sedentary SAMP8 (P8sed) mice compared with sedentary SAMR1 controls (R1sed). While the lordokyphosis of the spine was not responsive to the intervention, exercise practice abolished the tremor signs in SAMP8 mice and beneficially influenced skin color aging signs in both groups (Fig. 2).

Another positive effect of the 6-month exercise intervention was the significant hippocampal revascularization in exercised SAMR1 and SAMP8 mice (Fig. 3A–E). Microscopic visualization of immunostained brain sections with laminin showed reduced blood vessel area in P8sed mice compared with R1sed animals (Fig. 3C versus A). Both groups of exercised

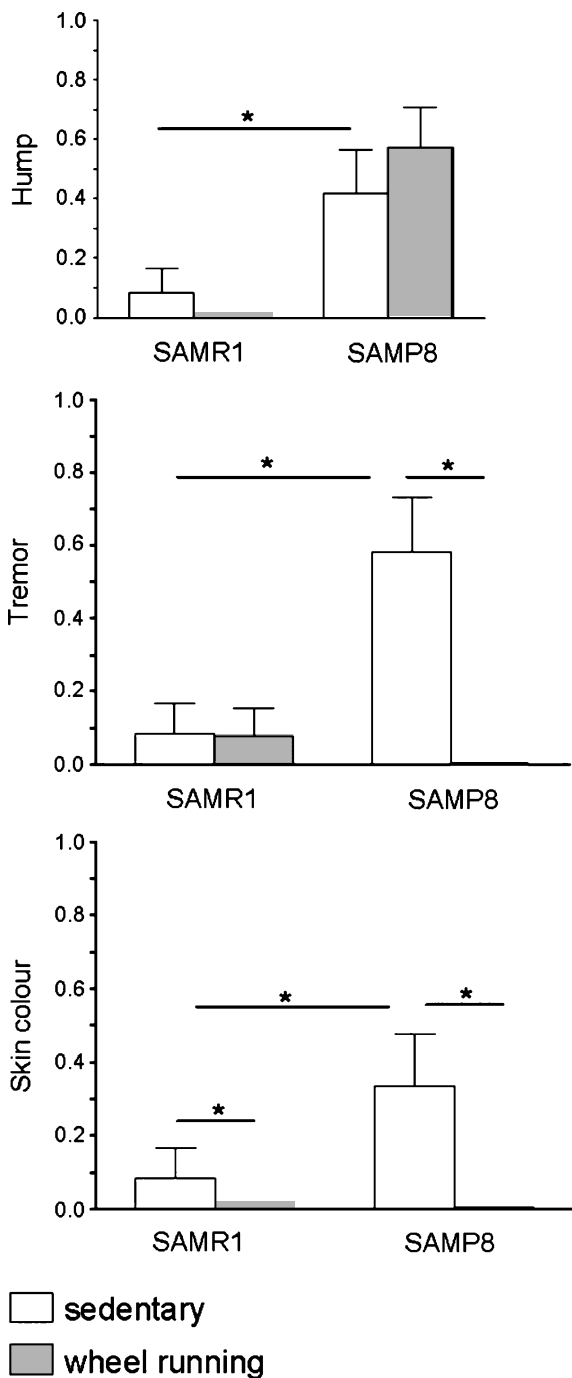


Fig. 2. Exercise delays aging traits in old SAMP8 mice. Mice were evaluated for aging-sensitive traits using the modified SHIRPA test. Higher scores correspond to more advanced age phenotypes. Traits showing significant basal differences between groups included: lordokyphosis of the spine (0, absent; 1, present), body tremor (0, absent; 1, present), and skin color (0, pink; 1, bleached or deep red). Total score was recorded as the sum of the scores for each of the categories (\* $p < 0.05$ ,  $n = 14$ /group; non-parametric Mann-Whitney  $U$  test).

mice exhibited enhanced vascularization compared with their respective age-matched sedentary controls (Fig. 3B versus A, and D versus C). Remarkably, the area of blood vessels in P8run mice was significantly higher than in R1sed mice and reached levels undistinguishable from those observed in R1run mice (Fig. 3D versus A and B, respectively). The effects of exercise on revascularization seem to be unrelated to VEGF expression which was significantly decreased in the SAMP8 mice but was not modified by the intervention in any group (Fig. 3F).

#### *Upregulation of Bdnf gene expression in hippocampus from old SAMP8 mice after long-term exercise training*

Bdnf upregulation is emerging as one of the most reproducible molecular outcomes of physical exercise in the rodent hippocampus [17]. Before performing the microarray studies, we further confirmed the efficacy of the long-term exercise intervention in old SAMP8 mice by examining Bdnf gene expression as well as the expression of its receptor TrkB. Both genes were found underexpressed in P8sed compared with R1sed mice (Fig. 4). After the exercise intervention, Bdnf gene expression was significantly upregulated in P8run mice (Fig. 4A). In contrast, TrkB gene expression showed no improvement after the exercise training (Fig. 4B). No effect of exercise was observed on Bdnf or TrkB genes in SAMR1 mice.

#### *Whole genome microarray analysis in hippocampus of old SAMP8 mice after long-term exercise training*

With the aim of identifying genes involved in brain aging and modulated by long-term voluntary exercise, we performed whole genome microarray studies in the hippocampus from sedentary SAMP8 (P8sed), sedentary SAMR1 (R1sed), and exercised SAMP8 (P8run) mice. We compared “P8sed vs. R1sed” in order to detect putative aging markers (A) and “P8run vs. P8sed” to detect genes modulated by exercise (B). For both comparisons, only genes differentially expressed with a fold change  $\geq 1.5$  and a  $p$  value  $< 0.05$  were included. Genes differentially expressed in A and B were integrated in a Venn diagram which yielded 34 genes in the intersection (Fig. 5). The overlap between the lists A and B was significant as revealed by Fisher’s exact test ( $p$ -value  $< 3 \times 10^{-16}$ ). These genes therefore met the criteria for putative aging genes modulated by exercise (Table 2).

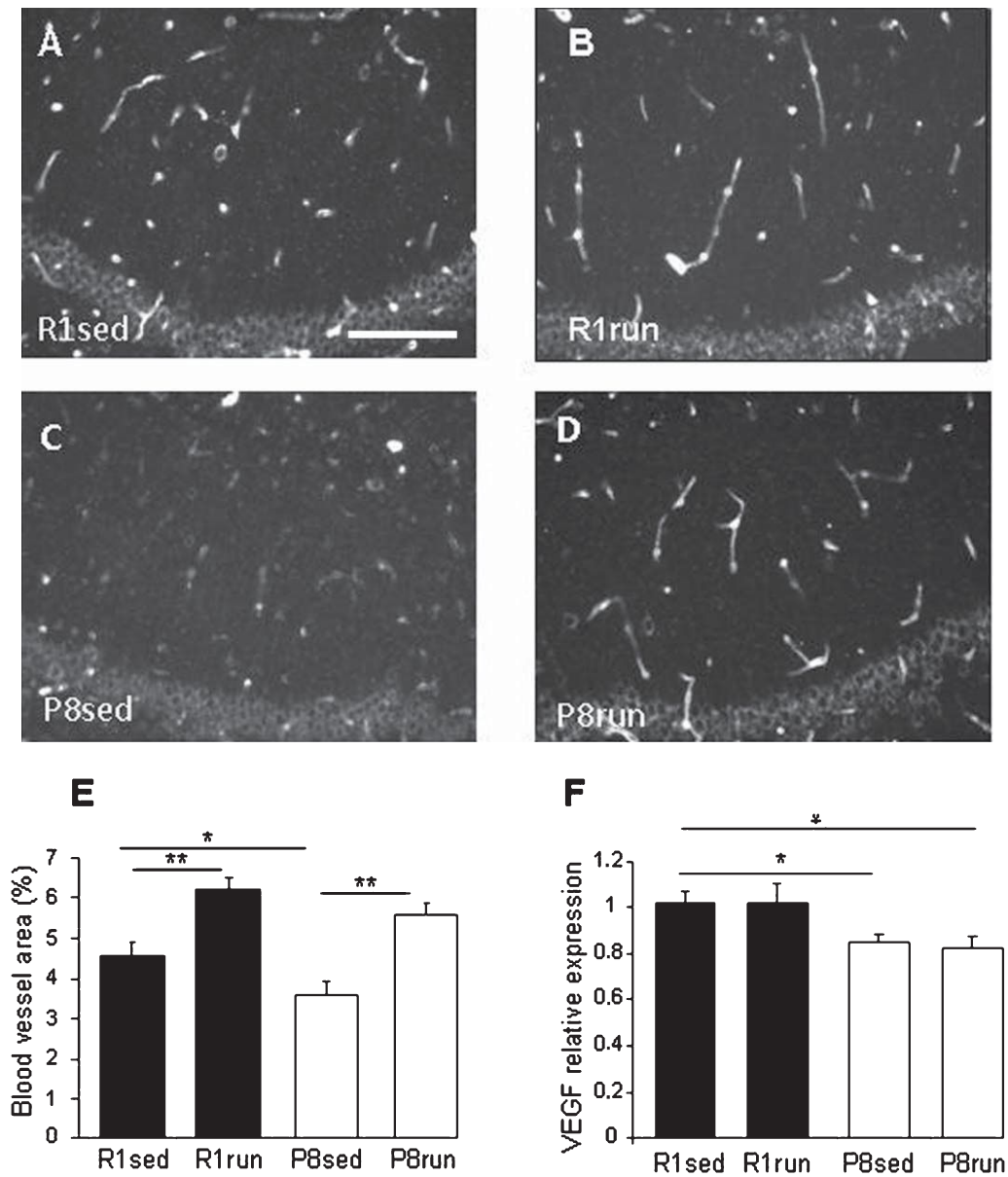


Fig. 3. Effects of 6 months of voluntary exercise on hippocampal vascularization in old SAMP8 mice. Hippocampal sections were incubated with the primary antibody rabbit anti-laminin (red) in sedentary SAMR1 (A, R1sed), SAMR1 (B, R1run), sedentary SAMP8 (C, P8sed), and exercised SAMP8 (D, P8run). Representative images are shown, scale bar: 100  $\mu$ m in all panels. E) Area of the blood vessels (VA) was quantified with the open-source Fiji software. F) Vegf gene expression was measured by real time quantitative PCR. \* $p < 0.05$  2 tail  $t$ -test; \*\*  $p < 0.005$  2 tail  $t$ -test ( $n = 4$ , 13–15 slices/group).

Pathway enrichment analysis of the genes listed in Table 2 was performed using the DAVID program and the Gene Ontology (GO) database. GO categories with  $p$  values and Benjamini adjustment  $< 0.05$  were considered statistically significant (Table 3A). We found that these genes were mainly clustered in functions associated with extracellular matrix maintenance. The

reported functions in the central nervous system of the genes included in the GO categories are listed in Table 3B [31–43].

Moreover, in accordance with the literature (see Discussion), functionally relevant genes identified through the microarray analysis were validated by real-time quantitative PCR assays, i.e., collagen type 1 alpha

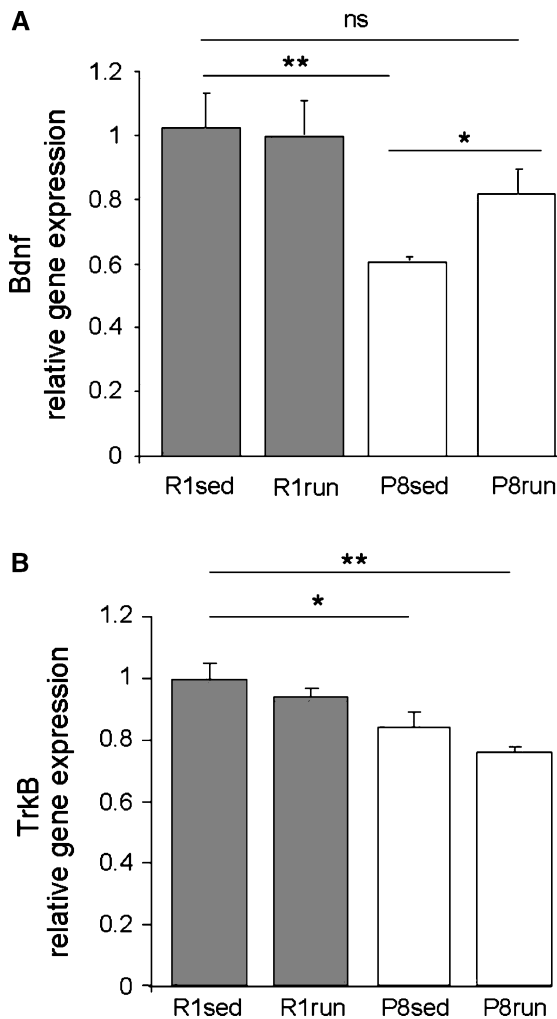


Fig. 4. Long-term voluntary exercise improves hippocampal Bdnf gene expression in old SAMP8 mice. Bdnf (A) and TrkB (B) gene expression was measured by real time quantitative PCR. Sed, sedentary mice; run, exercised mice (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , 2-tail  $t$ -test;  $n = 5$ /group).

1 (col1a1), collagen type 1 alpha 2 (col1a2), fibromodulin (fmod), prostaglandin D(2) synthase (ptgds), and aldehyde dehydrogenase (Aldh1a2) (Fig. 6). The solute carrier family 6 (GABA transporter) member 13 SLC6A13 and the Solute carrier family 47, member 1 (Slc47a1) followed the tendencies observed in the microarray studies but differences between groups did not reach statistical significance when checked by real time PCR (data not shown).

## DISCUSSION

Here we studied the effect of long-term voluntary exercise in a spontaneous mouse model of accelerated

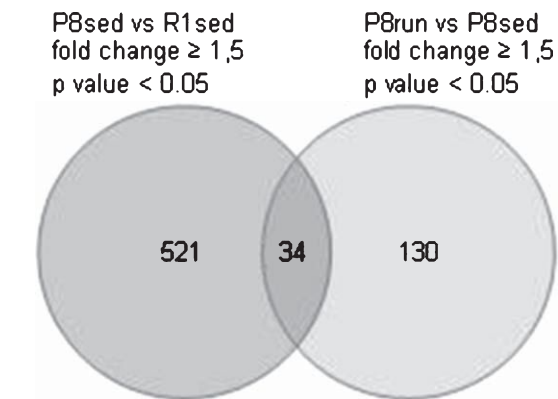


Fig. 5. Putative aging genes modulated by long-term voluntary exercise in hippocampus. Genes from the comparisons “P8sed vs. R1sed” (left circle) and “P8run vs. P8sed” (right circle) with both fold changes greater than 1.5 ( $\log_2 > |0.5849|$ ) and  $p$  value  $< 0.05$  were considered to be differentially expressed and were included in a Venn diagram. The intersection of circles corresponds to putative aging genes modulated by physical exercise.

aging, the SAMP8 mice. Previous reports have shown the SAMP8 mouse model is a suitable non-transgenic model for the study of many aspects of aging and AD [44, 45]. In the literature there is little information on the effects of exercise in female rodents although previous studies have described gender-dependent neuro-immuno-endocrine responses to physical training in AD mouse models [46, 47]. Moreover, marked sex differences have been described in the patterns of voluntary exercise in mice, females running faster and longer than males [48]. In this context, our data expand current knowledge on the molecular impact of physical exercise on brain aging in female mice.

The characteristics of the exercise protocol used here were selected (i) to analyze the effects of exercise as a continuous practice during adulthood and (ii) to avoid the deleterious effects of long-term isolation on cognitive impairment or cardiac autonomic dysregulation [49]. Indeed, upon completion of the long-term intervention, SAMP8 mice were at the final stage of their lives (10-month-old), considering that their median survival time is 40% shorter than that of SAMR1 mice (median life: 9.7 months and 16.3 months, SAMP8 and SAMR1, respectively; [28]). To avoid isolation, mice were housed in groups of 2–3 and individually placed 3 alternate days per week in a cage with a running wheel for voluntary exercise. In these conditions we found that 6 months of voluntary training on a running wheel improved aging traits such as skin color and body tremor of SAMP8 mice. Moreover, the intervention increased vascularization and modulated gene expression in the hippocampus.

Table 2

Putative aging genes sensitive to physical exercise in hippocampus. List of the differentially expressed genes from the comparisons “P8sed vs. R1sed” and “P8run vs. P8sed” with both fold changes greater than 1.5 ( $\log_2 > |0.5849|$ ) and  $p$  value  $< 0.05$  found in the intersection of the Venn diagram (Fig. 5). These genes represent putative aging genes sensitive to exercise

Gene symbol	Gene name	Primary Accession	P8FS vs R1FS		P8FR vs P8FS	
			Fold Change	$p$ -val	Fold Change	$p$ -val
Htr2b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	NM_008311	3,9	0.009	-4,0	0.008
Olfir470	olfactory receptor 470	NM_146425	3,9	0.000	-2,7	0.002
Fyb	FYN binding protein	AK038161	3,2	0.015	-2,7	0.038
Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2	NM_009022	3,0	0.000	-1,7	0.017
Defb1	defensin beta 1	NM_007843	2,9	0.005	-2,8	0.006
Col1a1	collagen, type I, alpha 1	NM_007742	2,6	0.000	-1,5	0.014
Slc6a13	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13	NM_144512	2,5	0.000	-1,6	0.035
Fmod	fibromodulin	NM_021355	2,4	0.000	-1,6	0.038
Tnn	tenascin N	NM_177839	2,4	0.003	-2,0	0.016
Ms4a4b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4B	NM_021718	2,3	0.000	-2,2	0.000
Pygl	liver glycogen phosphorylase	AK083075	2,3	0.001	-1,9	0.011
A230056P14Rik	RIKEN cDNA A230056P14 gene	NM_001033396	2,3	0.004	-2,0	0.017
Tbx15	T-box 15	NM_009323	2,2	0.018	-2,3	0.015
Fus	fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human)	AK038226	2,0	0.003	-2,0	0.004
Slc47a1	solute carrier family 47, member 1	NM_026183	2,0	0.000	-1,5	0.009
Col1a2	collagen, type I, alpha 2	NM_007743	2,0	0.000	-1,6	0.005
Fbxw14	F-box and WD-40 domain protein 14	NM_015793	1,9	0.043	-2,0	0.038
Ogn	osteoglycin	NM_008760	1,9	0.003	-1,9	0.002
Setd7	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7	NM_080793	1,9	0.026	-1,8	0.041
Mgp	matrix Gla protein	NM_008597	1,9	0.000	-1,5	0.006
Spp1	secreted phosphoprotein 1	NM_009263	1,8	0.017	-1,7	0.024
6430548G04	hypothetical protein 6430548G04	AK032445	1,7	0.007	-1,7	0.007
Gpr126	G protein-coupled receptor 126	NM_001002268	1,7	0.033	-1,7	0.030
Gpr182	G protein-coupled receptor 182	NM_007412	1,6	0.002	-1,5	0.005
Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)	NM_008963	1,5	0.045	-1,7	0.015
Pard3	par-3 (partitioning defective 3) homolog (C. elegans)	NM_001013581	-1,5	0.000	1,4	0.020
Nup205	nucleoporin 205	AK041272	-1,8	0.039	1,9	0.020
Gsbs	G substrate	AF071562	-1,8	0.030	2,4	0.002
Cftr	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	NM_021050	-2,2	0.006	1,7	0.008
Olfir1099	olfactory receptor 1099	NM_146768	-2,4	0.005	2,5	0.004
Tnks2	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP ribose polymerase 2	XM_001000101	-1,5	0.018	-1,5	0.012
Sp4	trans-acting transcription factor 4	NM_009239	-1,5	0.010	-1,5	0.013
Prmt1	protein arginine N-methyltransferase 1	NM_019830	-1,6	0.031	-1,8	0.004
Metrn	meteorin, glial cell differentiation regulator	NM_133719	-2,0	0.006	-2,3	0.001

It has recently been shown that in response to exercise the brain of middle-aged female mice appears to retain significant vascular plasticity [50]. Therefore, we used the blood vessel area as a readout to test the effectiveness of the exercise training. We observed that exercise training enhanced hippocampal vascularization both in SAMR1 and SAMP8 mice, suggesting that the intervention was effective. We also found a decreased blood vessel area in SAMP8 compared with SAMR1 mice. This result is consistent with other reports suggesting that vascularity may be reduced in

the AD brain. It has been shown that A $\beta$  peptides may have profound anti-angiogenic effects *in vitro* and *in vivo* [51] and that the overexpression of A $\beta$ PP in the vasculature may oppose angiogenesis [52]. However, the data in the literature regarding angiogenesis and AD are contradictory: for example, angiogenesis has been observed in AD-affected brain regions [53].

We also observed an upregulation in *Bdnf* gene expression in P8run mice, further supporting the notion that *Bdnf* upregulation is one of the most reproducible molecular outcomes of physical exercise in the rodent

Table 3

Functional analysis of aging genes modulated by physical exercise in hippocampus. A) The Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery (DAVID v6.7) bioinformatics program was used for functional annotation analysis of genes presented in Table 2. Only gene ontology categories presenting both  $p$  value < 0.05 and Benjamini adjustment < 0.05 are shown. Genes in Table 2 that did not reverse their expression pattern in response to exercise were not included in the DAVID analysis (last four genes in bold in Table 2). B) Reported role in the central nervous system of the genes included in the significant GO categories

A			
Category	Benjamini $p$ -value	Genes	
GO:0031012~ extracellular matrix	0.034	FMOD, OGN, COL1A2, TNN, COL1A1	
GO:0005584~ collagen type I	0.041	COL1A2, COL1A1	
GO:0005576~ extracellular region	0.041	FMOD, OGN, PTGDS, COL1A2, MGP, TNN, COL1A1, DEFB1, SPP1	
GO:0005578~ proteinaceous extracellular matrix	0.044	FMOD, OGN, COL1A2, TNN, COL1A1	
B			
Gene symbol	Primary accession	Gene name and reported role in CNS	References
Fmod	NM.021355	Fibromodulin. Regulation of collagen type I and type II and extracellular matrix organization. Downregulation in amygdala in an induced-depression mice model. Association with tumor progression and brain invasion in glioblastomas	[31, 32]
Ogn	NM.008760	Osteoglycin. Induction of bone formation in conjunction with TGF $\beta$ . Downregulation in amygdala in an induced-depression mice model	[31]
Ptgds	NM.008963	Prostaglandin D2 synthase. Neuromodulator and trophic factor in the central nervous system. Increment in cerebrospinal fluid (CSF) concentration in ageing. Up-regulated in central nervous diseases like attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and A	[33–35]
Col1a2	NM.007743	Collagen, type I, alpha 2 (fibrillar forming collagen). Increased in Abeta deposits in AD brains	[36]
Mgp	NM.008597	Matrix gla protein (MGP). Present in neurons (mainly expressed in the peripheral nervous system). Regulator of bone morphogenetic proteins (BMPs) in the vascular system. Increased levels associated with neuron vulnerability	[37]
Tnn	NM.177839	Tenascin N. Predominantly expressed in hippocampus adult neurons. Involvement in neurite outgrowth and cell migration. Possible contribution in synaptic modulation	[38]
Col1a1	NM.007742	Collagen, type I, alpha 1. Increased in Abeta deposits in AD brains	[36]
Defb1	NM.007843	Defensin beta 1. Cationic peptide expressed in CNS. Immunomodulator of adaptative and innate immune system. Hypothesised to be involved in CNS chronic disease-related neuropathological changes	[39,40]
Spp1	NM.009263	Secreted phosphoprotein 1. Extracellular matrix glycoprophosphoprotein. Roles in cell adhesion, chemotaxis, immune regulation, tumor cell metastasis and protection against apoptosis. Proinflammatory and subsequent neuroprotective roles in acute neuroinflammation	[41–43]

hippocampus (reviewed in [17]). Indeed, the upregulation of *Bdnf* gene in response to exercise was also recently reported in younger (2-month-old) male SAMP8 mice after four months of wheel running [54].

Once we confirmed the efficacy of the intervention, the objective of the microarray analysis was to identify

novel putative genes involved in hippocampus aging which could be beneficially influenced by long-term exercise practice.

In the last five years, several microarray studies have been performed in the SAMP8 mouse [1, 54–58]. Two of them are methodological studies which cannot be

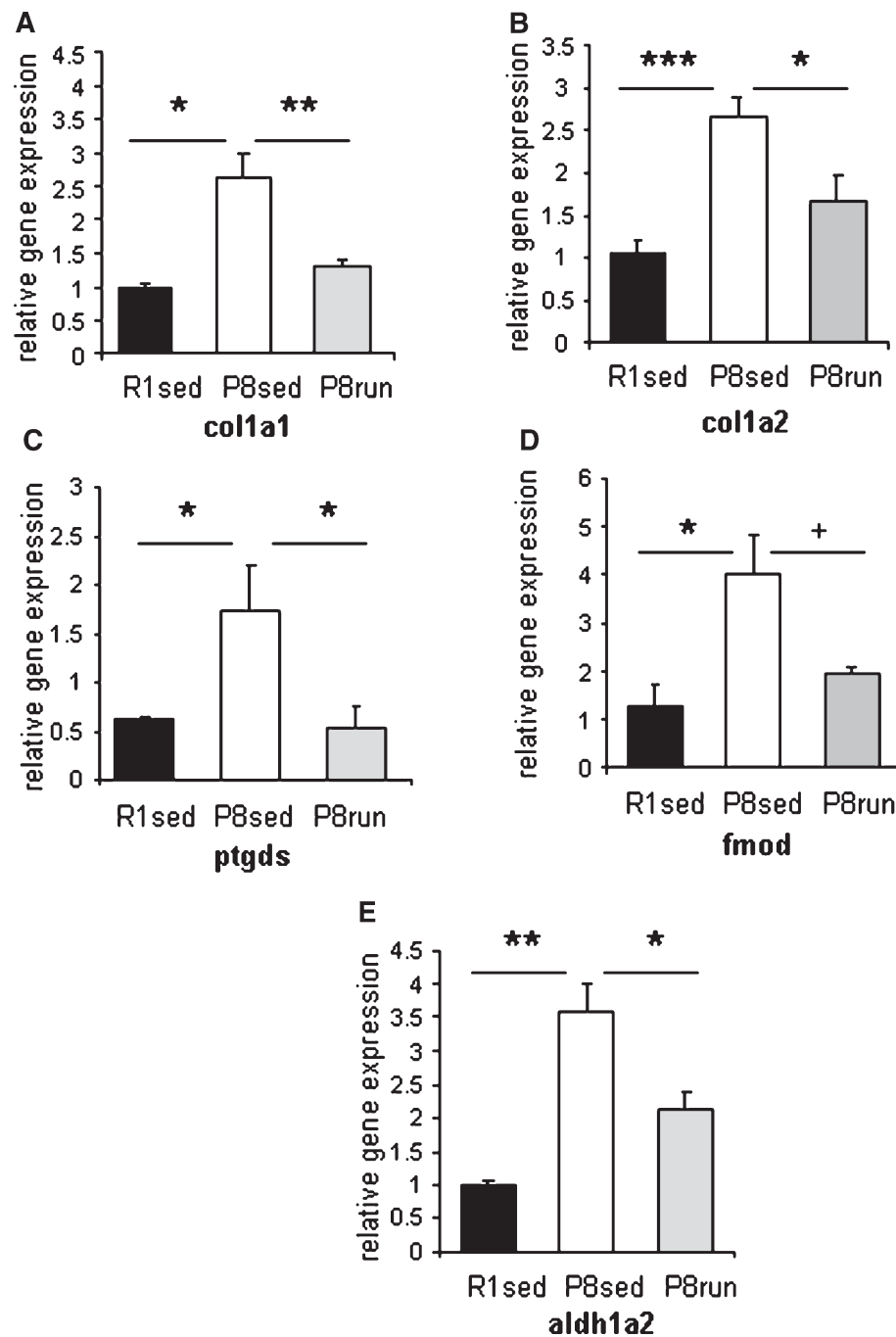


Fig. 6. Validation by Q-PCR of microarray-selected hippocampal aging genes modulated by long-term physical exercise. Genes from Table 2 were validated by real-time quantitative PCR in sedentary SAMP8 (P8sed), exercised SAMP8 mice (P8run), and sedentary SAMR1 (R1sed) mice. A) Col1a1, collagen, type I, alpha 1; B) collagen type 1 alpha 2 (col1a2); C) Ptgds, prostaglandin D2 synthase; (D) fibromodulin (fmod); and E) aldehyde dehydrogenase (Aldh1a2). (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; + $p = 0.06$ ; 2-tail  $t$ -test;  $n = 5$ /group).

related to our results [56, 59]. Two other studies did not include SAMR1 mice as control and so we cannot compare their data with our findings [55, 58].

Sakurai et al. [54] identified in young (2-month-old) male SAMP8 mice an increase in the expression of the leucine zipper transcription factor-like protein

1 (*Lztf1*) levels after four months of wheel running. However, in 12-month-old mice, we did not observe any effect of exercise in the expression of *Lztf1* in SAMP8 mice. The study by Cheng et al. [57] analyzed microarray expression profiles in the hippocampus of 12-month-old male SAMP8 and SAMR1 mice. In agreement with our study in females, they detected the down-regulation of *Dusp12* (Dual specificity protein phosphatase 12) in the SAMP8 hippocampus. Recent evidence suggests that this enzyme plays a role in cell survival and ribosome biogenesis [60]. We did not detect any change in *Dusp12* gene expression in response to exercise. Finally, using microarray analysis, Casadesús et al. [61] compared the expression of 62 genes involved in different signaling pathways such as oxidative stress, mitochondrial-related apoptosis, and cell cycle, in the hippocampus of 3-, 6-, and 9-months-old male SAMP8 and SAMR1 mice, and found no differences between strains at any of the ages analyzed. Of these 62 genes, we found that, compared with SAMR1 mice, female SAMP8 mice presented a down-regulation in *Park2* gene (*Park2* is an E3 ubiquitin ligase that regulates systemic lipid metabolism and is defective in early onset Parkinson's disease patients [62]) and an upregulation of the *Gfra1* gene (*Gfra1* gene encodes the glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor  $\alpha$ -1, GFR  $\alpha$ -1, which has been reported to be beneficial for the survival of hippocampal neurons [63]). However, the expression levels of these genes were not modulated by exercise.

Regarding proteomic studies using SAMP8 mice, Zhu et al. [64] analyzed hippocampus and cortex of 5- and 15-month-old male SAMP8 and SAMR1 mice. In agreement with their findings, we found a down-regulation *Uchl3* (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3) and a down-regulation of *Hebp1* in female SAMP8 hippocampus compared with SAMR1 mice, although exercise did not modify their expression levels. Interestingly, another proteomic study reported a down regulation of *Uchl3* in the SAMP8 hippocampus at six months [65], strongly suggesting that lower expression of *Uchl3* is a distinctive feature of the SAMP8 hippocampus and may be associated with the pathological phenotype of these mice.

Differences in the profiling platforms used, in the animal sex and age, and/or in the intervention designs are some of the factors that could explain the low agreements between our study and the cited reports. Moreover, the limitations of the microarray technique are highlighted by the observation that in response to exercise we have found an upregulation of *BDNF* gene

expression by real time PCR but not by microarray analysis.

In this study, we found 34 genes in hippocampus that met our criteria for aging genes sensitive to physical exercise. Gene ontology analysis revealed that long-term physical exercise modulated pathways mainly involved in extracellular matrix (ECM) maintenance in hippocampus. Interestingly, the ECM not only provides physical support for neuronal function and survival but also plays a crucial homeostatic role [66] and changes in ECM components have been described as pathological features of AD [66, 67]. In this context, our data suggest that physical exercise may counteract at least in part such processes in early-stage AD.

Although the relevance of microarray findings will require further characterization, based on the previous literature some inferences about their functional significance can be made. Our microarray studies in hippocampus showed increased expression of the collagen type 1 alpha 1 (*col1a1*) and alpha 2 (*col1a2*) genes in SAMP8 mice compared with controls and a decrease in their expression levels in response to exercise. These effects were confirmed by quantitative real-time PCR. Interestingly, the 3xTg-AD transgenic mouse model presents a 20% increase in brain collagen content compared with controls and a significant vascular volume reduction in the hippocampus, but not in the frontal cortex or cerebellum [36]. These results are of particular interest since A $\beta$ PP can physically interact with many different collagen and extracellular matrix components and because other forms of collagen (e.g., XXV and XVIII) have been found in amyloid plaques [68, 69]. Another gene beneficially modulated by exercise in SAMP8 hippocampus was the prostaglandin D(2) synthase (*Pgds*). *Pgds* is expressed in astrocytes and oligodendrocytes [70] and has been proposed as a biomarker of aging in cerebrospinal fluid [33]. Using real-time PCR, we also validated the beneficial effect of exercise on fibromodulin gene expression (*Fmod*) in SAMP8 mice. *Fmod* is a proteoglycan component involved in the regulation and assembly of extracellular matrix organization. It has been associated with brain tumor progression in glioblastomas [32] and there is growing evidence that keratan sulfate proteoglycans enhance A $\beta$  aggregation and senile plaques formation in the pathogenesis of AD [71]. Finally, exercise also restored gene expression of the aldehyde dehydrogenase *Aldh1a2* in the SAMP8 hippocampus. *Aldh1a2* is the rate-limiting retinoic acid-synthesizing enzyme and it has been reported that both decreased [72] and increased [73] retinoic acid levels in the hippocampus lead to



impaired neurogenesis and performance in cognitive tasks.

In summary, our study identifies new candidate aging genes in the hippocampus which are sensitive to physical exercise, and suggests that an active lifestyle during adulthood may promote a healthier aging in at-risk populations by preventing or reversing senescent signs in the brain.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant SAF2010-15050 (PK) from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN); DPS2008-06998-C01,02 (MPallas and RME) and by grants PI080400 from the Fondo de Investigación Sanitaria and the Instituto de Salud Carlos III (AC), BFU2009-09988/BMC (MParrizas), SAF-2009-13093 (MPallas) from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN). We thank the Catalan Government (Generalitat de Catalunya) for their support (2009/SGR00853) (PK). J.F.L. and M.J.A.L. received a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2011). We thank Sergi Beltran Agulló from the Bioinformatics Analysis Group (CNAG – National Center for Genomic Analysis) for statistical analysis of microarray data.

Authors' disclosures available online (<http://www.j-alz.com/disclosures/view.php?id=1548>).

## REFERENCES

- [1] (2011) Global status report on noncommunicable diseases 2010, World Health Organisation, [http://www.who.int/nmh/publications/ncd\\_report2010/en/index.html](http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/index.html), 2011.
- [2] Bassuk SS, Manson JE (2010) Physical activity and cardiovascular disease prevention in women: A review of the epidemiologic evidence. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **20**, 467-473.
- [3] Kokkinos P, Myers J (2010) Exercise and physical activity: Clinical outcomes and applications. *Circulation* **122**, 1637-1648.
- [4] Metkus TS, Baughman KL, Thompson PD (2010) Exercise prescription and primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* **121**, 2601-2604.
- [5] Mobius-Winkler S, Linke A, Adams V, Schuler G, Erbs S (2010) How to improve endothelial repair mechanisms: The lifestyle approach. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **8**, 573-580.
- [6] Bianchi G, Rossi V, Muscari A, Magalotti D, Zoli M (2008) Physical activity is negatively associated with the metabolic syndrome in the elderly. *QJM* **101**, 713-721.
- [7] Colberg SR (2007) Physical activity, insulin action, and diabetes prevention and control. *Curr Diabetes Rev* **3**, 176-184.
- [8] Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA (2007) Exercise builds brain health: Key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* **30**, 464-472.
- [9] Horton ES (2009) Effects of lifestyle changes to reduce risks of diabetes and associated cardiovascular risks: Results from large scale efficacy trials. *Obesity (Silver Spring)* **17**(Suppl 3), S43-S48.
- [10] Saraceni C, Broderick TL (2007) Cardiac and metabolic consequences of aerobic exercise training in experimental diabetes. *Curr Diabetes Rev* **3**, 75-84.
- [11] Zanuso S, Jimenez A, Pugliese G, Corigliano G, Balducci S (2010) Exercise for the management of type 2 diabetes: A review of the evidence. *Acta Diabetol* **47**, 15-22.
- [12] Deslandes A, Moraes H, Ferreira C, Veiga H, Silveira H, Mouta R, Pompeu FA, Coutinho ES, Laks J (2009) Exercise and mental health: Many reasons to move. *Neuropsychobiology* **59**, 191-198.
- [13] Erickson KI, Kramer AF (2009) Aerobic exercise effects on cognitive and neural plasticity in older adults. *Br J Sports Med* **43**, 22-24.
- [14] Rolland Y, Abellan van Kan G, Vellas B (2010) Healthy brain aging: Role of exercise and physical activity. *Clin Geriatr Med* **26**, 75-87.
- [15] van Praag H (2009) Exercise and the brain: Something to chew on. *Trends Neurosci* **32**, 283-290.
- [16] Archer T (2011) Physical exercise alleviates debilities of normal aging and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* **123**, 221-238.
- [17] Kaliman P, Parrizas M, Lalanza JF, Camins A, Escorihuela RM, Pallas M (2011) Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process. *Ageing Res Rev* **10**, 475-486.
- [18] Bekinschtein P, Oomen CA, Saksida LM, Bussey TJ (2011) Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Semin Cell Dev Biol* **22**, 536-542.
- [19] Christie BR, Eadie BD, Kannangara TS, Robillard JM, Shin J, Titterness AK (2008) Exercising our brains: How physical activity impacts synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Neuromolecular Med* **10**, 47-58.
- [20] van Praag H (2008) Neurogenesis and exercise: Past and future directions. *Neuromolecular Med* **10**, 128-140.
- [21] Yau SY, Lau BW, So KF (2011) Adult hippocampal neurogenesis: A possible way how physical exercise counteracts stress. *Cell Transplant* **20**, 99-111.
- [22] Garcia-Mesa Y, Lopez-Ramos JC, Gimenez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, Laferla FM, Cristofol R, Delgado-Garcia JM, Sanfeliu C (2011) Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis* **24**, 421-454.
- [23] Kohman RA, Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Kelley KW, Dantzer R, Rhodes JS (2011) Voluntary wheel running reverses age-induced changes in hippocampal gene expression. *PLoS One* **6**, e22654.
- [24] Parachikova A, Nichol KE, Cotman CW (2008) Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *Neurobiol Dis* **30**, 121-129.
- [25] Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K (1991) Senescence-accelerated mouse (SAM): A novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* **39**, 911-919.
- [26] del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Pallas M, Camins A, Vilaplana J, Pelegri C (2011) Cerebral amyloid angiopathy, blood-brain barrier disruption and amyloid accumulation in SAMP8 mice. *Neurodegener Dis* **8**, 421-429.
- [27] Morley JE, Armbrrecht HJ, Farr SA, Kumar VB (2012) The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 650-656.

- [28] Takeda T (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* **34**, 639-659.
- [29] Rogers DC, Peters J, Martin JE, Ball S, Nicholson SJ, Witherden AS, Hafezparast M, Latcham J, Robinson TL, Quilter CA, Fisher EM (2001) SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: Validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett* **306**, 89-92.
- [30] Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3.
- [31] Jung S, Lee Y, Kim G, Son H, Lee DH, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Kim HJ (2012) Decreased expression of extracellular matrix proteins and trophic factors in the amygdala complex of depressed mice after chronic immobilization stress. *BMC Neurosci* **13**, 58.
- [32] Colin C, Baeza N, Bartoli C, Fina F, Eudes N, Nanni I, Martin PM, Ouafik L, Figarella-Branger D (2006) Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using Suppression Subtractive Hybridization. *Oncogene* **25**, 2818-2826.
- [33] Chen CP, Chen RL, Preston JE (2009) Age-related increase of prostaglandin D(2) synthase concentration and glycation in ovine cerebrospinal fluid. *Exp Gerontol* **44**, 639-645.
- [34] Marin-Mendez JJ, Patino-Garcia A, Segura V, Ortuno F, Galvez MD, Soutullo CA (2012) Differential expression of prostaglandin D2 synthase (PTGDS) in patients with attention deficit-hyperactivity disorder and bipolar disorder. *J Affect Disord* **138**, 479-484.
- [35] Lovell MA, Lynn BC, Xiong S, Quinn JF, Kaye J, Markesbery WR (2008) An aberrant protein complex in CSF as a biomarker of Alzheimer disease. *Neurology* **70**, 2212-2128.
- [36] Bourasset F, Ouellet M, Tremblay C, Julien C, Do TM, Oddo S, LaFerla F, Calon F (2009) Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **56**, 808-813.
- [37] Santa-Maria I, Avila J, Rabano A (2010) Differential gene expression analysis of human entorhinal cortex support a possible role of some extracellular matrix proteins in the onset of Alzheimer disease. *Neurosci Lett* **468**, 225-228.
- [38] Neidhardt J, Fehr S, Kutsche M, Lohler J, Schachner M (2003) Tenascin-N: Characterization of a novel member of the tenascin family that mediates neurite repulsion from hippocampal explants. *Mol Cell Neurosci* **23**, 193-209.
- [39] Hao HN, Zhao J, Lotoczky G, Grever WE, Lyman WD (2001) Induction of human beta-defensin-2 expression in human astrocytes by lipopolysaccharide and cytokines. *J Neurochem* **77**, 1027-1035.
- [40] Williams WM, Castellani RJ, Weinberg A, Perry G, Smith MA (2012) Do beta-defensins and other antimicrobial peptides play a role in neuroimmune function and neurodegeneration? *ScientificWorldJournal* **2012**, 905785.
- [41] Shin T (2012) Osteopontin as a two-sided mediator in acute neuroinflammation in rat models. *Acta Histochem* **114**, 749-754.
- [42] Braitch M, Constantinescu CS (2010) The role of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and multiple sclerosis (MS). *Inflamm Allergy Drug Targets* **9**, 249-256.
- [43] Tsai WC, Lee HS, Lin CK, Chen A, Nieh S, Ma HI (2012) The association of osteopontin and LMX1A expression with World Health Organization grade in meningiomas and gliomas. *Histopathology* **61**, 844-856.
- [44] Morley JE, Farr SA, Kumar VB, Armbricht HJ (2012) The SAMP8 mouse: A model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* **18**, 1123-1130.
- [45] Pallas M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G (2008) From aging to Alzheimer's disease: Unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* **15**, 615-624.
- [46] Gimenez-Llort L, Arranz L, Mate I, De la Fuente M (2008) Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunomodulation* **15**, 331-343.
- [47] Gimenez-Llort L, Garcia Y, Buccieri K, Revilla S, Sunol C, Cristofol R, Sanfeliu C (2010) Gender-specific neuroimmunoendocrine response to treadmill exercise in 3xTg-AD Mice. *Int J Alzheimers Dis* **2010**, 128354.
- [48] De Bono JP, Adlam D, Paterson DJ, Channon KM (2006) Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R926-R934.
- [49] Norman GJ, Zhang N, Morris JS, Karelina K, Berntson GG, DeVries AC (2010) Social interaction modulates autonomic, inflammatory, and depressive-like responses to cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16342-16347.
- [50] Latimer CS, Searcy JL, Bridges MT, Brewer LD, Popovic J, Blalock EM, Landfield PW, Thibault O, Porter NM (2011) Reversal of glial and neurovascular markers of unhealthy brain aging by exercise in middle-aged female mice. *PLoS One* **6**, e26812.
- [51] Paris D, Townsend K, Quadros A, Humphrey J, Sun J, Brem S, Wotoczek-Obadia M, DelleDonne A, Patel N, Obregon DF, Crescentini R, Abdullah L, Coppola D, Rojiani AM, Crawford F, Sebt SM, Mullan M (2004) Inhibition of angiogenesis by Abeta peptides. *Angiogenesis* **7**, 75-85.
- [52] Paris D, Patel N, DelleDonne A, Quadros A, Smeed R, Mullan M (2004) Impaired angiogenesis in a transgenic mouse model of cerebral amyloidosis. *Neurosci Lett* **366**, 80-85.
- [53] Desai BS, Schneider JA, Li JL, Carvey PM, Hendey B (2009) Evidence of angiogenic vessels in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **116**, 587-597.
- [54] Sakurai T, Ogasawara J, Kizaki T, Ishibashi Y, Fujiwara T, Akagawa K, Izawa T, Oh-ishi S, Haga S, Ohno H (2011) Involvement of leucine zipper transcription factor-like protein 1 (Lztl1) in the attenuation of cognitive impairment by exercise training. *Biochem Biophys Res Commun* **416**, 125-129.
- [55] Chen SC, Lu G, Chan CY, Chen Y, Wang H, Yew DT, Feng ZT, Kung HF (2010) Microarray profile of brain aging-related genes in the frontal cortex of SAMP8. *J Mol Neurosci* **41**, 12-16.
- [56] Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX (2006) [Preparation of the cDNA microarray on the differential expressed cDNA of senescence-accelerated mouse's hippocampus]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **22**, 457-464.
- [57] Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX, Zhou DS, Yang RF, Chen LF (2007) Differential gene expression profiles in the hippocampus of senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* **28**, 497-506.
- [58] Zheng Y, Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX (2008) Gene expression patterns of hippocampus and cerebral cortex of senescence-accelerated mouse treated with Huang-Lian-Jie-Du decoction. *Neurosci Lett* **439**, 119-124.
- [59] Greenhall JA, Zapala MA, Caceres M, Libiger O, Barlow C, Schork NJ, Lockhart DJ (2007) Detecting genetic variation in microarray expression data. *Genome Res* **17**, 1228-1235.

- [60] Kozarova A, Hudson JW, Vaccratsis PO (2011) The dual-specificity phosphatase hYVH1 (DUSP12) is a novel modulator of cellular DNA content. *Cell Cycle* **10**, 1669-1678.
- [61] Casadesus G, Gutierrez-Cuesta J, Lee HG, Jimenez A, Tajés M, Ortuno-Sahagun D, Camins A, Smith MA, Pallas M (2012) Neuronal cell cycle re-entry markers are altered in the senescence accelerated mouse P8 (SAMP8). *J Alzheimers Dis* **30**, 573-583.
- [62] Kim KY, Stevens MV, Akter MH, Rusk SE, Huang RJ, Cohen A, Noguchi A, Springer D, Bocharov AV, Eggerman TL, Suen DF, Youle RJ, Amar M, Remaley AT, Sack MN (2011) Parkin is a lipid-responsive regulator of fat uptake in mice and mutant human cells. *J Clin Invest* **121**, 3701-3712.
- [63] Wang W, Redecker C, Bidmon HJ, Witte OW (2004) Delayed neuronal death and damage of GDNF family receptors in CA1 following focal cerebral ischemia. *Brain Res* **1023**, 92-101.
- [64] Zhu L, Yu J, Shi Q, Lu W, Liu B, Xu S, Wang L, Han J, Wang X (2011) Strain- and age-related alteration of proteins in the brain of SAMP8 and SAMR1 mice. *J Alzheimers Dis* **23**, 641-654.
- [65] Wang Q, Liu Y, Zou X, An M, Guan X, He J, Tong Y, Ji J (2008) The hippocampal proteomic analysis of senescence-accelerated mouse: Implications of Uchl3 and mitofilin in cognitive disorder and mitochondria dysfunction in SAMP8. *Neurochem Res* **33**, 1776-1782.
- [66] Bonneh-Barkay D, Wiley CA (2009) Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathol* **19**, 573-585.
- [67] Caltagarone J, Jing Z, Bowser R (2007) Focal adhesions regulate Abeta signaling and cell death in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 438-445.
- [68] Hashimoto T, Wakabayashi T, Watanabe A, Kowa H, Hosoda R, Nakamura A, Kanazawa I, Arai T, Takio K, Mann DM, Iwatsubo T (2002) CLAC: A novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *EMBO J* **21**, 1524-1534.
- [69] van Horssen J, Wilhelmus MM, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Wesseling P, de Waal RM, Verbeek MM (2002) Collagen XVIII: A novel heparan sulfate proteoglycan associated with vascular amyloid depositions and senile plaques in Alzheimer's disease brains. *Brain Pathol* **12**, 456-462.
- [70] Urade Y, Hayaishi O (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 259-271.
- [71] Ariga T, Miyatake T, Yu RK (2010) Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related disorders: Amyloidogenesis and therapeutic strategies—a review. *J Neurosci Res* **88**, 2303-2315.
- [72] Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL, Shi Y, DeLuca LM, Gage FH, Evans RM (2006) Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3902-3907.
- [73] Hsiao YH, Kuo JR, Chen SH, Gean PW (2012) Amelioration of social isolation-triggered onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficit by N-acetylcysteine in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* **45**, 1111-1120.



### **III**

**Alteraciones epigenéticas en hipocampo de ratones SAMP8 y su modulación tras una intervención de ejercicio físico voluntario**



---

Los resultados presentados en este capítulo se incluyen en siguiente artículo publicado:

**Epigenetic alterations in hippocampus of SAMP8 senescent mice and modulation by voluntary physical exercise**

*Frontiers in Aging Neuroscience*, 6 (2014)

Marta Cosín-Tomás\*, **María J Alvarez-López\***, Sandra Sanchez-Roig, Jaume F. Lanza, Sergi Bayod, Coral Sanfeliu, Merce Pallàs, Rosa María Escorihuela y Perla Kaliman.

\*Co-primeras autoras.

Contribución (MJA-L): Purificación de ARN y estudios de expresión génica por Real Time PCR, análisis estadístico, participación en la interpretación de resultados y en la elaboración del manuscrito.

## RESUMEN

Durante el proceso de envejecimiento y la aparición de patologías asociadas al mismo se ha detectado la presencia de alteraciones y modificaciones epigenéticas [42, 729]. Entre ellas destacan los cambios de expresión de ARNs no codificantes denominados microARNs [730-732]. Por otro lado, las modificaciones de histonas, y en concreto la alteración de patrones de acetilación de histonas, también parece tener un papel relevante en patologías asociadas al envejecimiento [445, 733-735]. Por ello, nos propusimos identificar marcadores epigenéticos potenciales implicados en el proceso de envejecimiento y EA, y su posible modulación tras dos meses de ejercicio físico moderado utilizando en modelo de ratones SAMP8 y su control SAMR1.

Nuestros datos identificaron varios factores epigenéticos alterados en hipocampo de animales SAMP8 algunos de los cuales respondieron a la intervención de ejercicio físico, incluyendo microARNs e histonas deacetilasas alterados en la enfermedad de Alzheimer.

## PRINCIPALES RESULTADOS

### **4.3.9. 3.1. Efectos positivos de una intervención de dos meses de ejercicio físico moderado en el modelo de envejecimiento acelerado SAMP8**

Con el objetivo de confirmar la eficacia de la intervención de ejercicio físico, analizamos varios factores que han sido previamente identificados como modulables al ejercicio físico en roedores (por ejemplo niveles en plasma de IGF1 o expresión génica de *Bdnf* en hipocampo) [720].

En concordancia con dichos estudios, tras 2 meses de ejercicio observamos un incremento en los niveles de IGF1 en plasma en ambas cepas, SAMR1 y SAMP8 (Fig 1E del artículo 3). Por su parte, como demostramos en nuestro estudio previo (ver Artículo 2) *Bdnf* presentó niveles reducidos en los ratones SAMP8 sedentarios que aumentaron significativamente tras la intervención de ejercicio físico. Observamos un incremento en la expresión de *Bdnf* y *Trkb* en respuesta al ejercicio en ambas cepas, confirmando la eficiencia de la intervención (Fig 1F-G del artículo 3).



Neuritina (*Nrn1*), un gen diana de la vía de *Bdnf* implicado en supervivencia neuronal y neurogénesis [736], también aumentó su expresión tras 8 semanas de ejercicio voluntario en ambas cepas, SAMR1 y SAMP8.

**3.2. Alteraciones de expresión en microARNs y modificaciones de histonas** (esta parte del trabajo fue realizada por MC-T como parte de su tesis doctoral, con la participación de MJA-L en la obtención de tejidos, purificación de RNAs, colaboración en los ensayos de arrays de expresión génica de miRNAs y participación en interpretación de resultados)

Identificamos 21 microARNs, asociados a enfermedades neurológicas o implicados en desarrollo neuronal, alterados en la cepa senescente SAMP8 respecto a su control SAMR1 en condiciones sedentarias. Entre ellos, tres resultaron sensibles al ejercicio físico. También identificamos 4 microARNs expresados de manera similar entre SAMP8 y SAMR1 que respondieron al ejercicio físico en ambas cepas (Tabla 2 del artículo 3). Es interesante remarcar que la mayoría de estos microARNs se han descrito alterados en personas afectadas por la enfermedad de Alzheimer.

Por último, en este trabajo se observó una reducción en la expresión de las deacetilasas *Sirt1*, *Hdac5* y *Hdac6* en la cepa senescente respecto a su control SAMR1. Las deacetilasas *Hdac5* y *Hdac3* se vieron moduladas por el ejercicio, correlacionando inversamente ésta última con el aumento de acetilación asociado al ejercicio hallado en histonas H3 de los ratones SAMP8 (Fig 3 del artículo 3).

## CONCLUSIONES

En este trabajo hemos explorado los cambios epigenéticos presentes en hipocampo de ratones SAMP8 y su modulación mediante una intervención de 2 meses de ejercicio físico moderado y voluntario. Se han descrito alteraciones en la expresión de factores neurotróficos, microARNs, deacetilasas de histonas y los niveles de acetilación global en histona 3.

Algunos de los cambios detectados en respuesta al ejercicio (aumento de *Trkb* y *Nrn1* en hipocampo) no se observaron en nuestro trabajo previo (ver Artículo 2), sugiriendo que la modulación por ejercicio físico de estos genes, depende en gran medida del tipo y duración de la intervención. Por otro lado, nuestros resultados confirman que el factor neurotrófico *Bdnf* es un excelente marcador de los efectos positivos del ejercicio físico sobre el cerebro, como mejoras en aprendizaje y memoria, en procesos de neurogénesis y plasticidad sináptica.

Nuestro trabajo muestra algunas alteraciones epigenéticas en hipocampo de ratones SAMP8 que son comunes a las halladas en personas humanas que sufren enfermedad de Alzheimer, apoyando el uso de este modelo en futuros estudios sobre vías epigenéticas relacionadas con la aparición y progresión de esta enfermedad. Estos datos reflejan el impacto positivo del ejercicio físico en la reversión de ciertas alteraciones epigenéticas y transcripcionales asociadas a envejecimiento.

Actualmente se acepta que la actividad física moderada es una estrategia de promoción del envejecimiento saludable. En este contexto, nuestro estudio contribuye a entender los mecanismos subyacentes e indica que el ejercicio físico también podría representar un complemento terapéutico en patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.



# Epigenetic alterations in hippocampus of SAMP8 senescent mice and modulation by voluntary physical exercise

Marta Cosín-Tomás<sup>1,2†</sup>, María J. Alvarez-López<sup>1,2†</sup>, Sandra Sanchez-Roige<sup>3</sup>, Jaume F. Lanza<sup>3</sup>, Sergi Bayod<sup>1</sup>, Coral Sanfeliu<sup>2</sup>, Merce Pallàs<sup>1</sup>, Rosa M. Escorihuela<sup>3</sup> and Perla Kaliman<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Unitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia Institut de Biomedicina Universitat de Barcelona (IBUB), Nucli Universitari de Pedralbes, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal, Facultad de Medicina, Instituto de Neurociencias, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

## Edited by:

Rodrigo Orlando Kuljiš, Zdrav Mozak Limitada, Chile

## Reviewed by:

Ángel M. Carrión, Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, Spain  
Diego Ruano, University of Sevilla, Spain

## \*Correspondence:

Perla Kaliman, Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Rosselló 161, E-08036 Barcelona, Spain  
e-mail: pkaliman@ub.edu

<sup>†</sup> These authors have contributed equally to this work.

The senescence-accelerated SAMP8 mouse model displays features of cognitive decline and Alzheimer's disease. With the purpose of identifying potential epigenetic markers involved in aging and neurodegeneration, here we analyzed the expression of 84 mature miRNAs, the expression of histone-acetylation regulatory genes and the global histone acetylation in the hippocampus of 8-month-old SAMP8 mice, using SAMR1 mice as control. We also examined the modulation of these parameters by 8 weeks of voluntary exercise. Twenty-one miRNAs were differentially expressed between sedentary SAMP8 and SAMR1 mice and seven miRNAs were responsive to exercise in both strains. SAMP8 mice showed alterations in genes involved in protein acetylation homeostasis such as *Sirt1* and *Hdac6* and modulation of *Hdac3* and *Hdac5* gene expression by exercise. Global histone H3 acetylation levels were reduced in SAMP8 compared with SAMR1 mice and reached control levels in response to exercise. In sum, data presented here provide new candidate epigenetic markers for aging and neurodegeneration and suggest that exercise training may prevent or delay some epigenetic alterations associated with accelerated aging.

**Keywords:** exercise, aging, Alzheimer, SAMP8, microRNAs

## INTRODUCTION

Epigenetic changes are currently recognized as part of the aging process and have been implicated in many age-related chronic diseases (Jakovcevski and Akbarian, 2012; Akbarian et al., 2013; Lopez-Otin et al., 2013). The term epigenetics includes a variety of processes known to regulate gene expression in a stable and potentially reversible way, without altering the primary DNA sequence (Jaenisch and Bird, 2003). The molecular mechanisms that mediate epigenetic regulation are principally DNA methylation, post-translational modifications of the histones, and regulation by non-coding RNAs. Among the latter, microRNAs (miRNAs) are small molecules (22 nucleotides approximately) that regulate gene expression by binding to its target messenger RNA (mRNA) inhibiting its translation, or, less frequently, promoting its degradation (Bartel, 2009). To date, around 700–800 miRNAs have been identified in the human genome (Bentwich et al., 2005). Altered expression of miRNAs has been described in different chronic pathologies and they are currently considered to be critical in the aging process (Jung and Suh, 2012). miRNAs seem to play an important role in the developing nervous system, in the physiology of high-order brain functions such as learning, memory, and emotion regulation, and in the manifestation of neurological disorders such as amyotrophic lateral sclerosis, Tourette's syndrome, Alzheimer's disease (AD) and others (Yang et al., 2007; Mastroeni et al., 2011; Goldie and Cairns, 2012; Van Den Hove et al., 2014). On the other hand, histone

covalent modifications have also been implicated in the aging process (Dang et al., 2009; Greer et al., 2010; Siebold et al., 2010; Di Bernardo et al., 2012; Huidobro et al., 2013; Tammen et al., 2013). Histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) are among the best characterized histone modifying enzymes in neurons (Crepaldi and Riccio, 2009). HATs transfer an acetyl group to the amino groups of histone lysine residues and generally increase DNA transcription. For their part, HDACs decrease DNA accessibility by deacetylation of histone lysines (Legube and Trouche, 2003). An adequate balance between HAT and HDAC levels and activity is crucial for neuronal homeostasis and for brain functions such as learning and memory (Saha and Pahan, 2006). Notably, alterations in histone acetylation levels have been observed in several models of neurodegenerative diseases, including AD (Scheff et al., 2007; Arendt, 2009).

It has been widely reported that the regular practice of physical exercise improves brain health and provides cognitive and psychological benefits (Kaliman et al., 2011). Some of the neurophysiological effects of physical exercise have been attributed to changes in the transcriptional profiles of growth and neurotrophic factors such as IGF1 and BDNF (Dishman et al., 2006; Gomez-Pinilla et al., 2008; Trejo et al., 2008; Alvarez-Lopez et al., 2013). Recent data have described the positive impact of physical exercise on epigenetic alterations in the rodent brain (Chandramohan et al., 2008; Collins et al., 2009; Abel and Rissman, 2013; Lovatel et al., 2013).

The spontaneous senescence-accelerated P8 mouse model (SAMP8) is currently considered a model of AD (Pallas et al., 2008a; Morley et al., 2012b; Cheng et al., 2013a,b; Wang et al., 2013). Indeed, SAMP8 mice display cognitive and behavioral alterations which are accompanied by molecular features typical of AD such as overproduction of amyloid-beta protein, increased tau phosphorylation, cholinergic deficits in the forebrain and increased oxidative stress (Takeda, 2009; Del Valle et al., 2011; Morley et al., 2012a). SAMP8 mice were phenotypically selected from AKR/J, and SAM resistant mice (SAMR1), which have a similar genetic background, have been extensively used as a control model because they show normal aging characteristics (Takeda et al., 1991). With the purpose of identifying potential epigenetic markers involved in aging and neurodegeneration, here we studied the expression levels of a set of 84 mature miRNAs with reported effects on neurological development and disease, the expression of several genes involved in maintenance of the histone acetylation balance (HATs and HDACs) and the levels of histone global acetylation (H3ac, H4ac) in the hippocampus of 8-month-old SAMP8 and SAMR1 mice. We also explored the impact of 8 weeks of voluntary wheel running intervention on these parameters. Through these analyses, we identified hippocampal epigenetic factors that are altered in the senescent SAMP8 mice, some of which were modulated by physical exercise.

## MATERIALS AND METHODS

### ANIMAL CARE AND VOLUNTARY EXERCISE PARADIGM

All experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona (Comissió Ètica d'Experimentació Animal UB), following the "Principles of laboratory animal care" and were carried out in accordance to the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

SAMP8 and SAMR1 female mice were provided by El Parc Tecnològic (Barcelona, Spain) and were maintained under standard conditions (temperature  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , humidity 50–60%, 12:12-h light-dark cycle, lights on at 7:00 a.m.), with food (A04, Harlan, Spain) and tap water available *ad libitum* throughout the study. Body weight (g) was measured weekly. This study was performed in female mice as sex differences in the patterns of voluntary exercise in mice have been reported (Alvarez-Lopez et al., 2013).

The running wheels (ENV-044 Mouse Low-Profile Wireless Running Wheel, Med Associates Inc.; 15.5 cm circumference;  $25^\circ$  from horizontal plane) were located in the animal colony room inside cages 19 cm high  $\times$  27 cm wide  $\times$  40 cm deep. Wheel-running activity was monitored through a wireless transmitter system by using a Hub located in the same animal colony room. Wireless Running Wheel Manager Data Acquisition Software (SOF-860; Med Associates Inc.) recorded the activity and time of each wheel revolution, which occurred whenever a magnet attached to the wheel's axis made contact with an electronic switch sending a signal to the Hub. Although revolutions were monitored continuously, voluntary activity occurred primarily during the dark phase. The running mice were placed individually in the large cages and had unlimited access to a running wheel 7 days a week for 8 weeks. Control mice were placed individually in cages of equal size without a running wheel.

At the end of the intervention all mice were 8-month-old. Animals were sacrificed by decapitation and the brains were dissected on ice to obtain the hippocampus. Tissues were immediately frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further analysis.

### PLASMA ANALYSIS

Blood samples were collected in 5% EDTA-tubes at the time of death for IGF1, cholesterol, and triglycerides determination. Plasma was obtained by centrifugation (3500 rpm, 10 min, room temperature) and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

IGF1 was determined by the ELISA kit Mouse/Rat Insulin-like Growth Factor-I; (Mediagnost, IGF-I EIA E25, Reutlingen, Germany) following the manufacturer's recommendations.

Plasma triglyceride and cholesterol concentrations were measured by using the colorimetric tests (Triglyceride L-type and Cholesterol kit, respectively), from Wako Chemicals GmbH (Neuss, Germany).

### TOTAL RNA EXTRACTION

Total RNA was extracted using *mirVana*<sup>TM</sup> RNA Isolation Kit (Applied Biosystems) according to the instructions of the manufacturer. The yield, purity and quality of RNA were determined spectrophotometrically (NanoDrop, USA) and using the Bioanalyzer 2100 capillary electrophoresis. RNAs with 260/280 ratios and RIN higher than 1.9 and 7.5, respectively, were selected.

### REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

Random-primed cDNA synthesis was performed at  $37^\circ\text{C}$  starting with 0.3  $\mu\text{g}$  of RNA, using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems). Gene expression was measured in an ABI Prism 7900HT Real Time PCR system using TaqMan FAM-labeled specific probes (Applied Biosystems). A list of the probes used is presented in Supplementary Table 1 (S1). Results were normalized to *TATA-binding protein (Tbp)* expression.

### WESTERN BLOTS

Histone fractions (5  $\mu\text{g}$ ) were electrophoretically analyzed on 12% bis-Tris polyacrylamide gels and transferred to a 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF membrane. Membranes were blocked for 1 h with 5% BSA in PBS and incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with the specific primary antibodies (1:1000, Millipore). Membranes were washed and incubated with peroxidase-labeled secondary antibodies at room temperature for 1 h. Immunoreactive bands were detected by autoradiography. Specific bands from Western blot were quantified by scanning densitometry using Quantity One<sup>®</sup> 1-D analysis 4.6.3. software (Bio-Rad USA, Life Science Research, Hercules, CA). Histone modifications levels were corrected by total histone expression.

### microRNA EXPRESSION ARRAY

RNA samples from 16 female individuals (four from each group: sedentary SAMR1, runner SAMR1, sedentary SAMP8, runner SAMP8) were converted to cDNA through a reverse transcription reaction using miScript II RT Kit (Qiagen, Hilden Germany) according to the manufacturer's instructions. The expression of 84 mature miRNAs was then analyzed using the *miScript*<sup>®</sup> miRNA PCR Array-Neurological Development and Disease miRNA PCR Array (Qiagen). miRNAs expression was measured in an ABI

Prism 7900HT through SYBR-green-based real time PCR. The data obtained were processed with the online software “Web-based miScript miRNA PCR Array data analysis tool.” The mean of the relative gene expression of the small non-coding RNAs SNORD61, SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96A was used to normalize results since they presented similar expression levels across the individuals and groups and the lowest standard deviations among all the housekeeping miRNAs proposed.

### STATISTICAL ANALYSIS

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 19.0). The Two-Way ANOVA analysis of variance [2 strains (R1,P8) × 2 conditions (sedentary, runner)] was conducted to assess strain and exercise intervention effects. Comparisons between groups were performed by two-tailed Student’s *t*-test for independent samples; *p*-values below 0.05 were considered statistically significant. Statistical outliers ( $\geq$ two standard deviations from the mean) were removed from the analyses. Functional prediction analysis (Supplementary information S3–S6) was only performed for those miRNAs significantly altered with a *p* < 0.05 and a magnitude of effect  $\geq$ 1.4.

## RESULTS

### POSITIVE EFFECTS OF 8 WEEKS OF VOLUNTARY WHEEL RUNNING IN HIPPOCAMPAL GENE EXPRESSION AND IGF1 PLASMA LEVELS

We analyzed the effects of 8 weeks of voluntary wheel running in 6-month-old SAMP8 and SAMR1 mice. Both strains displayed a similar and stable number of wheel revolutions/week over time throughout the intervention (SAMR1,  $17762 \pm 2221.9$  average wheel revolutions/week; SAMP8,  $18018 \pm 3035.7$  average wheel revolutions/week, **Figure 1A**). No changes were found in body weight, plasma triglycerides, or plasma cholesterol between the experimental groups (**Figures 1B–D**; **Table 1**).

To confirm the efficacy of the exercise intervention, we analyzed several factors previously reported to be modulated in rodents in response to physical training (e.g., plasma IGF1 and hippocampal *Bdnf* gene expression) (Kaliman et al., 2011). Both exercised SAMR1 and SAMP8 mice showed significantly increased IGF1 plasma levels compared with their corresponding sedentary groups (**Figure 1E**; **Table 1**).

In the hippocampus, *Bdnf* gene was underexpressed in sedentary SAMP8 compared with SAMR1 mice and both *Bdnf* and its receptor *TrkB* were significantly upregulated in response to the exercise intervention in both strains (**Figures 1E,G**; **Table 1**). Notably, after the exercise intervention *Bdnf* levels in SAMP8 mice were undistinguishable from those found in sedentary SAMR1 controls [ $t_{(12)} = 0.279$ , *p* = 0.785] (**Figure 1F**). *Neuritin* gene, a well characterized target of BDNF, was upregulated in both strains by exercise training (**Figure 1H**; **Table 1**).

These results confirmed that the wheel running intervention was effective and therefore represents a good model to explore epigenetic effects of exercise in the SAMP8 mice.

### MICRORNA EXPRESSION PROFILE IS ALTERED IN SAMP8 HIPPOCAMPUS AND MODULATED BY PHYSICAL EXERCISE

We compared the microRNA expression profiles between 8-month-old SAMP8 and SAMR1 mice in order to identify putative

senescence markers in the hippocampus. We used a miRNA PCR array which analyzes 84 different mouse miRNAs known to be altered in neurological diseases or involved in neuronal development. We found 18 miRNAs altered in sedentary SAMP8 compared with SAMR1 mice which were unresponsive to exercise, three miRNAs altered in SAMP8 and modulated by exercise and four miRNAs that were similarly expressed in SAMP8 and SAMR1 mice and modulated by exercise in both strains. Two-Way ANOVA analysis of this set of miRNAs are shown in **Table 2**. Statistical analysis of miRNAs similarly expressed in SAMP8 and SAMR1 mice and unresponsive to the exercise intervention are shown in Supplementary Table 2 (S2).

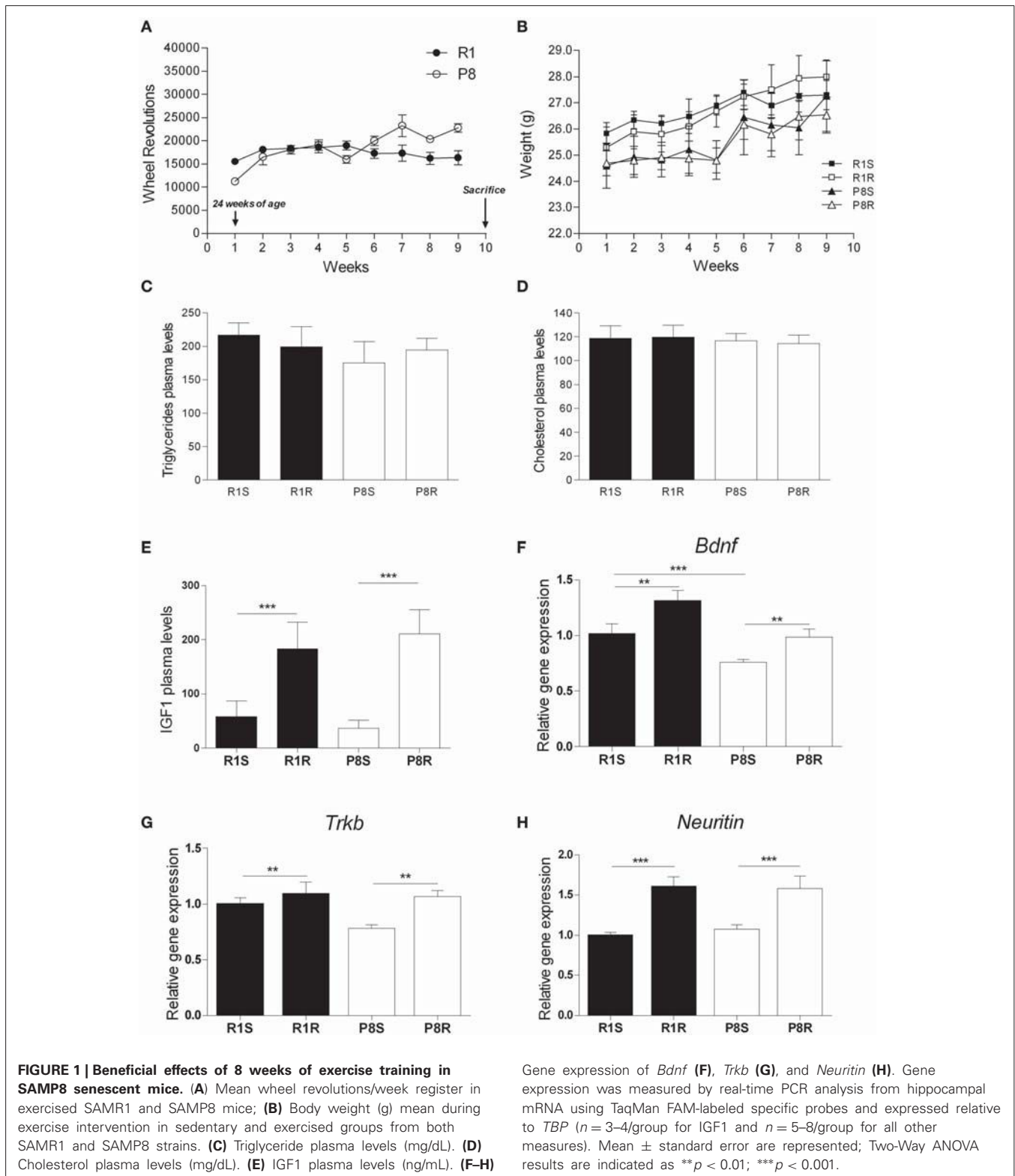
Among the miRNAs that were significantly upregulated in SAMP8 compared with SAMR1 mice, miR-30e-5p, miR-125b-5p, and miR-128-3p have also been reported to be upregulated in post-mortem human AD hippocampus (Lukiw, 2007; Cogswell et al., 2008). Similarly, we found an increased expression of let-7i-5p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30a-5p, miR-98-5p, miR-138-5p, miR-139-5p, miR-140-5p, miR-146b-5p, miR-148b-3p, miR-181a-1-3p, miR-181a-5p, miR-194-5p, and miR-342-3p, all of which have been reported to be altered in different AD tissues (Cogswell et al., 2008; Hebert et al., 2008; Maes et al., 2009; Wang et al., 2011, 2012; Lau et al., 2013). The rest of the differentially expressed miRNAs between strains have been found to be altered in different neurodegenerative models (28a-5p, miR-337-3p, miR-431-5p, miR-455-5p). The functional information available in the literature for these miRNAs in the central nervous system (CNS) is summarized in Supplementary Table 3 (S3).

Interestingly, miR28a-5p, miR-98-5p, and miR-148b-3p expression was significantly higher in sedentary SAMP8 compared with sedentary SAMR1 mice and this difference was further accentuated by exercise (**Figures 2A–C**). In addition, we found that miR-7a-5p, miR-15b-5p, miR-105, and miR-133-3p exhibited similar expression levels in sedentary strains but were similarly modulated by exercise in SAMP8 and SAMR1 mice (**Figures 2D–G**). Functional information available in the literature for the role in the CNS of the miRNAs regulated by exercise is summarized in Supplementary Table 4 (S4).

### ALTERATIONS IN THE EXPRESSION OF HAT AND HDAC GENES AND IN GLOBAL HISTONE MODIFICATIONS IN HIPPOCAMPUS OF SEDENTARY SAMP8: EFFECTS OF EXERCISE

Alterations in histone acetylation levels have been observed in several models of neurodegenerative diseases. Therefore, we analyzed in sedentary and exercised SAMP8 and SAMR1 mice, the hippocampal expression of the HAT *P300* and the NAD<sup>+</sup> dependent HDAC *Sirt1*, both of which have been implicated in AD pathogenesis (Pallas et al., 2008b; Min et al., 2010) as well as a group of NAD<sup>+</sup> independent HDACs (*Hdac1*, *Hdac2*, *Hdac3*, *Hdac5*, *Hdac6*).

We did not find any differences between strains or any modulation with exercise in histone acetyltransferase *P300* gene expression (**Table 3**, **Figure 3A**). We found lower expression levels of the histone deacetylases *Sirt1*, *Hdac5*, and *Hdac6* in sedentary SAMP8 compared with SAMR1 mice (**Table 3**, **Figures 3B,E,G**) while no significant differences between strains were detected for *Hdac1*, *Hdac2* and *Hdac3* (**Table 3**, **Figures 3C–E**).



Voluntary exercise led to a significant decrease in *Hdac3* gene expression exclusively in SAMP8 mice (Table 3, Figure 3E). ANOVA analysis showed a downregulation tendency for *Hdac5* gene in exercised compared with sedentary SAMP8 mice, and

this effect was found to be statistically significant by two-tailed Student's *t*-test for independent samples [P8R vs. P8S, *Hdac3*:  $t_{(9)} = 1.931, p = 0.084$ ; *Hdac5*:  $t_{(12)} = 2.27, p = 0.042$ ] (Table 3, Figure 3F). We did not detect any influence of the exercise

**Table 1 | Two-Way ANOVA analysis was used to compare plasma cholesterol, triglycerides and IGF1 levels and hippocampal expression of neurotrophic genes in sedentary and exercised 8-month-old SAMR1 and SAMP8 mice.**

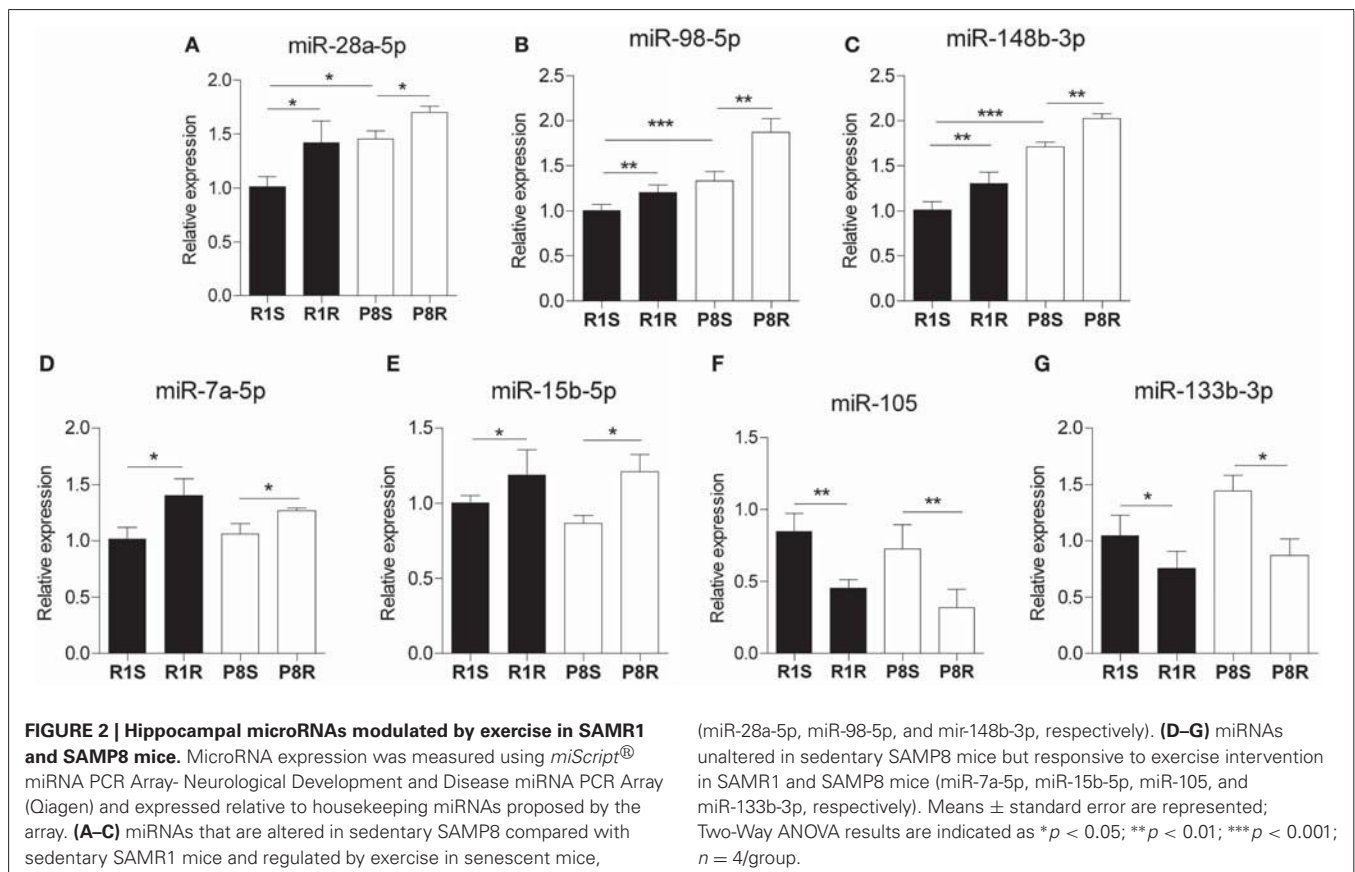
	Two-way ANOVA analysis								
	Exercise			Strain			Strain*exercise		
	df.	F	p-value	df.	F	p-value	df.	F	p-value
<b>PLASMA</b>									
IGF1	1, 10	19.716	<b>&lt;0.001</b>	1, 10	0.008	0.932	1, 10	0.528	0.484
Cholesterol	1, 21	0.045	0.835	1, 21	<0.001	0.998	1, 21	0.147	0.705
Triglycerids	1, 21	0.913	0.35	1, 21	0.007	0.933	1, 21	0.794	0.383
<b>HIPPOCAMPAL GENES</b>									
<i>Bdnf</i>	1, 22	12.16	<b>0.002</b>	1, 22	15.285	<b>&lt;0.001</b>	1, 22	0.233	0.634
<i>TrkB</i>	1, 21	8.239	<b>0.009</b>	1, 21	3.729	<b>0.067</b>	1, 21	2.26	0.148
<i>Neuritin</i>	1, 23	31.931	<b>&lt;0.001</b>	1, 23	0.048	0.828	1, 23	0.83	0.372

Natural log, square root, and inverse transformation were applied to normalize plasma cholesterol, plasma triglycerides, and Neuritin distribution, respectively. P-values < 0.05 were considered statistically significant. df stands for degrees of freedom. Bold values correspond to statistically significant p-values.

**Table 2 | miRNAs significantly altered in SAMP8 mice and/or modulated by exercise.**

	miRNAs	Two-way ANOVA analysis								
		Exercise			Strain			Strain*exercise		
		df.	F	p-value	df.	F	p-value	df.	F	p-value
Strain effect; no exercise effect	let_7i_5p	1, 12	0.029	0.867	1, 12	24.140	<b>&lt;0.001</b>	1, 12	1.252	0.285
	miR_29a_3p	1, 12	1.933	0.190	1, 12	25.847	<b>&lt;0.001</b>	1, 12	0.609	0.450
	miR_29c_3p	1, 12	0.347	0.567	1, 12	14.705	<b>0.002</b>	1, 12	0.908	0.359
	miR_30a_5p	1, 12	0.240	0.633	1, 12	16.725	<b>0.001</b>	1, 12	0.062	0.807
	miR_30e_5p	1, 12	0.623	0.445	1, 12	8.079	<b>0.015</b>	1, 12	0.717	0.414
	miR_125b_5p	1, 12	0.236	0.636	1, 12	21.299	<b>0.001</b>	1, 12	0.195	0.666
	miR_128_3p	1, 12	0.750	0.404	1, 12	13.127	<b>0.003</b>	1, 12	0.454	0.513
	miR-138-5p	1, 12	0.169	0.688	1, 12	18.876	<b>0.001</b>	1, 12	3.598	0.082
	miR_139_5p	1, 12	2.264	0.158	1, 12	14.273	<b>0.003</b>	1, 12	1.019	0.333
	miR_140_5p	1, 12	0.643	0.438	1, 12	42.614	<b>&lt;0.001</b>	1, 12	1.355	0.267
	miR_146b_5p	1, 12	0.051	0.825	1, 12	8.750	<b>0.012</b>	1, 12	0.152	0.704
	miR_181a_1_3p	1, 11	0.300	0.595	1, 11	9.290	<b>0.011</b>	1, 11	0.001	0.978
	miR_181a_5p	1, 12	0.480	0.502	1, 12	8.303	<b>0.014</b>	1, 12	1.962	0.187
	miR_194_5p	1, 11	0.667	0.431	1, 11	16.876	<b>0.002</b>	1, 11	0.029	0.869
	miR_337_3p	1, 12	2.061	0.177	1, 12	5.767	<b>0.033</b>	1, 12	0.160	0.696
	miR_342_3p	1, 12	0.749	0.404	1, 12	5.188	<b>0.042</b>	1, 12	1.318	0.273
	miR_431_5p	1, 12	0.330	0.576	1, 12	6.052	<b>0.03</b>	1, 12	0.479	0.502
	miR_455_5p	1, 12	4.264	0.061	1, 12	6.990	<b>0.021</b>	1, 12	0.018	0.896
	Strain and exercise effect	miR-28a-5p	1, 12	7.241	<b>0.020</b>	1, 12	9.073	<b>0.011</b>	1, 12	0.435
miR-98-5p		1, 12	12.167	<b>0.004</b>	1, 12	22.598	<b>&lt;0.001</b>	1, 12	2.548	0.136
miR-148b-3p		1, 12	12.421	<b>0.004</b>	1, 12	69.076	<b>&lt;0.001</b>	1, 12	0.027	0.872
No strain effect; exercise effect	miR-7a-5p	1, 12	8.513	<b>0.013</b>	1, 12	0.200	0.663	1, 12	0.805	0.387
	miR-15b-5p	1, 12	6.094	<b>0.030</b>	1, 12	0.279	0.607	1, 12	0.546	0.474
	miR-105	1, 11	9.680	<b>0.010</b>	1, 11	1.004	0.338	1, 11	0.003	0.954
	miR-133b-3p	1, 12	7.830	<b>0.016</b>	1, 12	2.739	0.124	1, 12	0.823	0.382

Two-Way ANOVA analysis was used to compare the hippocampal miRNAs gene expression in sedentary and exercised 8-month-old SAMR1 and SAMP8 mice. P-values < 0.05 were considered statistically significant. df stands for degrees of freedom. Bold values correspond to statistically significant p-values.



**Table 3 | Two-Way ANOVA was used to compare the hippocampal expression of histone acetylation regulatory genes in sedentary and exercised 8-month-old SAMR1 and SAMP8 mice.**

Hippocampal genes	Two-way ANOVA analysis								
	Exercise			Strain			Strain*exercise		
	df.	F	p-value	df.	F	p-value	df.	F	p-value
<i>P300</i>	1, 23	0.106	0.748	1, 23	1.261	0.273	1, 23	2.942	0.1
<i>Sirt1</i>	1, 23	0.091	0.765	1, 23	8.369	<b>0.008</b>	1, 23	0.041	0.841
<i>Hdac1</i>	1, 23	1.128	0.299	1, 23	2.055	0.165	1, 23	1.26	0.273
<i>Hdac2</i>	1, 23	2.66	0.117	1, 23	0.221	0.643	1, 23	2.823	0.106
<i>Hdac3</i>	1, 23	0.054	0.818	1, 23	0.383	0.542	1, 23	5.249	<b>0.031</b>
<i>Hdac5</i>	1, 23	1.414	0.246	1, 23	14.639	<b>&lt;0.001</b>	1, 23	3.104	<b>0.091</b>
<i>Hdac6</i>	1, 23	1.482	0.236	1, 23	21.536	<b>&lt;0.001</b>	1, 23	0.453	0.508

Quadratic transformation was applied to normalize *Hdac3* distribution. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. *df* stands for degrees of freedom. Bold values correspond to statistically significant *p*-values.

intervention on *Sirt1*, *Hdac1*, *Hdac2*, and *Hdac6* gene expression (Table 3, Figures 3B–D,G).

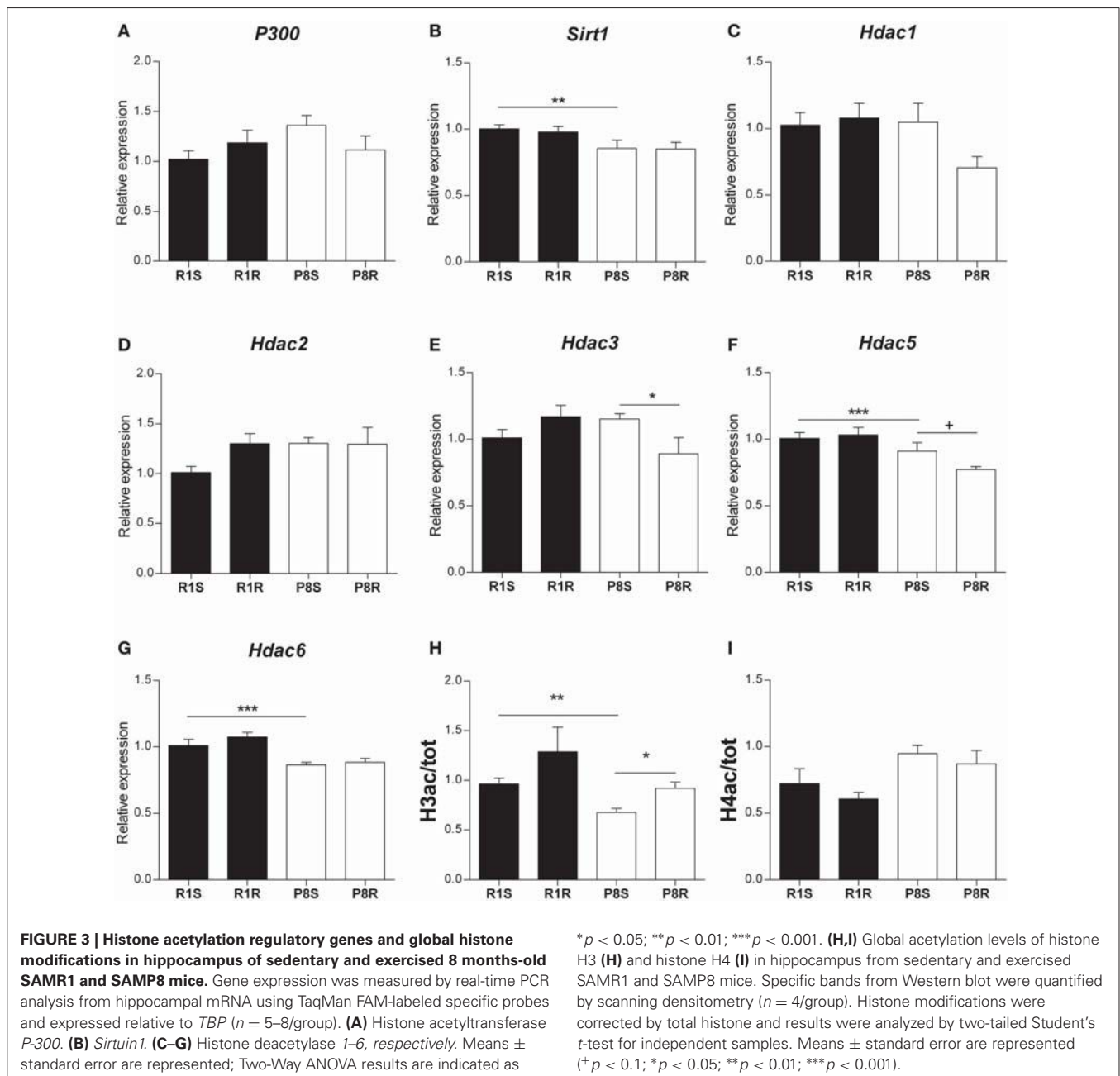
Finally, we found that the global acetylation levels of histone H3 (H3ac) were lower in sedentary SAMP8 than in SAMR1 mice [P8S vs. R1S,  $t_{(6)} = 3.929$ ,  $p = 0.008$ ] and significantly increased upon exercise only in the senescent mice [P8R vs. P8S,  $t_{(6)} = -3.399$ ,  $p = 0.019$ ] (Figure 3H). In contrast, the acetylation of histone 4 (H4ac) did not show significant differences between groups (Figure 3I).

## DISCUSSION

Here we explored the epigenetic alterations in the hippocampus of SAMP8 female mouse and the modulatory effect of voluntary physical exercise on the expression of several miRNAs, histone deacetylase genes and in the global acetylation level of histone H3.

Our data and those of others (Liang et al., 2009) suggest that miRNAs are involved in the down-regulation of target genes that control accelerated senescence. Indeed, we found a general upregulation pattern of miRNAs in the hippocampus SAMP8





compared with SAMR1 mice. Most of these miRNAs have also been found dysregulated in different tissues from AD patients. Notably, our study highlights the upregulation of miR-30e-5p, miR-125b-5p, and miR-128-3p as common epigenetic features in the hippocampus of SAMP8 mice and post-mortem hippocampus from AD patients. Moreover, our results support bioinformatic data by Cheng et al. who have recently predicted from a whole genome microarray study that miR-125b-5p may be involved in the brain aging phenotype of SAMP8 mice (Cheng et al., 2013a). Therefore, these miRNAs emerge as potential AD biomarkers and our data provide further support for the suitability of the SAMP8 model for future studies to explore their role

on the onset and progression of AD. Supplementary Table 3 (S3) summarizes the available literature regarding the brain distribution and function of the miRNAs that we found altered in SAMP8 compared with SAMR1 sedentary mice. Bioinformatic pathway analysis (DIANA-miRPath v.2.1) indicates that these miRNAs are involved in neural processes such as neurotransmitters synapses (acetylcholine, glutamate, dopamine), long-term potentiation, axon guidance and neurotrophin signaling (S5).

Exercise training led to the increase of IGF1 in plasma and the upregulation of BDNF and other neurogenic factors in hippocampus of SAMP8 and SAMR1 strains (Figure 1). These data confirm that the intervention used in our study was effective

as such effects have previously been reported in a variety of rodent models in response to exercise (Saltiel and Kahn, 2001; Llorens-Martin et al., 2010; Chang et al., 2011; Kaliman et al., 2011; Sakurai et al., 2011; Higashi et al., 2012; Alvarez-Lopez et al., 2013). We found that miR-28a-5p, miR-98a-5p, miR-148b-3p were altered in sedentary SAMP8 compared with SAMR1 mice and changed their expression levels in response to exercise (putative aging markers responsive to exercise). On the other hand, miR-7a-5p, miR-15b-5p, miR-105, miR-133b-3p, which were similarly expressed in SAMP8 and SAMR1 mice, were modulated by exercise in both strains (putative markers of exercise unrelated to aging). The data available on the function and expression of these miRNAs in the CNS are summarized in Supplementary Table 4 (S4). Further study is warranted to explore the precise mechanistic links between these miRNAs and the protective central effects of physical exercise. In this context, a prediction through bioinformatic pathway analysis for multiple miRNA effect indicates that these exercise-responsive miRNAs are involved in the regulation of PI-3-kinase-Akt, focal adhesion, insulin, mTOR and MapK signaling pathways, all of which are modulated in the brain by exercise (Shen et al., 2001; Tong et al., 2001; Bruel-Jungerman et al., 2009; Muller et al., 2011; Elfving et al., 2013) (S6).

Both the sedentary and exercised SAMP8 mice showed altered expression patterns of protein deacetylases with reported functions in the aging brain and AD such as *Hdac6*, *Sirt1*, *Hdac3*, and *Hdac5*. We found a downregulation of histone deacetylase *Hdac6* in the hippocampus of sedentary SAMP8 mice. HDAC6 specific inhibitors have been described as potential therapeutic approaches to rescue the neurodegeneration, however an induction of HDAC6 was reported to facilitate the autophagy of misfolded proteins and aggregates of A $\beta$ 42 and p-tau (Simoes-Pires et al., 2013). Further research is required to better understand the still controversial role of HDAC6 and our data indicate that the SAMP8 mice may represent a suitable model for this purpose. We also found a downregulation of the protein deacetylase *Sirt1* in the hippocampus of SAMP8 mice, supporting the notion that decreased *Sirt1* expression is a feature of the accelerated brain aging and neurodegeneration (Pallas et al., 2008b; Duan, 2013). However, we did not find a modulation of *Sirt1* mRNA levels in response to the running intervention in contrast to previous findings using other experimental models (Ferrara et al., 2008; Dumke et al., 2009; Koltai et al., 2010).

Our data suggest that exercise may exert some of its reported beneficial effects on SAMP8 cognitive performance through *Hdac3* downregulation, a mechanism involved in long-term memory enhancement (Mcquown et al., 2011) and in the reversal of contextual memory deficits in a mouse model of AD (Fischer et al., 2007; Kilgore et al., 2010).

It has previously been reported that exercise activates *Bdnf* transcription through *Hdac5* downregulation (Gomez-Pinilla et al., 2011). Therefore, the downregulation of *Hdac5* expression in the exercised SAMP8 mice may be at least in part responsible for the observed *Bdnf* upregulation (Figure 2). Finally, global acetylation levels of histone H3 (H3ac) were increased after the exercise intervention in the SAMP8 mice suggesting that HDAC gene downregulation had some impact on chromatin remodeling.

Notably, partial correlation analyses revealed a negative association between the modification H3ac and *Hdac3* gene expression [ $\rho_{(11)} = -0.721, p < 0.01$ ].

As a whole, our study highlights some common epigenetic features in hippocampus of SAMP8 mice and human AD, and provides further support for the suitability of this experimental model for future epigenetic studies regarding the onset and progression of AD. Among them, miRNAs emerge as potentially valuable biomarkers for the development of new therapeutic strategies for senescence and neurodegeneration. Moreover, our data suggest a positive impact of voluntary exercise in reversing some epigenetic and transcriptional alterations associated with the aging brain, and reinforces the prevailing concept that physical training is a promising therapeutic strategy for neurodegenerative diseases such as AD.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant SAF2010-15050 (Perla Kaliman) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) with the collaboration of grants DPS2008-06998-C02 (Mercedes Pallàs and Rosa M. Escorihuela); CSD2010-45 (Coral Sanfeliu) and SAF2012-39852 (Mercedes Pallàs and Coral Sanfeliu) from MINECO. Marta Cosin-Tomás is supported by a predoctoral fellowship from MINECO (FPU 2013); Jaume F. Lanza and María J. Alvarez-López were supported by a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2011).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fnagi.2014.00051/abstract>

## REFERENCES

- Abel, J. L., and Rissman, E. F. (2013). Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31, 382–390. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2012.11.002
- Akbadian, S., Beeri, M. S., and Haroutunian, V. (2013). Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition. *JAMA Neurol.* 70, 711–718. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.1459
- Alvarez-Lopez, M. J., Castro-Freire, M., Cosin-Tomas, M., Sanchez-Roige, S., Lanza, J. F., Del Valle, J., et al. (2013). Long-term exercise modulates hippocampal gene expression in senescent female mice. *J. Alzheimers Dis.* 33, 1177–1190. doi: 10.3233/JAD-121264
- Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118, 167–179. doi: 10.1007/s00401-009-0536-x
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., et al. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.* 37, 766–770. doi: 10.1038/ng1590
- Bruel-Jungerman, E., Veyrac, A., Dufour, F., Horwood, J., Laroche, S., and Davis, S. (2009). Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PLoS ONE* 4:e7901. doi: 10.1371/journal.pone.0007901
- Chandramohan, Y., Droste, S. K., Arthur, J. S., and Reul, J. M. (2008). The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2701–2713. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06230.x

- Chang, H. C., Yang, Y. R., Wang, P. S., Kuo, C. H., and Wang, R. Y. (2011). Insulin-like growth factor I signaling for brain recovery and exercise ability in brain ischemic rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* 43, 2274–2280. doi: 10.1249/MSS.0b013e318223b5d9
- Cheng, X. R., Cui, X. L., Zheng, Y., Zhang, G. R., Li, P., Huang, H., et al. (2013a). Nodes and biological processes identified on the basis of network analysis in the brain of the senescence accelerated mice as an Alzheimer's disease animal model. *Front. Aging Neurosci.* 5:65. doi: 10.3389/fnagi.2013.00065
- Cheng, X. R., Zhou, W. X., and Zhang, Y. X. (2013b). The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model. *Ageing Res. Rev.* 13C, 13–37. doi: 10.1016/j.arr.2013.10.002
- Cogswell, J. P., Ward, J., Taylor, I. A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., et al. (2008). Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J. Alzheimers Dis.* 14, 27–41.
- Collins, A., Hill, L. E., Chandramohan, Y., Whitcomb, D., Droste, S. K., and Reul, J. M. (2009). Exercise improves cognitive responses to psychological stress through enhancement of epigenetic mechanisms and gene expression in the dentate gyrus. *PLoS ONE* 4:e4330. doi: 10.1371/journal.pone.0004330
- Crepaldi, L., and Riccio, A. (2009). Chromatin learns to behave. *Epigenetics* 4, 23–26. doi: 10.4161/epi.4.1.7604
- Dang, W., Steffen, K. K., Perry, R., Dorsey, J. A., Johnson, F. B., Shilatifard, A., et al. (2009). Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature* 459, 802–807. doi: 10.1038/nature08085
- Del Valle, J., Duran-Vilaregut, J., Manich, G., Pallas, M., Camins, A., Vilaplana, J., et al. (2011). Cerebral amyloid angiopathy, blood-brain barrier disruption and amyloid accumulation in SAMP8 mice. *Neurodegener. Dis.* 8, 421–429. doi: 10.1159/000324757
- Di Bernardo, G., Cipollaro, M., and Galderisi, U. (2012). Chromatin modification and senescence. *Curr. Pharm. Des.* 18, 1686–1693. doi: 10.2174/138161212799859693
- Dishman, R. K., Berthoud, H. R., Booth, F. W., Cotman, C. W., Edgerton, V. R., Fleshner, M. R., et al. (2006). Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring)* 14, 345–356. doi: 10.1038/oby.2006.46
- Duan, W. (2013). Sirtuins: from metabolic regulation to brain aging. *Front. Aging Neurosci.* 5:36. doi: 10.3389/fnagi.2013.00036
- Dumke, C. L., Mark Davis, J., Angela Murphy, E., Nieman, D. C., Carmichael, M. D., Quindry, J. C., et al. (2009). Successive bouts of cycling stimulates genes associated with mitochondrial biogenesis. *Eur. J. Appl. Physiol.* 107, 419–427. doi: 10.1007/s00421-009-1143-1
- Elfving, B., Christensen, T., Ratner, C., Wienecke, J., and Klein, A. B. (2013). Transient activation of mTOR following forced treadmill exercise in rats. *Synapse* 67, 620–625. doi: 10.1002/syn.21668
- Ferrara, N., Rinaldi, B., Corbi, G., Conti, V., Stiuso, P., Boccuti, S., et al. (2008). Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. *Rejuvenation Res.* 11, 139–150. doi: 10.1089/rej.2007.0576
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., and Tsai, L. H. (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178–182. doi: 10.1038/nature05772
- Goldie, B. J., and Cairns, M. J. (2012). Post-transcriptional trafficking and regulation of neuronal gene expression. *Mol. Neurobiol.* 45, 99–108. doi: 10.1007/s12035-011-8222-0
- Gomez-Pinilla, F., Vaynman, S., and Ying, Z. (2008). Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur. J. Neurosci.* 28, 2278–2287. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06524.x
- Gomez-Pinilla, F., Zhuang, Y., Feng, J., Ying, Z., and Fan, G. (2011). Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. *Eur. J. Neurosci.* 33, 383–390. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07508.x
- Greer, E. L., Maures, T. J., Hauswirth, A. G., Green, E. M., Leeman, D. S., Maro, G. S., et al. (2010). Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature* 466, 383–387. doi: 10.1038/nature09195
- Hebert, S. S., Horre, K., Nicolai, L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silhtaroglu, A. N., et al. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 6415–6420. doi: 10.1073/pnas.0710263105
- Higashi, Y., Sukhanov, S., Anwar, A., Shai, S. Y., and Delafontaine, P. (2012). Aging, atherosclerosis, and IGF-1. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 67, 626–639. doi: 10.1093/gerona/gls102
- Huidobro, C., Fernandez, A. F., and Fraga, M. F. (2013). Aging epigenetics: causes and consequences. *Mol. Aspects Med.* 34, 765–781. doi: 10.1016/j.mam.2012.06.006
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33(Suppl.), 245–254. doi: 10.1038/ng1089
- Jakovcevski, M., and Akbarian, S. (2012). Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat. Med.* 18, 1194–1204. doi: 10.1038/nm.2828
- Jung, H. J., and Suh, Y. (2012). microRNA in aging: from discovery to biology. *Curr. Genomics* 13, 548–557. doi: 10.2174/138920212803251436
- Kaliman, P., Parrizas, M., Lalanza, J. F., Camins, A., Escorihuela, R. M., and Pallas, M. (2011). Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process. *Ageing Res. Rev.* 10, 475–486. doi: 10.1016/j.arr.2011.05.002
- Kilgore, M., Miller, C. A., Fass, D. M., Hennig, K. M., Haggarty, S. J., Sweatt, J. D., et al. (2010). Inhibitors of class I histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 35, 870–880. doi: 10.1038/npp.2009.197
- Koltai, E., Szabo, Z., Atalay, M., Boldogh, I., Naito, H., Goto, S., et al. (2010). Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech. Ageing Dev.* 131, 21–28. doi: 10.1016/j.mad.2009.11.002
- Lau, P., Bossers, K., Janky, R., Salta, E., Frigerio, C. S., Barbash, S., et al. (2013). Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.* 5, 1613–1634. doi: 10.1002/emmm.201201974
- Legube, G., and Trouche, D. (2003). Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep.* 4, 944–947. doi: 10.1038/sj.embor.embor941
- Liang, R., Bates, D. J., and Wang, E. (2009). Epigenetic control of microRNA expression and aging. *Curr. Genomics* 10, 184–193. doi: 10.2174/138920209788185225
- Llorens-Martin, M. V., Rueda, N., Tejada, G. S., Florez, J., Trejo, J. L., and Martínez-Cue, C. (2010). Effects of voluntary physical exercise on adult hippocampal neurogenesis and behavior of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Neuroscience* 171, 1228–1240. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.09.043
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- Lovatel, G. A., Elsner, V. R., Bertoldi, K., Vanzella, C., Moyses Fdos, S., Vizuete, A., et al. (2013). Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 101, 94–102. doi: 10.1016/j.nlm.2013.01.007
- Lukiw, W. J. (2007). Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* 18, 297–300. doi: 10.1097/WNR.0b013e3280148e8b
- Maes, O. C., Chertkow, H. M., Wang, E., and Schipper, H. M. (2009). microRNA: implications for Alzheimer disease and other human CNS disorders. *Curr. Genomics* 10, 154–168. doi: 10.2174/138920209788185252
- Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside, C., Coleman, P. D., and Rogers, J. (2011). Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32, 1161–1180. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.017
- Mcquown, S. C., Barrett, R. M., Matheos, D. P., Post, R. J., Rogge, G. A., Alenghat, T., et al. (2011). HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J. Neurosci.* 31, 764–774. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5052-10.2011
- Min, S. W., Cho, S. H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W. W., et al. (2010). Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 67, 953–966. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.044
- Morley, J. E., Armbricht, H. J., Farr, S. A., and Kumar, V. B. (2012a). The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 650–656. doi: 10.1016/j.bbdis.2011.11.015
- Morley, J. E., Farr, S. A., Kumar, V. B., and Armbricht, H. J. (2012b). The SAMP8 mouse: a model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 18, 1123–1130. doi: 10.2174/138161212799315795
- Muller, A. P., Gnoatto, J., Moreira, J. D., Zimmer, E. R., Haas, C. B., Lulhner, F., et al. (2011). Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus* 21, 1082–1092. doi: 10.1002/hipo.20822
- Pallas, M., Camins, A., Smith, M. A., Perry, G., Lee, H. G., and Casadesus, G. (2008a). From aging to Alzheimer's disease: unveiling “the switch” with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J. Alzheimers Dis.* 15, 615–624.
- Pallas, M., Pizarro, J. G., Gutierrez-Cuesta, J., Crespo-Biel, N., Alvira, D., Tajés, M., et al. (2008b). Modulation of SIRT1 expression in different

- neurodegenerative models and human pathologies. *Neuroscience* 154, 1388–1397. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.065
- Saha, R. N., and Pahan, K. (2006). HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ.* 13, 539–550. doi: 10.1038/sj.cdd.4401769
- Sakurai, T., Ogasawara, J., Kizaki, T., Ishibashi, Y., Fujiwara, T., Akagawa, K., et al. (2011). Involvement of leucine zipper transcription factor-like protein 1 (Lztf1) in the attenuation of cognitive impairment by exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416, 125–129. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.008
- Saltiel, A. R., and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806. doi: 10.1038/414799a
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., Dekosky, S. T., and Mufson, E. J. (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68, 1501–1508. doi: 10.1212/01.wnl.0000260698.46517.8f
- Shen, H., Tong, L., Balazs, R., and Cotman, C. W. (2001). Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Neuroscience* 107, 219–229. doi: 10.1016/S0306-4522(01)00315-3
- Siebold, A. P., Banerjee, R., Tie, F., Kiss, D. L., Moskowitz, J., and Harte, P. J. (2010). Polycomb repressive complex 2 and trithorax modulate drosophila longevity and stress resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 169–174. doi: 10.1073/pnas.0907739107
- Simoës-Pires, C., Zwick, V., Nurisso, A., Schenker, E., Carrupt, P. A., and Cuendet, M. (2013). HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: what makes it different from the other HDACs? *Mol. Neurodegener.* 8:7. doi: 10.1186/1750-1326-8-7
- Takeda, T. (2009). Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem. Res.* 34, 639–659. doi: 10.1007/s11064-009-9922-y
- Takeda, T., Hosokawa, M., and Higuchi, K. (1991). Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *J. Am. Geriatr. Soc.* 39, 911–919.
- Tammen, S. A., Friso, S., and Choi, S. W. (2013). Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol. Aspects Med.* 34, 753–764. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.018
- Tong, L., Shen, H., Perreau, V. M., Balazs, R., and Cotman, C. W. (2001). Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol. Dis.* 8, 1046–1056. doi: 10.1006/nbdi.2001.0427
- Trejo, J. L., Llorens-Martin, M. V., and Torres-Aleman, I. (2008). The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 402–411. doi: 10.1016/j.mcn.2007.10.016
- Van Den Hove, D. L., Kompotis, K., Lardenoije, R., Kenis, G., Mill, J., Steinbusch, H. W., et al. (2014). Epigenetically regulated microRNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 35, 731–745. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.082
- Wang, H., Lian, K., Han, B., Wang, Y., Kuo, S. H., Geng, Y., et al. (2013). Age-related alterations in the metabolic profile in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse prone 8: a spontaneous Alzheimer's disease mouse model. *J. Alzheimers Dis.* 39, 841–848. doi: 10.3233/JAD-131463
- Wang, W., Kwon, E. J., and Tsai, L. H. (2012). MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learn. Mem.* 19, 359–368. doi: 10.1101/lm.026492.112
- Wang, W. X., Huang, Q., Hu, Y., Stromberg, A. J., and Nelson, P. T. (2011). Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter. *Acta Neuropathol.* 121, 193–205. doi: 10.1007/s00401-010-0756-0
- Yang, Z., Vilkaitis, G., Yu, B., Klimasauskas, S., and Chen, X., (2007). Approaches for studying microRNA and small interfering RNA methylation in vitro and in vivo. *Methods Enzymol.* 427, 139–154. doi: 10.1016/S0076-6879(07)27008-9

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 20 January 2014; paper pending published: 09 February 2014; accepted: 03 March 2014; published online: 20 March 2014.

Citation: Cosín-Tomás M, Alvarez-López MJ, Sanchez-Roige S, Lalanza JF, Bayod S, Sanfeliu C, Pallàs M, Escorihuela RM and Kaliman P (2014) Epigenetic alterations in hippocampus of SAMP8 senescent mice and modulation by voluntary physical exercise. *Front. Aging Neurosci.* 6:51. doi: 10.3389/fnagi.2014.00051

This article was submitted to the journal *Frontiers in Aging Neuroscience*.

Copyright © 2014 Cosín-Tomás, Alvarez-López, Sanchez-Roige, Lalanza, Bayod, Sanfeliu, Pallàs, Escorihuela and Kaliman. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Supplementary information

### S1. List of primers and probe sets used for real time RT-PCR analysis.

<b>Gene Symbol</b>	<b>Reference (ABI)</b>	<b>Reference Sequence ID</b>
<i>Bdnf</i>	Mm01334042_m1	NM_001048142.1
<i>Hdac1</i>	Mm02391771_g1	NM_008228.2
<i>Hdac2</i>	Mm00515108_m1	NM_008229.2
<i>Hdac3</i>	Mm00515916_m1	NM_010411.2
<i>Hdac5</i>	Mm01246076_m1	NM_001077696.1; NM_010412.3
<i>Hdac6</i>	Mm01341125_m1	NM_001130416.1; NM_010413.3
<i>Neuritin</i>	Mm00467844_m1	NM_153529.1
<i>P-300</i>	Mm00625535_m1	NM_177821.6
<i>Sirt1</i>	Mm00490758_m1	NM_001159589.1
<i>Tbp</i>	Mm00446971_m1	NM_013684.3
<i>TrkB</i>	Mm00435422_m1	NM_001025074.1, NM_008745.2

**S2.** Two-way ANOVA analysis results of hippocampal miRNAs found unaltered in 8-month-old SAMP8 mice compared with SAMR1 mice and unresponsive to the exercise intervention. miRNAs were quantified using the *Mouse Neurological Development & Disease miScript miRNA PCR Array*. *P* values <0.05 were considered statistically significant. Df stands for degrees of freedom.

	Exercise			Strain			Strain*exercise		
	df.	<i>F</i>	<i>p-value</i>	df.	<i>F</i>	<i>p-value</i>	df.	<i>F</i>	<i>p-value</i>
let-7b-5p	1, 12	0.007	0.935	1, 12	1.241	0.287	1, 12	0.086	0.774
let-7c-5p	1, 12	0.213	0.653	1, 12	3.818	0.074	1, 12	2.695	0.127
let-7d-5p	1, 12	0.217	0.650	1, 12	0.475	0.504	1, 12	0.906	0.360
let-7e-5p	1, 12	2.517	0.139	1, 12	1.369	0.265	1, 12	4.235	0.062
miR_9_3p	1, 10	0.117	0.739	1, 10	3.149	0.106	1, 10	1.034	0.333
miR-101a-3p	1, 12	1.113	0.312	1, 12	1.302	0.276	1, 12	0.664	0.431
miR-101b-3p	1, 11	0.440	0.521	1, 11	1.632	0.228	1, 11	0.762	0.401
miR-106b-5p	1, 12	0.012	0.915	1, 12	8.510	0.013	1, 12	5.092	0.043
miR-107-3p	1, 12	1.161	0.302	1, 12	4.130	0.065	1, 12	0.298	0.595
miR-124-3p	1, 12	1.455	0.251	1, 12	2.219	0.162	1, 12	1.565	0.235
miR-126a-5p	1, 12	5.759	0.034	1, 12	3.529	0.085	1, 12	0.475	0.504
miR-130a-3p	1, 12	4.584	0.053	1, 12	1.004	0.336	1, 12	0.153	0.702
miR-132-3p	1, 12	1.533	0.239	1, 12	0.559	0.469	1, 12	0.192	0.669
miR-134-5p	1, 9	0.243	0.634	1, 9	0.826	0.387	1, 9	0.678	0.432
miR-135b-5p	1, 12	0.952	0.349	1, 12	0.740	0.407	1, 12	0.274	0.610
miR-146a-5p	1, 11	0.048	0.830	1, 11	1.421	0.258	1, 11	0.007	0.935
miR-151-3p	1, 12	0.431	0.524	1, 12	5.011	0.045	1, 12	0.566	0.466
miR-152-3p	1, 12	1.967	0.186	1, 12	11.180	0.006	1, 12	0.446	0.517
miR-15a-5p	1, 12	1.000	0.337	1, 12	0.020	0.891	1, 12	0.441	0.519
miR-181c-5p	1, 12	0.903	0.361	1, 12	3.413	0.089	1, 12	0.659	0.433
miR-181d-5p	1, 12	0.135	0.719	1, 12	3.558	0.084	1, 12	0.535	0.478
miR-191-5p	1, 12	0.861	0.372	1, 12	3.607	0.082	1, 12	0.543	0.475
miR-193b-3p	1, 12	0.303	0.592	1, 12	1.005	0.336	1, 12	0.420	0.529
miR-195a-5p	1, 12	0.421	0.529	1, 12	3.717	0.078	1, 12	0.106	0.75
miR-19b-3p	1, 12	0.195	0.666	1, 12	2.186	0.165	1, 12	2.013	0.181
miR-203-3p	1, 12	0.091	0.768	1, 12	2.144	0.169	1, 12	0.365	0.557
miR-20a-5p	1, 12	0.326	0.578	1, 12	1.008	0.335	1, 12	0.108	0.748
miR-20b-5p	1, 11	1.400	0.262	1, 11	0.023	0.882	1, 11	1.377	0.265
miR-22-3p	1, 12	0.444	0.518	1, 12	1.515	0.242	1, 12	0.111	0.745
miR-24-3p	1, 12	1757	0.210	1, 12	4.517	0.055	1, 12	1.259	0.284
miR-26b-5p	1, 12	0.161	0.696	1, 12	0.076	0.788	1, 12	0.417	0.531
miR-27a-3p	1, 12	1.089	0.317	1, 12	0.008	0.931	1, 12	0.011	0.920
miR-298-5p	1, 12	0.902	0.361	1, 12	0.687	0.423	1, 12	0.424	0.527
miR-29b-3p	1, 12	0.836	0.379	1, 12	0.600	0.453	1, 12	0.756	0.402
miR-30d-5p	1, 12	0.005	0.947	1, 12	4.341	0.059	1, 12	0.086	0.774
miR-320-3p	1, 12	0.911	0.359	1, 12	0.391	0.543	1, 12	0.784	0.393
miR-328-3p	1, 12	0.394	0.542	1, 12	2.901	0.114	1, 12	1.181	0.298
miR-33-5p	1, 12	2.444	0.144	1, 12	0.600	0.453	1, 12	0.629	0.443
miR-338-3p	1, 12	0.407	0.536	1, 12	0.997	0.338	1, 12	0.524	0.483
miR-339-5p	1, 12	2.529	0.138	1, 12	1.778	0.207	1, 12	0.189	0.671
miR-346-5p	1, 12	0.659	0.433	1, 12	2.386	0.148	1, 12	1.115	0.312
miR-34a-5p	1, 12	5.557	0.036	1, 12	1.561	0.235	1, 12	0.111	0.745
miR-376b-3p	1, 12	0.002	0.969	1, 12	1.593	0.231	1, 12	1.002	0.337
miR-381-3p	1, 11	0.629	0.445	1, 11	1120	0.313	1, 11	0.437	0.522
miR-409-3p	1, 11	3233	0.100	1, 11	2890	0.117	1, 11	0.681	0.427
miR-433-3p	1, 10	18.826	0.001	1, 10	0.423	0.530	1, 10	2.022	0.185
miR-484	1, 12	1.307	0.275	1, 12	1.062	0.323	1, 12	1.058	0.324
miR-485-5p	1, 12	0.303	0.592	1, 12	4.768	0.050	1, 12	3.265	0.096
miR-485-3p	1, 12	1.683	0.219	1, 12	0.047	0.832	1, 12	0.276	0.609
miR-488-3p	1, 12	<0.001	0.991	1, 12	1.212	0.293	1, 12	0.232	0.639
miR-489-3p	1, 12	0.077	0.786	1, 12	2.737	0.124	1, 12	0.334	0.574
miR-598-3p	1, 12	2.951	0.112	1, 12	4.253	0.062	1, 12	1.745	0.211
miR-652-3p	1, 12	0.025	0.878	1, 12	0.005	0.946	1, 12	0.512	0.488
miR-9-5p	1, 12	0.089	0.771	1, 12	1.474	0.248	1, 12	0.205	0.659
miR-92a-3p	1, 11	0.568	0.467	1, 11	0.025	0.876	1, 11	0.003	0.957
miR-93-5p	1, 12	<0.001	0.998	1, 12	0.257	0.621	1, 12	0.362	0.558

\*MiR-302a-5p, miR-302b-5p and miR-509-3p were not detected by the real time PCR array. MiR-106b-5p, miR-126a-5p, miR-151-3p, miR-152-3p, miR-34a-5p and miR-433-3p data were excluded due to the presence of more than one outlier in the same group or due to marginal effects between groups.

**S3. Summarized functional information about microRNAs altered in 8-month-old SAMP8 mice.**

<b>Mature miRNA ID or Gene Symbol</b>	<b>miRBase or NCBI Accession No.</b>	<b>Reported role/targets in CNS and neurological disorders*</b>	<b>References</b>
<b>let-7i-(5p)</b>	MIMAT0000122	Downregulated in the white matter of the superior and middle temporal cortex of AD patients and in the anterior temporal cortex of AD patients. Targets <b>APP</b> .	(Hebert et al., 2008; Wang et al., 2011; Nix and Bastiani, 2013)
<b>mmu-miR-125b-(5p)</b>	MIMAT0000136	Implicated in cell proliferation, differentiation and migration in neural stem/progenitor cells by targeting <b>Nestin</b> . Targets <b>NR2A</b> (NMDA receptor subunit) mRNA in hippocampal neurons from mouse brain. Upregulated in AD hippocampus, cerebellum and cortex. Implicated in neurotrophic support, defense against reactive oxygen and nitrogen species and neuroprotection in the CNS.	(Lukiw, 2007; Lukiw and Pogue, 2007; Cogswell et al., 2008; Maes et al., 2009; Edbauer et al., 2010; Boissart et al., 2012; Cui et al., 2012; Zhao et al., 2013)
<b>mmu-miR-128-(3p)</b>	MIMAT0000140	Specific from neurons (cultures of embryonic neurons, mouse brain). Involved in neuronal differentiation and neurogenesis. Upregulated in AD hippocampus. Targets <b>Nicastrin (NCSTN)</b> , one component of the preseniline complex ( $\gamma$ -secretase activity).	(Lukiw, 2007; Evangelisti et al., 2009; Maes et al., 2009; Bruno et al., 2011; Mallick and Ghosh, 2011)
<b>mmu-miR-138-(5p)</b>	MIMAT0000150	Downregulated in the gray matter of cerebral cortex, in hippocampus and prefrontal cortex of AD patients. Associated with long-lasting forms of memory and involved in the control of dendritic spine morphogenesis.	(Siegel et al., 2009; Wang et al., 2011; Lau et al., 2013)
<b>mmu-miR-140-(5p)</b>	MIMAT0000151	Targets <b>EGR2</b> (transcription factor), modulating myelination in dorsal root ganglion and Schwann cell co-cultures. Downregulated in white matter from superior and middle temporal gyri from AD patients.	(Viader et al., 2011; Im and Kenny, 2012; Majer et al., 2012; Wang et al., 2012)
<b>mmu-miR-146b-(5p)</b>	MIMAT0000158	Downregulated in hippocampus, cortex, cerebellum and CSF of AD patients. Involved in innate immune response, induced by NF-kappaB.	(Cogswell et al., 2008; Braidy et al., 2011)

### S3 (continuation)

<b>mmu-miR-181a- (3p)</b>	MIMAT0000660	Regulated by dopamine. Involved in controlling <b>GLUA2</b> (AMPA receptor) surface expression in hippocampal neurons.	(Perkins et al., 2007;Saba et al., 2008;Beveridge et al., 2010;Wang et al., 2011)
<b>mmu-miR-181a- (5p)</b>	MIMAT0000210	Dysregulated in postmortem prefrontal cortex from schizophrenia patients. Downregulated in the white matter of the superior and middle temporal cortex of AD patients.	
<b>mmu-miR-342- (3p)</b>	MIMAT0000590	Downregulated in the gray matter of the superior and middle temporal cortex of AD patients. Upregulated in lymphoblastoid cell lines derived from Autism Spectrum Disorder patients. Regulated by MeCP2 in Rett syndrome.	(Saba et al., 2008;Sarachana et al., 2010;Urduingio et al., 2010;Wang et al., 2011)

**Abbreviations:** AD: Alzheimer Disease; A $\beta$ : beta-amyloid; miRNA: microRNA; Rb: Retinoblastoma protein; BACE1: beta-site APP-cleaving enzyme 1; CSF: Cerebrospinal fluid.

\* The microRNA information was collected from scientific works that reported the 3p/5p specification on the microRNA nomenclature applying the current nomenclature conventions, but also from older articles that did not.



**S4.** Summarized functional information about microRNAs regulated by 8 weeks of voluntary exercise in SAMP8 and SAMR1 mice.

Mature miRNA ID or Gene Symbol	miRBase or NCBI Accession No.	Reported role/targets in CNS and neurological disorders, and exercise regulation) *	References
<b>mmu-miR-7a-(5p)</b>	MIMAT0000677	Dysregulated in postmortem prefrontal cortex from schizophrenia patients (miR-7) and in the brain of a Rett syndrome mice model. Downregulated in the grey matter of the superior and middle temporal cortex of AD patients. Controls dopaminergic neurons phenotype of the adult mouse forebrain. Upregulated in human blood natural killer cells and blood mononuclear cells after an acute-aerobic exercise (running).	(Perkins et al., 2007;Beveridge et al., 2010;Wu et al., 2010;Wang et al., 2011;de Chevigny et al., 2012;Radom-Aizik et al., 2012;Radom-Aizik et al., 2013)
<b>mmu-miR-28a-(5p)</b>	MIMAT0000653	Upregulated in the cerebral cortex of a transgenic mouse model of AD.	(Wang et al., 2009)
<b>mmu-miR-98-(5p)</b>	MIMAT0000545	Downregulated in cerebellum from AD patients, in gray matter from the superior and middle temporal cortex in female AD patients and in mouse primary hippocampal neurons treated with A $\beta$ . Upregulated in the cerebral cortex of a transgenic mouse model of AD. Lower levels are associated with an alteration of the Rb/E2F pathway.	(Ranganathan et al., 2001;Cogswell et al., 2008;Wang et al., 2009;Schonrock et al., 2010;Wang et al., 2011;Sato, 2012)
<b>mmu-miR-105</b>	MIMAT0004856	Upregulated in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder.	(Perkins et al., 2007)
<b>mmu-miR-133b-(3p)</b>	MIMAT0000769	Involved in midbrain dopamine-secreting neurons development, neurite outgrowth and functional recovery after stroke. Dysregulated in the midbrain of Parkinson disease patients and in lymphoblastoid cell lines derived from autism spectrum disorder patients. Downregulated by aerobic exercise in both human and mouse myocytes.	(Nielsen et al., 2010;Sarachana et al., 2010;Soci et al., 2011;Mouradian, 2012;Xin et al., 2013)
<b>mmu-miR-148b-(3p)</b>	MIMAT0000580	Downregulated in lymphoblastoid cell lines derived from autistic spectrum disorder patients. Dysregulated in postmortem prefrontal cortex of schizophrenic patients. Downregulated in white matter from superior and middle temporal gyri from AD patients.	(Sarachana et al., 2010;Im and Kenny, 2012;Wang et al., 2012)

**Abbreviations:** AD: Alzheimer Disease; A $\beta$ : beta-amyloid; miRNA: microRNA; Rb: Retinoblastoma protein; BACE1: beta-site APP-cleaving enzyme 1; CSF: Cerebrospinal fluid.

\* The microRNA information was collected from scientific works that reported the 3p/5p specification on the microRNA nomenclature applying the current nomenclature conventions, but also from older articles that did not.

**S5.** Biological pathways for miRNAs significantly altered in sedentary SAMP8 compared with SAMR1 mice. Analysis was performed using DIANA mirPath v 2.1 and KEGG software (Vlachos et al., 2012). False discovery rate (FDR) method, a correction for multiple hypothesis testing, and a p-value threshold of 0.05 was used to perform the enrichment analysis.

**Biological pathways associated with miRNAs regulated by aging based on DIANA-mirPath analysis**

KEGG pathway	p-value	Number of target genes	miRNAs
Prion diseases	1.51E-14	8	7
PI3K-Akt signaling pathway	1.51E-14	82	10
Focal adhesion	1.51E-14	55	11
Acute myeloid leukemia	1.65E-14	22	8
ErbB signaling pathway	9.27E-14	30	9
mTOR signaling pathway	2.42E-13	24	10
Prostate cancer	3.15E-13	29	10
Dorso-ventral axis formation	5.97E-12	11	7
MAPK signaling pathway	3.16E-11	63	10
Mucin type O-Glycan biosynthesis	3.51E-11	12	8
Pathways in cancer	8.31E-11	73	11
Neurotrophin signaling pathway	1.12E-10	35	10
Chronic myeloid leukemia	2.40E-10	25	10
Non-small cell lung cancer	3.29E-10	21	9
TGF-beta signaling pathway	5.71E-10	27	10
Long-term potentiation	1.37E-09	22	9
Axon guidance	1.37E-09	39	11
Renal cell carcinoma	3.57E-09	25	11
Insulin signaling pathway	4.22E-09	36	11
Lysine degradation	4.26E-09	17	9
Pancreatic cancer	5.77E-09	23	9
Endometrial cancer	7.27E-09	18	8
Fc epsilon RI signaling pathway	4.66E-08	22	8
T cell receptor signaling pathway	5.87E-08	29	10
Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	9.57E-08	8	7
Bladder cancer	1.85E-07	15	9
Glioma	6.61E-07	21	9
Chagas disease (American trypanosomiasis)	9.70E-07	27	10
Thyroid cancer	1.46E-06	10	9
Protein processing in endoplasmic reticulum	2.66E-06	40	10
Toxoplasmosis	3.51E-06	27	10
Melanoma	4.92E-06	20	9
Fc gamma R-mediated phagocytosis	4.92E-06	23	10
Melanogenesis	4.92E-06	26	10
Other types of O-glycan biosynthesis	6.69E-06	10	8
Small cell lung cancer	6.69E-06	22	10
Regulation of actin cytoskeleton	7.47E-06	47	9
Ubiquitin mediated proteolysis	8.72E-06	34	11

## S5 (continuation)

KEGG pathway	p-value	Number of target genes	miRNAs
Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate	2.19E-05	6	6
Osteoclast differentiation	2.23E-05	28	9
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	2.45E-05	21	9
Wnt signaling pathway	3.61E-05	37	11
Transcriptional misregulation in cancer	1.19E-04	40	11
Amoebiasis	1.95E-04	25	8
ECM-receptor interaction	3.47E-04	20	8
p53 signaling pathway	4.00E-04	17	8
Sphingolipid metabolism	4.65E-04	14	7
Dopaminergic synapse	4.67E-04	30	9
Hedgehog signaling pathway	5.19E-04	13	7
SNARE interactions in vesicular transport	5.19E-04	10	8
Hepatitis C	6.90E-04	28	9
B cell receptor signaling pathway	7.30E-04	18	9
GnRH signaling pathway	8.11E-04	20	7
Glutamatergic synapse	8.11E-04	26	8
Dilated cardiomyopathy	1.09E-03	20	9
Colorectal cancer	1.46E-03	17	9
Hepatitis B	1.49E-03	33	11
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	1.82E-03	14	8
HTLV-I infection	2.05E-03	52	11
Pertussis	2.47E-03	17	8
VEGF signaling pathway	2.75E-03	15	10
Apoptosis	2.78E-03	19	8
NOD-like receptor signaling pathway	3.61E-03	15	10
Long-term depression	4.29E-03	15	9
Protein digestion and absorption	5.27E-03	18	9
Steroid biosynthesis	1.03E-02	6	6
Progesterone-mediated oocyte maturation	1.04E-02	18	9
Calcium signaling pathway	1.08E-02	33	9
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1.10E-02	9	4
Cholinergic synapse	1.15E-02	24	9
Notch signaling pathway	1.39E-02	11	9
Phosphatidylinositol signaling system	1.40E-02	17	9
Amphetamine addiction	1.47E-02	17	7
Circadian rhythm	1.47E-02	9	8
Gap junction	1.66E-02	19	9
Chemokine signaling pathway	1.69E-02	34	11
Adherens junction	2.07E-02	20	10
Taurine and hypotaurine metabolism	2.51E-02	3	2
Toll-like receptor signaling pathway	2.54E-02	19	8
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	2.62E-02	9	8
mRNA surveillance pathway	2.62E-02	20	9
Influenza A	3.10E-02	30	10

**S5 (continuation)**

<b>KEGG pathway</b>	<b>p-value</b>	<b>Number of target genes</b>	<b>miRNAs</b>
HIF-1 signaling pathway	3.16E-02	22	9
Salmonella infection	3.16E-02	15	8
Basal cell carcinoma	3.47E-02	12	9
Endocytosis	3.56E-02	39	11
N-Glycan biosynthesis	3.90E-02	11	7
Jak-STAT signaling pathway	4.28E-02	27	11

**S6.** Biological pathways for miRNAs significantly modulated by exercise. Analysis was performed using DIANA mirPath v 2.1 and KEGG software (Vlachos et al., 2012). False discovery rate (FDR) method, a correction for multiple hypothesis testing, and a p-value threshold of 0.05 was used to perform the enrichment analysis.

**Biological pathways associated with miRNAs regulated by exercise based on DIANA-mirPath analysis**

KEGG pathway	p-value	Number of target genes	miRNAs
PI3K-Akt signaling pathway	1.73E-15	57	5
ECM-receptor interaction	1.52E-10	17	4
Amoebiasis	2.07E-09	22	5
Regulation of actin cytoskeleton	7.46E-09	35	5
Chronic myeloid leukemia	9.15E-09	17	6
Hedgehog signaling pathway	2.60E-08	13	4
TGF-beta signaling pathway	1.12E-07	17	6
Focal adhesion	2.66E-07	31	6
Melanoma	7.87E-07	15	5
Acute myeloid leukemia	1.50E-06	13	5
Pathways in cancer	3.76E-06	45	6
mTOR signaling pathway	7.53E-06	13	5
Insulin signaling pathway	7.53E-06	22	6
Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	1.21E-05	5	4
Adherens junction	1.95E-05	16	5
Pancreatic cancer	5.75E-05	13	5
Basal cell carcinoma	5.75E-05	11	5
HTLV-I infection	5.75E-05	36	6
Endometrial cancer	7.21E-05	11	5
Dilated cardiomyopathy	7.30E-05	15	5
Protein processing in endoplasmic reticulum	7.30E-05	25	6
Melanogenesis	1.02E-04	16	5
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	1.03E-04	14	5
Prostate cancer	1.15E-04	15	5
MAPK signaling pathway	1.18E-04	33	6
Fc gamma R-mediated phagocytosis	1.34E-04	15	6
Protein digestion and absorption	2.02E-04	14	5
Basal transcription factors	3.58E-04	9	4
Axon guidance	4.28E-04	22	6
ErbB signaling pathway	6.64E-04	14	5
Glioma	6.91E-04	12	5
Salmonella infection	9.56E-04	12	4
Adipocytokine signaling pathway	1.31E-03	11	4
Chagas disease (American trypanosomiasis)	1.35E-03	16	5

## S6 (continuation)

KEGG pathway	p-value	Number of target genes	miRNAs
Non-small cell lung cancer	1.52E-03	10	5
Long-term potentiation	1.52E-03	11	6
Dorso-ventral axis formation	3.34E-03	5	4
Bacterial invasion of epithelial cells	5.82E-03	10	4
Small cell lung cancer	6.59E-03	12	5
Salivary secretion	8.69E-03	11	4
Colorectal cancer	1.18E-02	10	5
Regulation of autophagy	2.15E-02	6	4
Chemokine signaling pathway	2.48E-02	21	6
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2.74E-02	1	1
Calcium signaling pathway	2.74E-02	20	5
Lysine degradation	2.88E-02	7	5
Hepatitis C	2.88E-02	16	5
Transcriptional misregulation in cancer	2.88E-02	21	6
Gastric acid secretion	3.14E-02	10	5
Proximal tubule bicarbonate reclamation	3.29E-02	4	3
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	4.41E-02	6	4
GnRH signaling pathway	4.41E-02	11	5
Jak-STAT signaling pathway	4.66E-02	17	5
Vasopressin-regulated water reabsorption	4.66E-02	7	5

## References S3 and S4

- Beveridge, N.J., Gardiner, E., Carroll, A.P., Tooney, P.A., and Cairns, M.J. (2010). Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol Psychiatry* 15, 1176-1189. doi: 10.1038/mp.2009.84.
- Boissart, C., Nissan, X., Giraud-Triboulet, K., Peschanski, M., and Benchoua, A. (2012). miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development* 139, 1247-1257. doi: 10.1242/dev.073627.
- Braidy, N., Guillemin, G.J., Mansour, H., Chan-Ling, T., Poljak, A., and Grant, R. (2011). Age related changes in NAD<sup>+</sup> metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One* 6, e19194. doi: 10.1371/journal.pone.0019194.
- Bruno, I.G., Karam, R., Huang, L., Bhardwaj, A., Lou, C.H., Shum, E.Y., Song, H.W., Corbett, M.A., Gifford, W.D., Gecz, J., Pfaff, S.L., and Wilkinson, M.F. (2011). Identification of a microRNA that activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay. *Mol Cell* 42, 500-510. doi: 10.1016/j.molcel.2011.04.018.
- Cogswell, J.P., Ward, J., Taylor, I.A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., Kelnar, K., Kempainen, J., Brown, D., Chen, C., Prinjha, R.K., Richardson, J.C., Saunders, A.M., Roses, A.D., and Richards, C.A. (2008). Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis* 14, 27-41.
- Cui, Y., Xiao, Z., Han, J., Sun, J., Ding, W., Zhao, Y., Chen, B., Li, X., and Dai, J. (2012). MiR-125b orchestrates cell proliferation, differentiation and migration in neural stem/progenitor cells by targeting Nestin. *BMC Neurosci* 13, 116. doi: 10.1186/1471-2202-13-116.
- De Chevigny, A., Core, N., Follert, P., Gaudin, M., Barbry, P., Beclin, C., and Cremer, H. (2012). miR-7a regulation of Pax6 controls spatial origin of forebrain dopaminergic neurons. *Nat Neurosci* 15, 1120-1126. doi: 10.1038/nn.3142.
- Edbauer, D., Neilson, J.R., Foster, K.A., Wang, C.F., Seeburg, D.P., Batterton, M.N., Tada, T., Dolan, B.M., Sharp, P.A., and Sheng, M. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* 65, 373-384. doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.005.
- Evangelisti, C., Florian, M.C., Massimi, I., Dominici, C., Giannini, G., Galardi, S., Bue, M.C., Massalini, S., Mcdowell, H.P., Messi, E., Gulino, A., Farace, M.G., and Ciafre, S.A. (2009). MiR-128 up-regulation inhibits Reelin and DCX expression and reduces neuroblastoma cell motility and invasiveness. *FASEB J* 23, 4276-4287. doi: 10.1096/fj.09-134965.
- Hebert, S.S., Horre, K., Nicolai, L., Papadopoulou, A.S., Mandemakers, W., Silahdaroglu, A.N., Kauppinen, S., Delacourte, A., and De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6415-6420. doi: 10.1073/pnas.0710263105.
- Im, H.I., and Kenny, P.J. (2012). MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci* 35, 325-334. doi: 10.1016/j.tins.2012.01.004.
- Lau, P., Bossers, K., Janky, R., Salta, E., Frigerio, C.S., Barbash, S., Rothman, R., Sierksma, A.S., Thathiah, A., Greenberg, D., Papadopoulou, A.S., Achsel, T., Ayoubi, T., Soreq, H., Verhaagen, J., Swaab, D.F., Aerts, S., and De Strooper, B. (2013). Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 5, 1613-1634. doi: 10.1002/emmm.201201974.

- Lukiw, W.J. (2007). Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* 18, 297-300. doi: 10.1097/WNR.0b013e3280148e8b.
- Lukiw, W.J., and Pogue, A.I. (2007). Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells. *J Inorg Biochem* 101, 1265-1269. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2007.06.004.
- Maes, O.C., Chertkow, H.M., Wang, E., and Schipper, H.M. (2009). MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Curr Genomics* 10, 154-168. doi: 10.2174/138920209788185252.
- Majer, A., Medina, S.J., Niu, Y., Abrenica, B., Manguiat, K.J., Frost, K.L., Philipson, C.S., Sorensen, D.L., and Booth, S.A. (2012). Early mechanisms of pathobiology are revealed by transcriptional temporal dynamics in hippocampal CA1 neurons of prion infected mice. *PLoS Pathog* 8, e1003002. doi: 10.1371/journal.ppat.1003002.
- Mallick, B., and Ghosh, Z. (2011). A complex crosstalk between polymorphic microRNA target sites and AD prognosis. *RNA Biol* 8, 665-673. doi: 10.4161/rna.8.4.15584.
- Mouradian, M.M. (2012). MicroRNAs in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 46, 279-284. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.046.
- Nielsen, S., Scheele, C., Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, A.R., Pedersen, B.K., and Laye, M.J. (2010). Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 588, 4029-4037. doi: 10.1113/jphysiol.2010.189860.
- Nix, P., and Bastiani, M. (2013). Neuroscience. Heterochronic genes turn back the clock in old neurons. *Science* 340, 282-283. doi: 10.1126/science.1237921.
- Perkins, D.O., Jeffries, C.D., Jarskog, L.F., Thomson, J.M., Woods, K., Newman, M.A., Parker, J.S., Jin, J., and Hammond, S.M. (2007). microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biol* 8, R27. doi: 10.1186/gb-2007-8-2-r27.
- Radom-Aizik, S., Zaldivar, F., Haddad, F., and Cooper, D.M. (2013). Impact of brief exercise on peripheral blood NK cell gene and microRNA expression in young adults. *J Appl Physiol* 114, 628-636. doi: 10.1152/jappphysiol.01341.2012.
- Radom-Aizik, S., Zaldivar, F., Jr., Leu, S.Y., Adams, G.R., Oliver, S., and Cooper, D.M. (2012). Effects of exercise on microRNA expression in young males peripheral blood mononuclear cells. *Clin Transl Sci* 5, 32-38. doi: 10.1111/j.1752-8062.2011.00384.x.
- Ranganathan, S., Scudiere, S., and Bowser, R. (2001). Hyperphosphorylation of the retinoblastoma gene product and altered subcellular distribution of E2F-1 during Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Alzheimers Dis* 3, 377-385.
- Saba, R., Goodman, C.D., Huzarewich, R.L., Robertson, C., and Booth, S.A. (2008). A miRNA signature of prion induced neurodegeneration. *PLoS One* 3, e3652. doi: 10.1371/journal.pone.0003652.
- Sarachana, T., Zhou, R., Chen, G., Manji, H.K., and Hu, V.W. (2010). Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. *Genome Med* 2, 23. doi: 10.1186/gm144.
- Satoh, J. (2012). Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Exp Neurol* 235, 436-446. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.09.003.



- Schonrock, N., Ke, Y.D., Humphreys, D., Staufenbiel, M., Ittner, L.M., Preiss, T., and Gotz, J. (2010). Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid-beta. *PLoS One* 5, e11070. doi: 10.1371/journal.pone.0011070.
- Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P.F., Busch, C.J., Kane, C., Hubel, K., Dekker, F., Hedberg, C., Rengarajan, B., Drepper, C., Waldmann, H., Kauppinen, S., Greenberg, M.E., Draguhn, A., Rehmsmeier, M., Martinez, J., and Schratt, G.M. (2009). A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol* 11, 705-716. doi: 10.1038/ncb1876.
- Soci, U.P., Fernandes, T., Hashimoto, N.Y., Mota, G.F., Amadeu, M.A., Rosa, K.T., Irigoyen, M.C., Phillips, M.I., and Oliveira, E.M. (2011). MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics* 43, 665-673. doi: 10.1152/physiolgenomics.00145.2010.
- Urduinguio, R.G., Fernandez, A.F., Lopez-Nieva, P., Rossi, S., Huertas, D., Kulis, M., Liu, C.G., Croce, C.M., Calin, G.A., and Esteller, M. (2010). Disrupted microRNA expression caused by Mecp2 loss in a mouse model of Rett syndrome. *Epigenetics* 5, 656-663. doi: 10.4161/epi.5.7.13055.
- Viader, A., Chang, L.W., Fahrner, T., Nagarajan, R., and Milbrandt, J. (2011). MicroRNAs modulate Schwann cell response to nerve injury by reinforcing transcriptional silencing of dedifferentiation-related genes. *J Neurosci* 31, 17358-17369. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3931-11.2011.
- Vlachos, I.S., Kostoulas, N., Vergoulis, T., Georgakilas, G., Reczko, M., Maragkakis, M., Paraskevopoulou, M.D., Prionidis, K., Dalamagas, T., and Hatzigeorgiou, A.G. (2012). DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res* 40, W498-504. doi: 10.1093/nar/gks494.
- Wang, W., Kwon, E.J., and Tsai, L.H. (2012). MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learn Mem* 19, 359-368. doi: 10.1101/lm.026492.112.
- Wang, W.X., Huang, Q., Hu, Y., Stromberg, A.J., and Nelson, P.T. (2011). Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter. *Acta Neuropathol* 121, 193-205. doi: 10.1007/s00401-010-0756-0.
- Wang, X., Liu, P., Zhu, H., Xu, Y., Ma, C., Dai, X., Huang, L., Liu, Y., Zhang, L., and Qin, C. (2009). miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Res Bull* 80, 268-273. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.08.006.
- Wu, H., Tao, J., Chen, P.J., Shahab, A., Ge, W., Hart, R.P., Ruan, X., Ruan, Y., and Sun, Y.E. (2010). Genome-wide analysis reveals methyl-CpG-binding protein 2-dependent regulation of microRNAs in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18161-18166. doi: 10.1073/pnas.1005595107.
- Xin, H., Li, Y., Liu, Z., Wang, X., Shang, X., Cui, Y., Gang Zhang, Z., and Chopp, M. (2013). Mir-133b Promotes Neural Plasticity and Functional Recovery after Treatment of Stroke with Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Rats Via Transfer of Exosome-Enriched Extracellular Particles. *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.1409.
- Zhao, Y., Bhattacharjee, S., Jones, B.M., Hill, J., Dua, P., and Lukiw, W.J. (2013). Regulation of Neurotropic Signaling by the Inducible, NF-kB-Sensitive miRNA-

125b in Alzheimer's Disease (AD) and in Primary Human Neuronal-Glial (HNG) Cells. *Mol Neurobiol.* doi: 10.1007/s12035-013-8595-3.

## **DISCUSIÓN**

---



Este trabajo de tesis se centró en el que sin duda es uno de los temas más complejos desde el punto de vista social, económico y biomédico de nuestro siglo: el envejecimiento. En este contexto, los diferentes objetivos planteados han abarcado temáticas como la enfermedad de Alzheimer, la epigenética y el estilo de vida saludable.

El envejecimiento es uno de los principales ejes de la investigación científica actual. Los datos poblacionales más recientes muestran un patrón de pirámide poblacional cada vez más envejecido y como consecuencia la proporción de patologías asociadas a este proceso ha aumentado significativamente. Este hecho provoca un alto porcentaje de situaciones de dependencia o semi-dependencia en la población envejecida y mayores costes económicos a nivel sanitario. Todo ello conduce a la necesidad de buscar estrategias terapéuticas que permitan prevenir o retrasar algunos de los síntomas y/o patologías asociadas al envejecimiento, mejorando así la calidad de vida del individuo. Entre estas estrategias destacan los denominados hábitos de vida saludables, que incluyen dieta, actividad física, estimulación cognitiva y estrategias de reducción del estrés, entre otros.

El ejercicio físico fue una de las primeras actividades recomendadas y la más aceptada e incorporada actualmente en nuestra sociedad. Hoy en día es habitual ver personas corriendo por los parques de nuestra ciudad, utilizando la bicicleta como entrenamiento o incluso medio de transporte habitual, entrenando de manera regular en gimnasios, piscinas y otros centros deportivos. Esto es en parte el resultado de la divulgación a través de los medios de comunicación y a las recomendaciones de las autoridades de salud pública sobre los beneficios asociados a la práctica de ejercicio regular, derivados en gran medida de los esfuerzos científicos realizados al respecto.

Por otro lado, desde que en 1942 Conrad Waddington definió por primera vez la epigenética, el interés en este fenómeno ha ido aumentando exponencialmente en la comunidad científica. Se ha visto que la influencia de este tipo de regulación se extiende a todos los procesos celulares y funciones biológicas, y el hecho de que el entorno y los hábitos de estilo de vida ejerzan una influencia en la modulación epigenética abre un nuevo campo en la investigación relacionada con la prevención y el retraso en la aparición de enfermedades crónicas.

## **El modelo SAMP8: ventajas y limitaciones**

Para estudiar los efectos del ejercicio y su posible modulación epigenética durante el proceso de envejecimiento, en esta tesis escogimos como modelo los ratones SAMP8. Esta cepa de ratón presenta rasgos de envejecimiento espontáneos y prematuros, incluyendo déficits cognitivos, algunos de los cuales son similares a los observados en patologías como la EA.

A diferencia de los modelos transgénicos de experimentación donde las causas del fenotipo se asocian a alteraciones en genes específicos, las causas y alteraciones concretas que producen el fenotipo observado en los ratones SAMP8 no están completamente descritas y probablemente sean multifactoriales, como ocurre durante el proceso de envejecimiento en humanos. Desde este punto de vista, el modelo SAMP8 podría considerarse más integrador que los modelos transgénicos. Sin embargo, la utilización de este modelo espontáneo de envejecimiento también supone una limitación en el momento de explicar los resultados obtenidos, ya que frente a multitud de variables que desconocemos, resulta complejo discernir entre las causas y las consecuencias de un determinado fenotipo.

Otra de las limitaciones del modelo escogido es el control utilizado. Se acepta el uso de los ratones SAMR1 como cepa control ya que ambos surgieron de la misma colonia original y por tanto son similares genéticamente. Sin embargo, el establecimiento de cada una de estas cepas (P8 y R1) mediante cruzamiento entre hermanos puede dar una deriva genética en las mismas, que tan solo es posible identificar por el fenotipo observado o durante el análisis de los resultados obtenidos tras el estudio.

## Inflammaging y epigenética, ¿causa o consecuencia del envejecimiento?

El concepto de *inflammaging* explica los cambios moleculares y fisiológicos en el sistema inmune que se producen a medida que avanza el ciclo vital de un individuo. En nuestro estudio hemos observado un entorno proinflamatorio en astrocitos de ratones SAMP8, en concreto un aumento en la expresión de *Il-6* en ratones neonatos, comparados con los ratones control SAMR1. Esta alteración está probablemente relacionada con el fenotipo de envejecimiento acelerado y déficits cognitivos de los ratones SAMP8, aunque nuestros resultados no permiten dilucidar si el aumento de este marcador inflamatorio está en el origen del fenotipo de este modelo o es consecuencia de otros mecanismos subyacentes. Asimismo, hemos observado mayores niveles de IL-6 en plasma de ratones SAMP8 adultos de 12 meses de edad en los cuales también observamos una respuesta inflamatoria exacerbada frente a LPS. Este conjunto de datos nos permitió identificar IL-6 como un biomarcador inflamatorio persistente durante el ciclo vital de los ratones SAMP8. Un hallazgo particularmente interesante fue que la causa del aumento de IL-6 se encontró directamente asociada a los niveles de expresión de un factor de remodelación de cromatina, el correpresor de REST, RCOR2. Estos resultados nos permitieron integrar los conceptos *inflammaging* y epigenética en nuestro estudio. De hecho, observamos una sorprendente y marcada reducción en la expresión de la isoforma *Rcor2* en el modelo SAMP8 respecto a su control SAMR1 en varios tipos celulares y tejidos analizados, entre ellos linfocitos y astrocitos, hipocampo y corteza cerebral. Además, en linfocitos observamos la reducción de *Rcor2* desde edades muy tempranas, mucho antes de que se produzca la manifestación del fenotipo senescente. Asimismo, en cultivos de astrocitos provenientes de ratones SAMP8 neonatos, los niveles de expresión de *Rcor2* también fueron menores. Estos resultados sugieren la posible implicación de RCOR2 en el fenotipo senescente de los ratones SAMP8.

El hecho de hallar una correlación negativa entre *Il-6* y *Rcor2*, tanto *in vivo* como *in vitro*, nos hizo plantearnos la existencia de una posible asociación entre ambos factores ya que, por un lado la inflamación crónica se ha asociado al desarrollo prematuro y la aceleración de enfermedades neurodegenerativas como la EA [737, 738], y por el otro el

factor RCOR forma parte del complejo de silenciamiento transcripcional de REST (*RE1-silencing transcription factor*) [739], el cual se ha visto implicado recientemente en la preservación de las funciones cognitivas y longevidad en humanos de edad avanzada [690]. Por ello, analizamos el efecto del silenciamiento del gen *Rcor2* sobre la expresión de *Il-6* en cultivos de astrocitos, células que ejercen un papel principal en el metabolismo y homeostasis y defensa inmune en cerebro [740]. Así, confirmamos el efecto sinérgico de la inflamación en respuesta a LPS y la reducción de *Rcor2*, sobre el aumento de expresión de *Il-6*.

Un dato que revela la complejidad en la regulación epigenética de la inflamación en nuestro modelo, es que el tratamiento con LPS *per se* redujo los niveles de *Rcor2*, evidenciando la existencia de una relación inversa entre inflamación y RCOR2 que produciría una retroalimentación del sistema, activándolo aún más (ver figura 3).

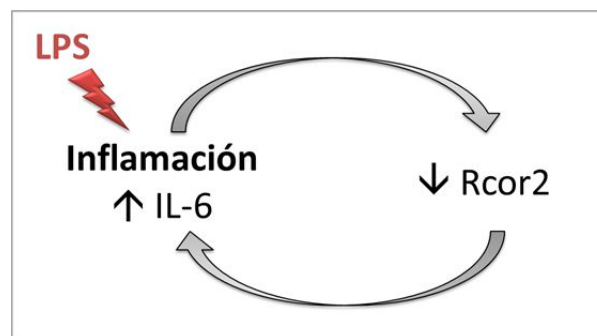


Figura 3. Relación entre *Rcor2* e inflamación en astrocitos del modelo SAMP8.

A partir de estos datos, creemos que es necesario extender el estudio de la relación entre RCOR2 e inflamación en otros modelos animales y en humanos ya que podría representar una diana terapéutica en la prevención o tratamiento de procesos de inflamación crónica y neurodegeneración asociados a envejecimiento.



## El papel de la remodelación de cromatina en longevidad y senescencia

Nuestros resultados también nos han permitido relacionar RCOR2, neuroinflamación y envejecimiento prematuro con el estado de metilación de la cromatina. Basamos esta hipótesis en varias observaciones. El complejo de REST, del cual forma parte RCOR2, ejerce un papel remodelador del estado de la cromatina e incluye enzimas demetiladoras de histonas como LSD1 [310]. La disminución de *Rcor2* en ratones SAMP8 podría provocar una alteración en la actividad del complejo REST y por lo tanto un aumento en la metilación de la lisina 4 de histona H3. Esta hipótesis es consistente con el aumento en los niveles de trimetilación en lisina 4 de histona H3 global que detectamos en linfocitos, hipocampo y corteza cerebral de ratones SAMP8 de edad avanzada. Este posible mecanismo implicando factores de remodelación de cromatina, como el complejo REST, también se ve indirectamente apoyado por los resultados que obtuvimos en células gliales que muestran que la sobreexpresión de *Il-6* en respuesta a un estímulo inflamatorio es dependiente a la vez de RCOR2 y de la presencia de actividad metiltransferasa. Estas observaciones nos motivaron a comenzar a caracterizar los niveles de expresión de las principales enzimas y cofactores asociados al complejo de REST y otros factores remodeladores de cromatina en el modelo senescente SAMP8 y su control SAMR1, trabajo del que se muestran resultados preliminares aún no publicados en el capítulo 1 del apartado de Resultados. Entre los datos a destacar hasta el momento, encontramos reducidos los niveles de enzimas demetiladoras *Lsd1* y *G9a* presentes en el complejo de REST. Esta reducción, unida a la hallada para *Rcor2*, sugiere que la funcionalidad del complejo podría estar afectada lo cual podría dar como resultado alteraciones en diferenciación neuronal y plasticidad [715-718]. Además, se ha descrito la implicación de *G9a* en la regulación de la enzima neprilisina [705], una de las principales responsables de la eliminación de los depósitos de A $\beta$  en cerebro y diana terapéutica muy prometedora en el tratamiento de la EA [719], indicando que éste podría ser otro de los mecanismos moleculares subyacentes en el fenotipo neurodegenerativo observado en los ratones SAMP8.

---

También se vieron reducidas demetilasas *Jarid1a* y *Jarid1b*, homólogas a la demetilasa *rbr-2* de *C. elegans*, la cual Greer y sus colaboradores han identificado como determinante en la regulación de la longevidad y del aumento en los niveles de trimetilación en H3 lisina 4 en este organismo [448, 449]. Todos estos resultados nos indican la necesidad de seguir investigando el papel del complejo REST, del estado de metilación de histona H3 y del efecto de los factores y cofactores reguladores del mismo, así como de otros implicados en remodelación de cromatina sobre los procesos de envejecimiento y longevidad, y su posible implicación en *inflammaging*.

## La matriz extracelular, diana del ejercicio físico en cerebro

Los beneficios del ejercicio físico sobre la cognición son un tema de creciente interés debido al número alarmante de personas que sufren deterioro cognitivo asociado al envejecimiento y demencias. Durante este trabajo de tesis nos interesamos en los efectos transcripcionales y epigenéticos del ejercicio físico en el cerebro utilizando el modelo SAMP8 de envejecimiento y EA. Tras una intervención de seis meses de ejercicio voluntario y moderado realizamos *microarrays* de expresión de hipocampo que nos permitieron identificar genes marcadores de envejecimiento y sensibles a la intervención de ejercicio físico. Dicho grupo de genes mostraba niveles alterados en SAMP8 comparados con SAMR1 (control) pero recuperaban los niveles de expresión del grupo control en respuesta al ejercicio físico. El análisis bioinformático de vías de señalización de este conjunto de genes reveló que uno de los procesos biológicos más afectado en el hipocampo de los ratones SAMP8 es el mantenimiento de la matriz extracelular y numerosos genes de esta vía demostraron ser sensibles al ejercicio físico. Este es un resultado de gran interés puesto que la matriz extracelular representa el soporte físico para la función, homeostasis y supervivencia neuronal y en modelos de neurodegeneración y EA se han descrito alteraciones en algunos de los genes que la mantienen [727, 728]. De hecho, las vías relacionadas con matriz extracelular también aparecieron alteradas en los análisis que llevamos a cabo en corteza cerebral de estos mismos animales (resultados no publicados), sugiriendo que se trata de una vía particularmente sensible al envejecimiento y en cierto grado modulable por ejercicio físico en cerebro.

Nuestro estudio no reprodujo algunos de los resultados de estudios previos de expresión génica en cerebro también realizados en el modelo SAMP8. Por ejemplo el realizado por Sakurai y sus colaboradores [658] en el cual identificaron el gen *Lztf11* (*leucine zipper transcription factor-like protein 1*) como sensible al ejercicio en SAMP8 de 2 meses de edad, que en nuestro trabajo no se ha visto modificado. En el estudio de Cheng y colaboradores [741] se identificó una reducción en los niveles de *Dusp12* (*Dual specificity protein phosphatase, 12*) en hembras de 12 meses de edad, enzima implicada en supervivencia celular y biogénesis ribosomal [742], que en nuestro caso tampoco se vio alterada. Casadesus y colaboradores [743] no hallaron diferencias entre SAMP8 y SAMR1 en el patrón de expresión de 62 genes. Dos de entre ellos mostraron

diferencias entre cepas en nuestro estudio, una reducción en la expresión de *Park2* (E3 ubiquitin ligasa, implicada en metabolismo lipídico, alterada en pacientes de Parkinson [744]) y un aumento de *Gfra1* (*glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor  $\alpha$ -1*), que promueve la supervivencia celular en neuronas hipocampales [745]), aunque ninguno de estos dos genes se vio modificado por el ejercicio. Estas diferencias entre nuestros resultados y algunos trabajos previos podrían explicarse por la variabilidad en edad y sexo de los animales y en las condiciones experimentales utilizadas, además de las propias limitaciones de sensibilidad y reproducibilidad que presenta la técnica de microarrays.

Entre los genes que identificamos mediante microarrays y validamos por Real Time PCR destacamos *Colla1* y *Colla2* (*collagen type 1 alpha 1*, y 2), aumentados en la cepa senescente. La alteración de estos genes podría tener un papel importante en el deterioro cognitivo de nuestro modelo, ya que se ha visto que un aumento en el contenido de colágeno en cerebro se asocia a una reducción en el volumen hipocampal en el modelo transgénico 3xTg para la EA [746]. Además, se sabe que el péptido A $\beta$ PP puede interactuar directamente con diferentes tipos de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, y algunos tipos de colágeno (XXV y XVIII) se han encontrado presentes en las propias placas amiloideas [747, 748]. Otro de los genes alterados, *Fmod* (fibromodulin) es un proteoglicano implicado en la regulación y mantenimiento de la matriz extracelular, y se ha asociado con la progresión de glioblastomas [749]. Además, este tipo de proteoglicanos parecen fomentar la formación de agregados de A $\beta$  y placas seniles en la EA [750]. *Pgds* (*prostaglandin D(2) synthase*) es un gen que se expresa en astrocitos y oligodendrocitos [751] y es marcador de envejecimiento en líquido cefalorraquídeo [752], y también aparece alterado en la cepa SAMP8 en nuestro estudio. Finalmente, el gen *Aldh1a2* (*aldehyde dehydrogenase*), necesario para la síntesis del ácido retinoico, se ha descrito implicado en las alteraciones en neurogénesis y la realización de tareas cognitivas tanto cuando su expresión es reducida [753] como aumentada [754]. La intervención de ejercicio físico moderado revirtió los cambios observados en todos estos genes en la cepa senescente SAMP8 alcanzando los niveles de expresión detectados en los controles SAMR1.

---

Estos resultados nos muestran los beneficios de una intervención de ejercicio físico moderado sobre alteraciones presentes en cerebro de un modelo senescente, y destacan la posible utilidad del ejercicio físico moderado como complemento en el tratamiento de declive cognitivo y neurodegeneración.

## Mejoras del ejercicio físico y su relación con la vía de BDNF

La intervención de ejercicio físico en ratones SAMP8 provocó mejoras a nivel fenotípico (como el color de la piel y el temblor físico) y, en hipocampo, un aumento en el grado de vascularización y en la expresión de factores neurotróficos. Algunos trabajos describen una reducción en los procesos angiogénicos en relación a los depósitos de péptido A $\beta$  en cerebros afectados por la EA [755, 756], aunque existe algo de controversia ya que también se ha descrito mayor angiogénesis en ciertas regiones cerebrales de pacientes de la EA [757]. Recientemente se ha descrito que el ejercicio parece fomentar cierta plasticidad vascular en cerebro de ratones hembra de edad media [758]. Nuestros resultados corroboran estos datos, se hallaron menores niveles de vascularización en el modelo senescente, los cuales fueron aumentados en respuesta a la intervención de ejercicio físico moderado.

Por otro lado, estudios previos han descrito que durante el envejecimiento y en modelos de patologías neurodegenerativas como la EA, se produce una disminución de la neurotrofina BDNF y de otros componentes de su vía de señalización como el receptor TrkB [722-726, 759]. La expresión de BDNF es particularmente sensible a la práctica de ejercicio físico que según numerosos estudios, provoca aumentos en su expresión génica y proteica [658, 720, 760]. Nuestros resultados demuestran que los ratones SAMP8 presentan niveles reducidos de expresión de componentes de la vía de BDNF, algunos de los cuales (BDNF, TrkB y neuritina) recuperan valores de expresión normales en respuesta a intervenciones de ejercicio físico voluntario cortas (8 semanas) o de mayor duración (6 meses) y en animales mantenidos en grupo o aislados. En particular, neuritina, actúa en procesos de supervivencia neuronal, plasticidad sináptica y neurogénesis [736] y es una diana prometedora en el tratamiento de patologías asociadas a declive cognitivo y la EA [761].

Estos datos confirman que una de las vías a través de las cuales se producen los efectos positivos del ejercicio físico sobre el cerebro en un contexto de envejecimiento prematuro y declive cognitivo es la vía de BDNF e identifican a este factor neurotrófico como un excelente marcador de la eficacia de intervenciones basadas en ejercicio.

## Epigenética y estilo de vida

Muchos de los cambios observados durante el proceso de envejecimiento [42, 729] y en respuesta al ejercicio físico [668, 676, 720, 762, 763] se han asociado con la aparición de modificaciones epigenéticas. En este trabajo de tesis, caracterizamos la expresión de un grupo de factores remodeladores de cromatina en nuestro modelo animal de envejecimiento y su posible modulación por el ejercicio físico. Identificamos cambios en los niveles de expresión de varios microARNs en la cepa senescente respecto a su control, los cuales se han asociado previamente a enfermedades neurológicas y desarrollo neuronal, como por ejemplo miR-30e-5p [408, 764], miR-125b-5p [161, 765] o miR-128-3p [765, 766]. Identificamos tres microARNs alterados en SAMP8 y modificados por la intervención de ejercicio físico, y otros cuatro que no mostraban diferencias entre las cepas SAMP8 y SAMR1 y que resultaron igualmente modulables en ambos grupos en respuesta al ejercicio. También observamos alteraciones en factores implicados en la regulación de la acetilación en histonas y en los niveles globales de acetilación de histona H3. Estos cambios tienen gran importancia ya que la acetilación de histonas es una marca epigenética muy importante a nivel de establecimiento de memoria y cognición [377, 670, 671] y alteraciones en los niveles de acetilación se han asociado con declive cognitivo y neurodegeneración [673, 674].

El interés en la influencia del entorno, las experiencias y los hábitos sobre la expresión génica ha crecido exponencialmente por su potencial regulador y posible aplicación terapéutica. Además de la actividad física, se ha observado que otros hábitos de estilo de vida como la dieta, ejercen una gran influencia sobre salud y envejecimiento. Intervenciones basadas en restricción calórica [767-770], o la caracterización de ciertos componentes, como polifenoles [771-774], isocianatos [775, 776] o ácidos grasos esenciales [777, 778], han demostrado el potencial terapéutico que tiene la dieta sobre el envejecimiento fisiológico, procesos cancerígenos y la esperanza de vida.

Asimismo, se ha descrito que la estimulación sensorial, cognitiva y motora mediante intervenciones de enriquecimiento ambiental produce cambios en niveles de expresión génica de factores neurotróficos, plasticidad neuronal, deposiciones de A $\beta$  y mejoras cognitivas en respuesta al enriquecimiento ambiental [779] así como cambios

epigenéticos en acetilación y metilación de histonas [670]. A nivel social, las experiencias durante los primeros años de vida [780, 781], así como situaciones de estrés y estrategias basadas en su reducción [782-786] se han asociado a cambios a nivel psicológico, neuronal y endocrino que puede estar mediados por alteraciones epigenéticas. En este contexto, durante el periodo de tesis realizamos un estudio en humanos donde mostramos una reducción en los niveles de expresión de genes proinflamatorios y cambios epigenéticos como alteraciones en acetilación y metilación de histonas, así como en la expresión de varias histonas deacetilasas, tras una intervención de 6 horas de meditación [787].

Este tipo de estudios y el conjunto de los resultados derivados de los mismos, están permitiendo un cambio en la manera de concebir la salud y los factores determinantes de la aparición y progresión de las enfermedades. Los modelos biomédicos más clásicos y simplificados comienzan a ser sustituidos por nuevos modelos biopsicosociales que aportan una visión más holística, en la cual se acepta una comunicación estrecha entre el ambiente, el individuo y sus genes, que determina finalmente la inclinación del delicado equilibrio entre la salud y la enfermedad. Así, los avances en el campo de la epigenética del estilo de vida serán fundamentales en la creación de nuevas estrategias basadas en hábitos saludables para la prevención y la complementación de los tratamientos de los síntomas y las patologías asociadas al envejecimiento.



## **CONCLUSIONES**

---



1. Los ratones senescentes SAMP8 presentan mayores niveles de IL6 en plasma y tienen aumentada su expresión en astrocitos, de manera basal y en respuesta a un estímulo inflamatorio (LPS).
2. El correpresor *Rcor2* presenta niveles mínimos de expresión en linfocitos, hipocampo y corteza cerebral de ratones SAMP8.
3. Existe una correlación negativa entre *Rcor2* e *Il6* en astrocitos, de manera basal y en respuesta a un estímulo inflamatorio (LPS + interferón  $\gamma$ ).
4. La inflamación también produce una reducción en la expresión de *Rcor2* en astrocitos.
5. Los ratones SAMP8 muestran un aumento global de H3K4me3 y alteraciones en la expresión de demetilinas (*Lsd1*, *Jarid1a* y *Jarid1b*) y metiltransferasas (*G9a*) reguladoras de esta marca epigenética.
6. El ejercicio físico produce mejoras fenotípicas y aumento de la vascularización en hipocampo de ratones senescentes.
7. El ejercicio físico revierte alteraciones transcripcionales asociadas a envejecimiento, en genes implicados en ensamblaje y mantenimiento de la matriz extracelular en cerebro.
8. El ejercicio físico aumenta la expresión génica de *Bdnf* independientemente de la duración y tipo de intervención, y a corto plazo modula *Trkb* y *Nrn1*, receptor y gen diana de BDNF respectivamente.
9. El ejercicio físico afecta a los niveles de varios miARNs asociados a neurodegeneración.
10. La acetilación global de histona H3 y varias deacetilasas son sensibles a la práctica de ejercicio físico.



**ANEXO-I**

---



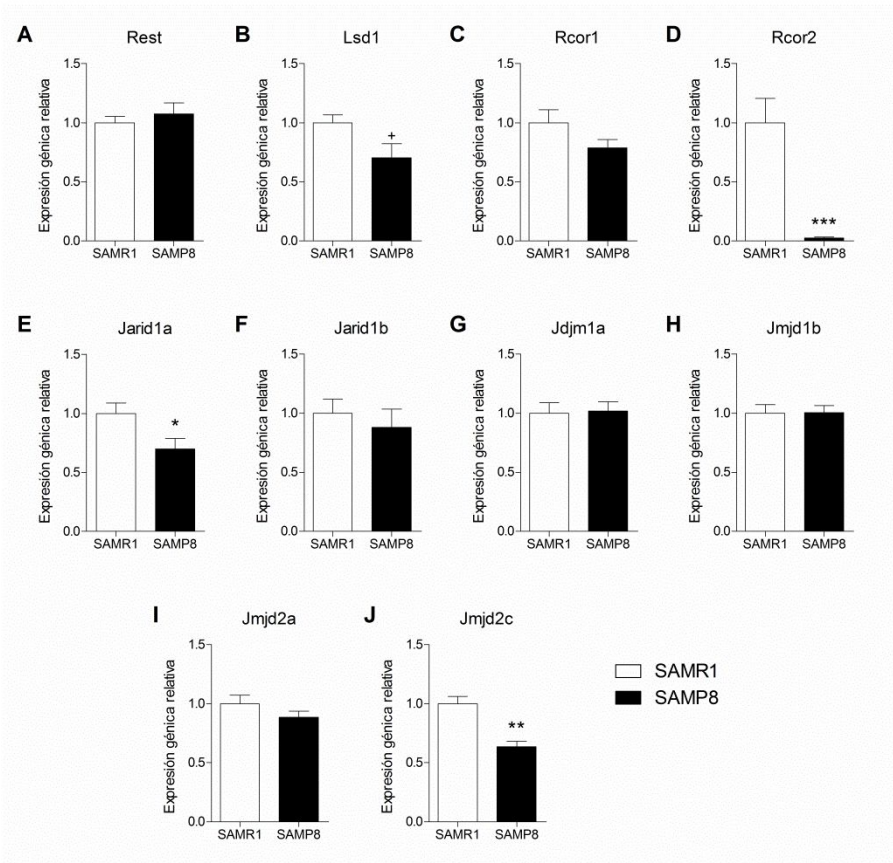


Figura 1. Expresión génica de enzimas demetilinas en linfocitos de ratones de 10 meses de edad (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

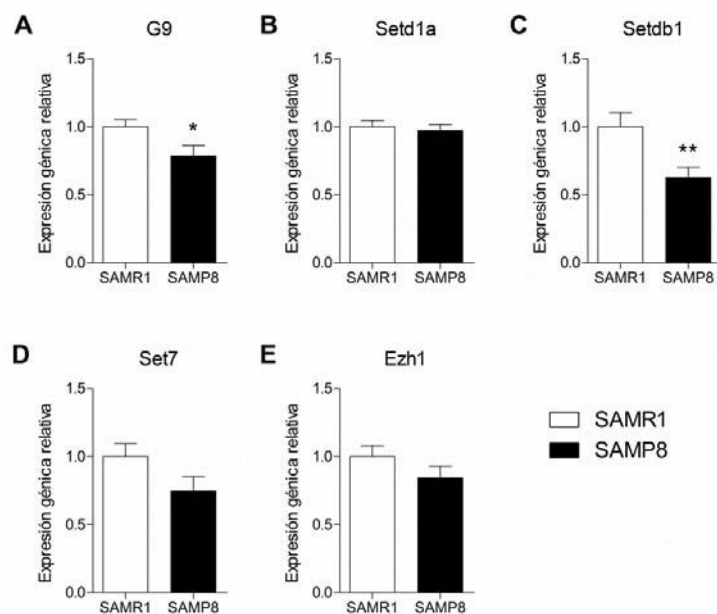


Figura 2. Expresión génica de enzimas metiltransferasas en linfocitos de ratones de 10 meses de edad (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

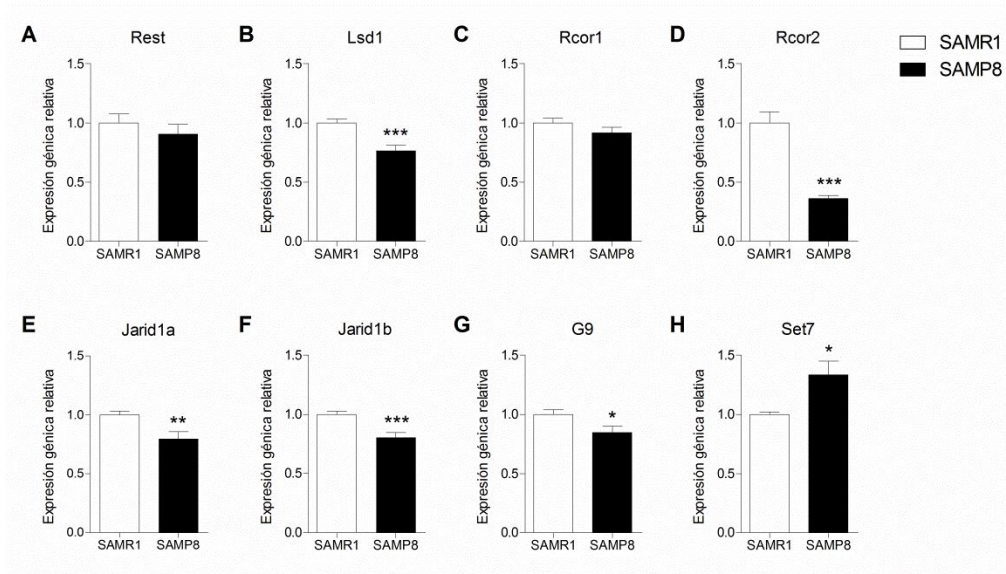


Figura 3. Expresión génica de enzimas demetilasas y metiltransferasas en hipocampo de ratones de 10 meses de edad (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

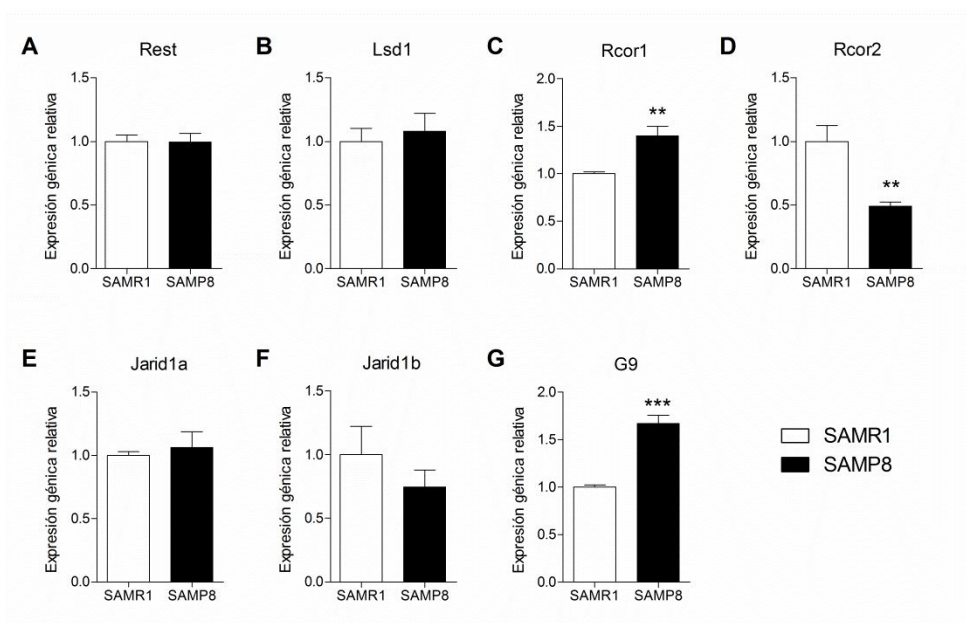


Figura 4. Expresión génica de enzimas demetilasas y metiltransferasas en corteza cerebral de ratones de 10 meses de edad (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).



**ANEXO-II**

---



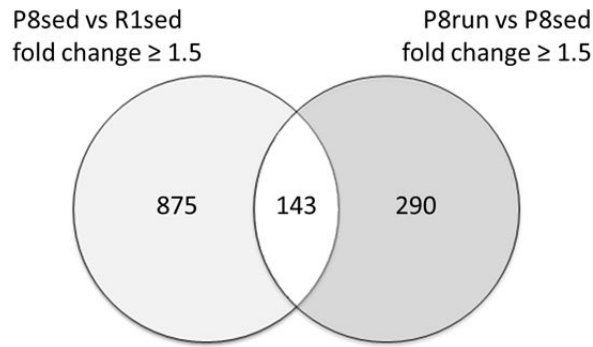


Figura 1. Diagrama de Venn de los genes con cambio de expresión mayor a 1.5 en corteza cerebral de ratones de 10 meses de edad. (R1sed=SAMR1 sedentarios; P8sed=SAMP8 sedentarios; P8run= SAMP8 ejercicio).

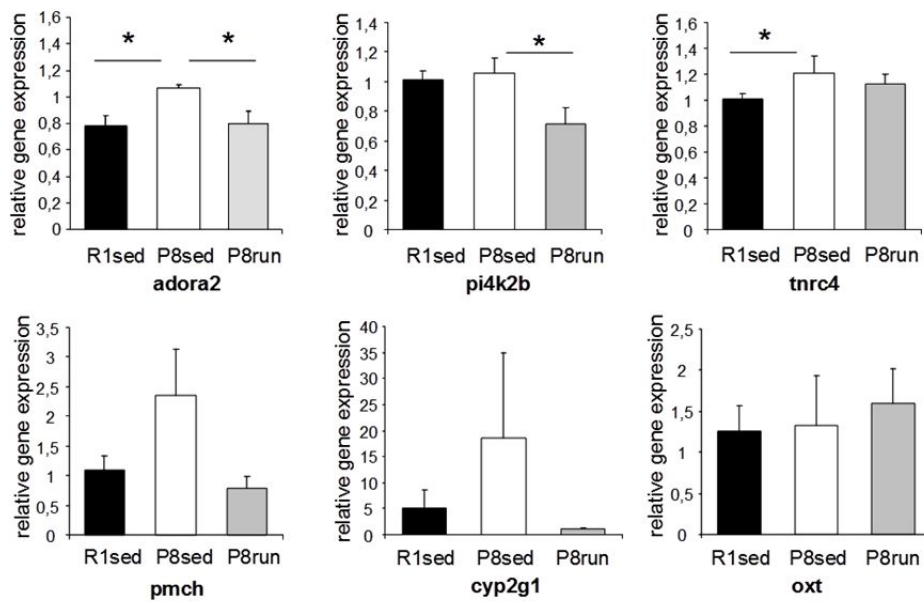


Figura 2. Validación mediante Real Time PCR de algunos genes presentes en la intersección del diagrama de Venn en corteza cerebral de ratones de 10 meses de edad. (R1sed=SAMR1 sedentarios; P8sed=SAMP8 sedentarios; P8run= SAMP8 ejercicio; \* $p < 0.05$ ).

Tabla 1. Enriquecimiento de vías presente en los 143 genes de la intersección del diagrama de Venn en corteza cerebral de ratones de 10 meses de edad, utilizando como base de datos Gene Ontology.

Category	Fold Enrichment	p-value	Number of genes	Genes
GO:0045935~ nucleic acid metabolic process	3,592	<0,001	12	BSX, MYOD1, MEF2A, MYOCD, MTF1, ADORA2A, MYOG, CD40, NPAS4, ISL1, KLF2, HOXD10
GO:0051173~ regulation of nitrogen compound metabolic process	3,483	0,001	12	BSX, MYOD1, MEF2A, MYOCD, MTF1, ADORA2A, MYOG, CD40, NPAS4, ISL1, KLF2, HOXD10
GO:0005576~ extracellular region	2,113	0,001	23	WFIKKN2, PRH1, PMCH, MSMB, LEPR, OXT, 2310033E01RIK, FGF21, CD40, COL4A6, MUC4, COL4A5, ADAMTS9, AY761184, PRRG1, DEFA-RS2, PROZ, PIP, DEFB10, VCAN, VMO1, PRP2, CYR61
GO:0031328~ regulation of cellular biosynthetic process	3,042	0,003	11	BSX, MYOD1, MEF2A, MYOCD, MTF1, ADORA2A, MYOG, NPAS4, ISL1, KLF2, HOXD10
GO:0009891~ regulation of biosynthetic process	3,015	0,003	11	BSX, MYOD1, MEF2A, MYOCD, MTF1, ADORA2A, MYOG, NPAS4, ISL1, KLF2, HOXD10
GO:0045941~ regulation of transcription	3,214	0,004	10	BSX, MYOD1, MEF2A, MYOCD, MTF1, MYOG, NPAS4, ISL1, KLF2, HOXD10
GO:0042755~ eating behavior	30,535	0,004	3	BSX, ADORA2A, LEPR
GO:0014069~ postsynaptic density	12,107	0,004	4	PLCB4, ADORA2A, PSD3, SYNPO
GO:0010628~ regulation of gene expression	3,129	0,004	10	BSX, MYOD1, MEF2A, MYOCD, MTF1, MYOG, NPAS4, ISL1, KLF2, HOXD10
GO:0007631~ feeding behavior	11,974	0,004	4	BSX, ADORA2A, PMCH, LEPR
GO:0010557~ regulation of macromolecule biosynthetic process	2,881	0,007	10	BSX, MYOD1, MEF2A, MYOCD, MTF1, MYOG, NPAS4, ISL1, KLF2, HOXD10
GO:0010604~ regulation of macromolecule metabolic process	2,653	0,008	11	BSX, MYOD1, MEF2A, MYOCD, MTF1, MYOG, CD40, NPAS4, ISL1, KLF2, HOXD10
GO:0045944~ regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	3,412	0,009	8	BSX, MYOD1, MYOCD, MTF1, MYOG, NPAS4, ISL1, HOXD10
GO:0007155~ cell adhesion	2,721	0,010	10	CLDN19, PGM5, ZAN, NEDD9, DSC2, VCAN, CD226, CYR61, CLDN15, MUC4
GO:0022610~ biological adhesion	2,717	0,010	10	CLDN19, PGM5, ZAN, NEDD9, DSC2, VCAN, CD226, CYR61, CLDN15, MUC4
GO:0003700~ transcription factor activity	2,283	0,014	12	BSX, MYOD1, MEF2A, NR1I2, MTF1, LHX5, MYOG, OBOX6, ISL1, KLF2, ZFP397OS, HOXD10
GO:0045893~ regulation of transcription, DNA-dependent	2,936	0,018	8	BSX, MYOD1, MYOCD, MTF1, MYOG, NPAS4, ISL1, HOXD10

Category	Fold Enrichment	p-value	Number of genes	Genes
GO:0051254~ regulation of RNA metabolic process	2,915	0,019	8	BSX, MYOD1, MYOCD, MTF1, MYOG, NPAS4, ISL1, HOXD10
GO:0005911~ cell-cell junction	4,462	0,025	5	CLDN19, PGM5, DSC2, CLDN15, SYNPO
GO:0003677~ DNA binding	1,658	0,025	20	ZFP36, MYOD1, MEF2A, SHPRH, MSH5, OBOX6, NPAS4, ISL1, ZIC1, ZFP397OS, HOXD10, BSX, CHD9, NR1I2, MTF1, MIER1, LHX5, MYOG, KLF2, ASCL3
GO:0043296~ apical junction complex	6,114	0,027	4	CLDN19, DSC2, CLDN15, SYNPO
GO:0016327~ apicolateral plasma membrane	5,995	0,028	4	CLDN19, DSC2, CLDN15, SYNPO
GO:0030528~ transcription regulator activity	1,836	0,029	15	MYOD1, MEF2A, OBOX6, NPAS4, ISL1, ZFP397OS, HOXD10, BSX, NR1I2, MTF1, MYOCD, LHX5, MYOG, KLF2, ASCL3
GO:0016563~ transcription activator activity	3,420	0,030	6	MYOD1, MEF2A, MYOCD, MTF1, MYOG, NPAS4
GO:0043565~ sequence-specific DNA binding	2,390	0,033	9	BSX, MYOD1, MEF2A, NR1I2, LHX5, MYOG, OBOX6, ISL1, HOXD10
GO:0005587~ collagen type IV	51,457	0,038	2	COL4A6, COL4A5
GO:0030935~ sheet-forming collagen	51,457	0,038	2	COL4A6, COL4A5
GO:0050891~ multicellular organismal water homeostasis	50,891	0,038	2	ADORA2A, OXT
GO:0006357~ regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2,231	0,046	9	BSX, MYOD1, MYOCD, MTF1, MYOG, NPAS4, ISL1, HOXD10, ASCL3
GO:0007610~ behavior	2,639	0,047	7	BSX, ADORA2A, PMCH, LEPR, ZIC1, HOXD10, CYR61



## **REFERENCIAS**

---





1. Hasty, P. and J. Vijg, *Aging. Genomic priorities in aging*. Science, 2002. **296**(5571): p. 1250-1.
2. Troen, B.R., *The biology of aging*. Mt Sinai J Med, 2003. **70**(1): p. 3-22.
3. Dilman, V.M., S.Y. Revskoy, and A.G. Golubev, *Neuroendocrine-ontogenetic mechanism of aging: toward an integrated theory of aging*. Int Rev Neurobiol, 1986. **28**: p. 89-156.
4. Ferrari, E., et al., *Age-related changes of the adrenal secretory pattern: possible role in pathological brain aging*. Brain Res Brain Res Rev, 2001. **37**(1-3): p. 294-300.
5. Ferrari, E. and F. Magri, *Role of neuroendocrine pathways in cognitive decline during aging*. Ageing Res Rev, 2008. **7**(3): p. 225-33.
6. Veldhuis, J.D., A. Sharma, and F. Roelfsema, *Age-dependent and gender-dependent regulation of hypothalamic-adrenocorticotrophic-adrenal axis*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2013. **42**(2): p. 201-25.
7. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
8. Bohr, V.A. and R.M. Anson, *DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging*. Mutat Res, 1995. **338**(1-6): p. 25-34.
9. Yeo, E.J. and S.C. Park, *Age-dependent agonist-specific dysregulation of membrane-mediated signal transduction: emergence of the gate theory of aging*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(12): p. 1563-78.
10. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.
11. Linnane, A.W., S. Kovalenko, and E.B. Gingold, *The universality of bioenergetic disease. Age-associated cellular bioenergetic degradation and amelioration therapy*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 202-13.
12. Wei, Y.H., et al., *Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging*. Chang Gung Med J, 2009. **32**(2): p. 113-32.
13. Naudí, A., et al., *Regulation of Membrane Unsaturation as Antioxidant Adaptive Mechanism in Long-lived Animal Species*. Free Radicals and Antioxidants, 2011. **1**(3).
14. Pamplona, R., G. Barja, and M. Portero-Otin, *Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation?* Ann N Y Acad Sci, 2002. **959**: p. 475-90.
15. Pamplona, R., *Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(10): p. 1249-62.
16. Hulbert, A.J., et al., *Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1175-213.
17. Strehler, B.L., *Time, cells and aging*. 1st ed 1962, New York Academic Press.
18. Kushnareva, Y., A.N. Murphy, and A. Andreyev, *Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 2): p. 545-53.

19. Rigoulet, M., E.D. Yoboue, and A. Devin, *Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H(2)O(2) signaling*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(3): p. 459-68.
20. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. *Biochem J*, 2009. **417**(1): p. 1-13.
21. Lambert, A.J., et al., *Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms*. *Aging Cell*, 2007. **6**(5): p. 607-18.
22. Barja, G., et al., *A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity in animals*. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, 1994. **108**(4): p. 501-12.
23. Barja, G. and A. Herrero, *Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals*. *FASEB J*, 2000. **14**(2): p. 312-8.
24. Wallace, D.C., *Mitochondrial diseases in man and mouse*. *Science*, 1999. **283**(5407): p. 1482-8.
25. Franceschi, C., et al., *Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **908**: p. 244-54.
26. Ponnappan, S. and U. Ponnappan, *Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(8): p. 1551-85.
27. Sansoni, P., et al., *The immune system in extreme longevity*. *Exp Gerontol*, 2008. **43**(2): p. 61-5.
28. Bruunsgaard, H., et al., *Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians*. *Am J Med*, 2003. **115**(4): p. 278-83.
29. Ershler, W.B. and E.T. Keller, *Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty*. *Annu Rev Med*, 2000. **51**: p. 245-70.
30. O'Mahony, L., et al., *Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production*. *Clin Exp Immunol*, 1998. **113**(2): p. 213-9.
31. Gibson, K.L., et al., *B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status*. *Aging Cell*, 2009. **8**(1): p. 18-25.
32. Kline, G.H., T.A. Hayden, and N.R. Klinman, *B cell maintenance in aged mice reflects both increased B cell longevity and decreased B cell generation*. *J Immunol*, 1999. **162**(6): p. 3342-9.
33. Pinke, K.H., et al., *Proinflammatory profile of in vitro monocytes in the ageing is affected by lymphocytes presence*. *Immun Ageing*, 2013. **10**(1): p. 22.
34. Stephan, R.P., V.M. Sanders, and P.L. Witte, *Stage-specific alterations in murine B lymphopoiesis with age*. *Int Immunol*, 1996. **8**(4): p. 509-18.
35. Aberle, J.H., et al., *Mechanistic insights into the impairment of memory B cells and antibody production in the elderly*. *Age (Dordr)*, 2013. **35**(2): p. 371-81.
36. Pawelec, G., *Hallmarks of human "immunosenescence": adaptation or dysregulation?* *Immun Ageing*, 2012. **9**(1): p. 15.
37. Fagiolo, U., et al., *Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(9): p. 2375-8.

38. Vescovini, R., et al., *Massive load of functional effector CD4+ and CD8+ T cells against cytomegalovirus in very old subjects*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 4283-91.
39. Zanni, F., et al., *Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence*. Exp Gerontol, 2003. **38**(9): p. 981-7.
40. Adams, P.D., *Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence*. Mol Cell, 2009. **36**(1): p. 2-14.
41. Campisi, J., *Aging, cellular senescence, and cancer*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 685-705.
42. Lopez-Otin, C., et al., *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-217.
43. Brack, A.S., et al., *Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis*. Science, 2007. **317**(5839): p. 807-10.
44. Krtolica, A., et al., *GROalpha regulates human embryonic stem cell self-renewal or adoption of a neuronal fate*. Differentiation, 2011. **81**(4): p. 222-32.
45. Acosta, J.C., et al., *A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(8): p. 978-90.
46. Nelson, G., et al., *A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence*. Aging Cell, 2012. **11**(2): p. 345-9.
47. Parrinello, S., et al., *Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 3): p. 485-96.
48. Freund, A., et al., *Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences*. Trends Mol Med, 2010. **16**(5): p. 238-46.
49. Nardella, C., et al., *Pro-senescence therapy for cancer treatment*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(7): p. 503-11.
50. Shamma, A., et al., *Rb Regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation*. Cancer Cell, 2009. **15**(4): p. 255-69.
51. Dorr, J.R., et al., *Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 421-5.
52. Kondoh, H., et al., *Glycolytic enzymes can modulate cellular life span*. Cancer Res, 2005. **65**(1): p. 177-85.
53. LaPak, K.M. and C.E. Burd, *The molecular balancing act of p16(INK4a) in cancer and aging*. Mol Cancer Res, 2014. **12**(2): p. 167-83.
54. Romanov, V.S., et al., *p21(Waf1) is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate*. Cell Cycle, 2010. **9**(19): p. 3945-55.
55. Aird, K.M., et al., *Suppression of nucleotide metabolism underlies the establishment and maintenance of oncogene-induced senescence*. Cell Rep, 2013. **3**(4): p. 1252-65.

56. Di Micco, R., et al., *Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication*. Nature, 2006. **444**(7119): p. 638-42.
57. Lazzerini Denchi, E., et al., *Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(7): p. 2660-72.
58. Kaplon, J., et al., *A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence*. Nature, 2013. **498**(7452): p. 109-12.
59. Passos, J.F., et al., *Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence*. Mol Syst Biol, 2010. **6**: p. 347.
60. Freund, A., C.K. Patil, and J. Campisi, *p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype*. EMBO J, 2011. **30**(8): p. 1536-48.
61. Blasco, M.A., *The epigenetic regulation of mammalian telomeres*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(4): p. 299-309.
62. Martinez, P. and M.A. Blasco, *Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(3): p. 161-76.
63. de Lange, T., *Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2100-10.
64. Oeseburg, H., et al., *Telomere biology in healthy aging and disease*. Pflugers Arch, 2010. **459**(2): p. 259-68.
65. Smogorzewska, A. and T. de Lange, *Regulation of telomerase by telomeric proteins*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 177-208.
66. Chiang, Y.J., et al., *Telomere-associated protein TIN2 is essential for early embryonic development through a telomerase-independent pathway*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(15): p. 6631-4.
67. Karlseder, J., et al., *Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(18): p. 6533-41.
68. Wu, L., et al., *Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres*. Cell, 2006. **126**(1): p. 49-62.
69. Blackburn, E.H., *Switching and signaling at the telomere*. Cell, 2001. **106**(6): p. 661-73.
70. Olovnikov, A.M., *A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon*. J Theor Biol, 1973. **41**(1): p. 181-90.
71. Flores, I., M.L. Cayuela, and M.A. Blasco, *Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior*. Science, 2005. **309**(5738): p. 1253-6.
72. Hemann, M.T., et al., *The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability*. Cell, 2001. **107**(1): p. 67-77.
73. Hao, L.Y., et al., *Short telomeres, even in the presence of telomerase, limit tissue renewal capacity*. Cell, 2005. **123**(6): p. 1121-31.

74. d'Adda di Fagagna, F., et al., *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence*. Nature, 2003. **426**(6963): p. 194-8.
75. Takai, H., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *DNA damage foci at dysfunctional telomeres*. Curr Biol, 2003. **13**(17): p. 1549-56.
76. Armanios, M., *Syndromes of telomere shortening*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009. **10**: p. 45-61.
77. Kong, C.M., X.W. Lee, and X. Wang, *Telomere shortening in human diseases*. FEBS J, 2013. **280**(14): p. 3180-93.
78. Artandi, S.E., et al., *Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice*. Nature, 2000. **406**(6796): p. 641-5.
79. Ju, Z. and K.L. Rudolph, *Telomeres and telomerase in stem cells during aging and disease*. Genome Dyn, 2006. **1**: p. 84-103.
80. Lechel, A., et al., *Telomerase deletion limits progression of p53-mutant hepatocellular carcinoma with short telomeres in chronic liver disease*. Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1465-75.
81. Aikata, H., et al., *Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation*. Exp Cell Res, 2000. **256**(2): p. 578-82.
82. Wiemann, S.U., et al., *Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis*. FASEB J, 2002. **16**(9): p. 935-42.
83. Martin-Ruiz, C., et al., *Telomere length predicts poststroke mortality, dementia, and cognitive decline*. Ann Neurol, 2006. **60**(2): p. 174-80.
84. Panossian, L.A., et al., *Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(1): p. 77-84.
85. Balasubramanyam, M., et al., *Telomere shortening & metabolic/vascular diseases*. Indian J Med Res, 2007. **125**(3): p. 441-50.
86. Brouillette, S.W., et al., *Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study*. Lancet, 2007. **369**(9556): p. 107-14.
87. Fitzpatrick, A.L., et al., *Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study*. Am J Epidemiol, 2007. **165**(1): p. 14-21.
88. Matsubara, Y., et al., *Coronary artery disease and a functional polymorphism of hTERT*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(2): p. 669-72.
89. van der Harst, P., et al., *Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(13): p. 1459-64.
90. Adaikalakoteswari, A., M. Balasubramanyam, and V. Mohan, *Telomere shortening occurs in Asian Indian Type 2 diabetic patients*. Diabet Med, 2005. **22**(9): p. 1151-6.
91. Sampson, M.J., et al., *Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2006. **29**(2): p. 283-9.

92. Babizhayev, M.A. and Y.E. Yegorov, *Smoking and health: association between telomere length and factors impacting on human disease, quality of life and life span in a large population-based cohort under the effect of smoking duration*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2011. **25**(4): p. 425-42.
93. McGrath, M., et al., *Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. **16**(4): p. 815-9.
94. Mirabello, L., et al., *The association between leukocyte telomere length and cigarette smoking, dietary and physical variables, and risk of prostate cancer*. *Aging Cell*, 2009. **8**(4): p. 405-13.
95. Nettleton, J.A., et al., *Associations between microalbuminuria and animal foods, plant foods, and dietary patterns in the Multiethnic Study of Atherosclerosis*. *Am J Clin Nutr*, 2008. **87**(6): p. 1825-36.
96. Lee, M., et al., *Inverse association between adiposity and telomere length: The Fels Longitudinal Study*. *Am J Hum Biol*, 2011. **23**(1): p. 100-6.
97. Nordfjall, K., et al., *Telomere length is associated with obesity parameters but with a gender difference*. *Obesity (Silver Spring)*, 2008. **16**(12): p. 2682-9.
98. O'Callaghan, N.J., et al., *Weight loss in obese men is associated with increased telomere length and decreased abasic sites in rectal mucosa*. *Rejuvenation Res*, 2009. **12**(3): p. 169-76.
99. Richards, J.B., et al., *Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women*. *Am J Clin Nutr*, 2007. **86**(5): p. 1420-5.
100. Paul, L., et al., *Telomere length in peripheral blood mononuclear cells is associated with folate status in men*. *J Nutr*, 2009. **139**(7): p. 1273-8.
101. Farzaneh-Far, R., et al., *Association of marine omega-3 fatty acid levels with telomeric aging in patients with coronary heart disease*. *JAMA*, 2010. **303**(3): p. 250-7.
102. Cherkas, L.F., et al., *The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length*. *Arch Intern Med*, 2008. **168**(2): p. 154-8.
103. Puterman, E., et al., *The power of exercise: buffering the effect of chronic stress on telomere length*. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10837.
104. Jacobs, T.L., et al., *Intensive meditation training, immune cell telomerase activity, and psychological mediators*. *Psychoneuroendocrinology*, 2011. **36**(5): p. 664-81.
105. Ornish, D., et al., *Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study*. *Lancet Oncol*, 2008. **9**(11): p. 1048-57.
106. Serrano, F. and E. Klann, *Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus*. *Ageing Res Rev*, 2004. **3**(4): p. 431-43.
107. Zecca, L., et al., *Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders*. *Nat Rev Neurosci*, 2004. **5**(11): p. 863-73.
108. Ames, B.N. and J. Liu, *Delaying the mitochondrial decay of aging with acetylcarnitine*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1033**: p. 108-16.
109. Gray, D.A., M. Tsirigotis, and J. Woulfe, *Ubiquitin, proteasomes, and the aging brain*. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2003. **2003**(34): p. RE6.

110. Trojanowski, J.Q. and M.P. Mattson, *Overview of protein aggregation in single, double, and triple neurodegenerative brain amyloidoses*. *Neuromolecular Med*, 2003. **4**(1-2): p. 1-6.
111. Kyng, K.J. and V.A. Bohr, *Gene expression and DNA repair in progeroid syndromes and human aging*. *Ageing Res Rev*, 2005. **4**(4): p. 579-602.
112. Lu, T., et al., *Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain*. *Nature*, 2004. **429**(6994): p. 883-91.
113. Floyd, R.A. and K. Hensley, *Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases*. *Neurobiol Aging*, 2002. **23**(5): p. 795-807.
114. Mattson, M.P., *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*. *Nature*, 2004. **430**(7000): p. 631-9.
115. *About a peculiar disease of the cerebral cortex. By Alois Alzheimer, 1907 (Translated by L. Jarvik and H. Greenson)*. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1987. **1**(1): p. 3-8.
116. *2013 Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimers Dement*, 2013. **9**(2): p. 208-45.
117. Armstrong, R.A., *Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Folia Neuropathol*, 2006. **44**(1): p. 1-11.
118. Armstrong, R.A., *The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. *Folia Neuropathol*, 2009. **47**(4): p. 289-99.
119. Frost, B., J. Gotz, and M.B. Feany, *Connecting the dots between tau dysfunction and neurodegeneration*. *Trends Cell Biol*, 2015. **25**(1): p. 46-53.
120. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. *Science*, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
121. Huang, Y. and L. Mucke, *Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies*. *Cell*, 2012. **148**(6): p. 1204-22.
122. Iqbal, K. and I. Grundke-Iqbal, *Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective*. *J Alzheimers Dis*, 2006. **9**(3 Suppl): p. 219-42.
123. Mirra, S.S., et al., *The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. *Neurology*, 1991. **41**(4): p. 479-86.
124. Priller, C., et al., *Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein*. *J Neurosci*, 2006. **26**(27): p. 7212-21.
125. Turner, P.R., et al., *Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory*. *Prog Neurobiol*, 2003. **70**(1): p. 1-32.
126. Mandelkow, E.M., et al., *Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses*. *Neurobiol Aging*, 2003. **24**(8): p. 1079-85.
127. Trojanowski, J.Q. and V.M. Lee, *The role of tau in Alzheimer's disease*. *Med Clin North Am*, 2002. **86**(3): p. 615-27.

128. Arnaiz, E. and O. Almkvist, *Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease*. Acta Neurol Scand Suppl, 2003. **179**: p. 34-41.
129. Palmer, K., et al., *Predictors of progression from mild cognitive impairment to Alzheimer disease*. Neurology, 2007. **68**(19): p. 1596-602.
130. Small, B.J., E. Gagnon, and B. Robinson, *Early identification of cognitive deficits: preclinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. Geriatrics, 2007. **62**(4): p. 19-23.
131. Barber, R.C., *The genetics of Alzheimer's disease*. Scientifica (Cairo), 2012. **2012**: p. 246210.
132. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
133. Raux, G., et al., *Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update*. J Med Genet, 2005. **42**(10): p. 793-5.
134. Suzuki, N., et al., *An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants*. Science, 1994. **264**(5163): p. 1336-40.
135. Jonsson, T., et al., *A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline*. Nature, 2012. **488**(7409): p. 96-9.
136. Lee, S.F., et al., *Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45013-9.
137. Citron, M., et al., *Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice*. Nat Med, 1997. **3**(1): p. 67-72.
138. Duff, K., et al., *Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 710-3.
139. St George-Hyslop, P.H. and A. Petit, *Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease*. C R Biol, 2005. **328**(2): p. 119-30.
140. Sherrington, R., et al., *Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(7): p. 985-8.
141. Roses, A.D. and A.M. Saunders, *APOE is a major susceptibility gene for Alzheimer's disease*. Curr Opin Biotechnol, 1994. **5**(6): p. 663-7.
142. Farrer, L.A., et al., *Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium*. JAMA, 1997. **278**(16): p. 1349-56.
143. Lambert, J.C., et al., *Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease*. Nat Genet, 2013. **45**(12): p. 1452-8.
144. Seshadri, S., et al., *Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease*. JAMA, 2010. **303**(18): p. 1832-40.
145. Lidsky, T.I., *Is the Aluminum Hypothesis dead?* J Occup Environ Med, 2014. **56**(5 Suppl): p. S73-9.



146. Akiyama, H., et al., *Long-term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in AbetaPP and AbetaPP/tau transgenic mice*. *Neuropathology*, 2012. **32**(4): p. 390-7.
147. Reusche, E., et al., *Alzheimer morphology is not increased in dialysis-associated encephalopathy and long-term hemodialysis*. *Acta Neuropathol*, 2001. **101**(3): p. 211-6.
148. Ribes, D., et al., *Recognition memory and beta-amyloid plaques in adult Tg2576 mice are not modified after oral exposure to aluminum*. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2012. **26**(2): p. 179-85.
149. Letzel, S., et al., *Longitudinal study of neurotoxicity with occupational exposure to aluminum dust*. *Neurology*, 2000. **54**(4): p. 997-1000.
150. Mizoroki, T., et al., *Aluminum induces tau aggregation in vitro but not in vivo*. *J Alzheimers Dis*, 2007. **11**(4): p. 419-27.
151. Walton, J.R., *Chronic aluminum intake causes Alzheimer's disease: applying Sir Austin Bradford Hill's causality criteria*. *J Alzheimers Dis*, 2014. **40**(4): p. 765-838.
152. Yokel, R.A., *The toxicology of aluminum in the brain: a review*. *Neurotoxicology*, 2000. **21**(5): p. 813-28.
153. Exley, C., *The aluminium-amyloid cascade hypothesis and Alzheimer's disease*. *Subcell Biochem*, 2005. **38**: p. 225-34.
154. Rodella, L.F., et al., *Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain*. *Histol Histopathol*, 2008. **23**(4): p. 433-9.
155. Walton, J.R. and M.X. Wang, *APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease*. *J Inorg Biochem*, 2009. **103**(11): p. 1548-54.
156. Yumoto, S., et al., *Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease*. *J Inorg Biochem*, 2009. **103**(11): p. 1579-84.
157. Wang, L., et al., *Effects of aluminium on beta-amyloid (1-42) and secretases (APP-cleaving enzymes) in rat brain*. *Neurochem Res*, 2014. **39**(7): p. 1338-45.
158. Bondy, S.C., *Prolonged exposure to low levels of aluminum leads to changes associated with brain aging and neurodegeneration*. *Toxicology*, 2014. **315**: p. 1-7.
159. Walton, J.R., *Aluminum involvement in the progression of Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2013. **35**(1): p. 7-43.
160. Alexandrov, P.N., et al., *Synergistic effects of iron and aluminum on stress-related gene expression in primary human neural cells*. *J Alzheimers Dis*, 2005. **8**(2): p. 117-27; discussion 209-15.
161. Lukiw, W.J. and A.I. Pogue, *Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells*. *J Inorg Biochem*, 2007. **101**(9): p. 1265-9.
162. Pogue, A.I., et al., *Metal-Sulfate Induced Generation of ROS in Human Brain Cells: Detection Using an Isomeric Mixture of 5- and 6-Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate (Carboxy-DCFDA) as a Cell Permeant Tracer*. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(8): p. 9615-26.
163. Bhattacharjee, S., et al., *Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease (AD)*. *J Inorg Biochem*, 2013. **126**: p. 35-7.

164. Flaten, T.P., *Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water*. Brain Res Bull, 2001. **55**(2): p. 187-96.
165. Crapper McLachlan, D.R., et al., *Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease*. Lancet, 1991. **337**(8753): p. 1304-8.
166. Percy, M.E., et al., *Towards the prevention of potential aluminum toxic effects and an effective treatment for Alzheimer's disease*. J Inorg Biochem, 2011. **105**(11): p. 1505-12.
167. Giunta, B., et al., *The immunology of traumatic brain injury: a prime target for Alzheimer's disease prevention*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 185.
168. Gentleman, S.M., et al., *Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury*. Neurosci Lett, 1993. **160**(2): p. 139-44.
169. McKenzie, J.E., et al., *Increased numbers of beta APP-immunoreactive neurones in the entorhinal cortex after head injury*. Neuroreport, 1994. **6**(1): p. 161-4.
170. Roberts, G.W., et al., *Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1994. **57**(4): p. 419-25.
171. Bourre, J.M., *Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 2 : macronutrients*. J Nutr Health Aging, 2006. **10**(5): p. 386-99.
172. Bourre, J.M., *Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 1: micronutrients*. J Nutr Health Aging, 2006. **10**(5): p. 377-85.
173. Kamphuis, P.J. and P. Scheltens, *Can nutrients prevent or delay onset of Alzheimer's disease?* J Alzheimers Dis, 2010. **20**(3): p. 765-75.
174. Cunnane, S., et al., *Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease*. Nutrition, 2011. **27**(1): p. 3-20.
175. Cardoso, B.R., C. Cominetti, and S.M. Cozzolino, *Importance and management of micronutrient deficiencies in patients with Alzheimer's disease*. Clin Interv Aging, 2013. **8**: p. 531-42.
176. Hu, N., et al., *Nutrition and the risk of Alzheimer's disease*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 524820.
177. Buchman, A.S., et al., *Body mass index in older persons is associated with Alzheimer disease pathology*. Neurology, 2006. **67**(11): p. 1949-54.
178. Gazdzinski, S., et al., *Body mass index and magnetic resonance markers of brain integrity in adults*. Ann Neurol, 2008. **63**(5): p. 652-7.
179. Feng, Y. and X. Wang, *Antioxidant therapies for Alzheimer's disease*. Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 472932.
180. Morris, M.C., et al., *Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study*. JAMA, 2002. **287**(24): p. 3230-7.

181. Engelhart, M.J., et al., *Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease*. JAMA, 2002. **287**(24): p. 3223-9.
182. Hooshmand, B., et al., *Homocysteine and holotranscobalamin and the risk of Alzheimer disease: a longitudinal study*. Neurology, 2010. **75**(16): p. 1408-14.
183. Clarke, R., et al., *Low vitamin B-12 status and risk of cognitive decline in older adults*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(5): p. 1384-91.
184. Haan, M.N., et al., *Homocysteine, B vitamins, and the incidence of dementia and cognitive impairment: results from the Sacramento Area Latino Study on Aging*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(2): p. 511-7.
185. Llewellyn, D.J., et al., *Vitamin D and risk of cognitive decline in elderly persons*. Arch Intern Med, 2010. **170**(13): p. 1135-41.
186. Annweiler, C., et al., *Serum vitamin D deficiency as a predictor of incident non-Alzheimer dementias: a 7-year longitudinal study*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2011. **32**(4): p. 273-8.
187. Sydenham, E., A.D. Dangour, and W.S. Lim, *Omega 3 fatty acid for the prevention of cognitive decline and dementia*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **6**: p. CD005379.
188. Morris, M.C., et al., *Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population*. Neurology, 2004. **62**(9): p. 1573-9.
189. Soderberg, M., et al., *Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease*. Lipids, 1991. **26**(6): p. 421-5.
190. Schaefer, E.J., et al., *Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study*. Arch Neurol, 2006. **63**(11): p. 1545-50.
191. Reisberg, B., *Alzheimer's Disease: the Standard Reference* 1983, New York: Free Press.
192. Imhof, A., et al., *Morphological substrates of cognitive decline in nonagenarians and centenarians: a new paradigm?* J Neurol Sci, 2007. **257**(1-2): p. 72-9.
193. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **122**(3): p. 1131-5.
194. Greenberg, S.M., et al., *Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment*. Stroke, 2004. **35**(11 Suppl 1): p. 2616-9.
195. Mann, D.M. and D. Jones, *Deposition of amyloid (A4) protein within the brains of persons with dementing disorders other than Alzheimer's disease and Down's syndrome*. Neurosci Lett, 1990. **109**(1-2): p. 68-75.
196. Bouras, C., P.R. Hof, and J.H. Morrison, *Neurofibrillary tangle densities in the hippocampal formation in a non-demented population define subgroups of patients with differential early pathologic changes*. Neurosci Lett, 1993. **153**(2): p. 131-5.
197. Knopman, D.S., et al., *Neuropathology of cognitively normal elderly*. J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(11): p. 1087-95.

198. Garcia-Sierra, F., et al., *The extent of neurofibrillary pathology in perforant pathway neurons is the key determinant of dementia in the very old*. Acta Neuropathol, 2000. **100**(1): p. 29-35.
199. Guillozet, A.L., et al., *Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment*. Arch Neurol, 2003. **60**(5): p. 729-36.
200. Bartzokis, G., *Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(8): p. 1341-71.
201. Grudzien, A., et al., *Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2007. **28**(3): p. 327-35.
202. Heneka, M.T., et al., *Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(13): p. 6058-63.
203. Armstrong, R.A., *On the 'classification' of neurodegenerative disorders: discrete entities, overlap or continuum?* Folia Neuropathol, 2012. **50**(3): p. 201-8.
204. De Lacoste, M.C. and C.L. White, 3rd, *The role of cortical connectivity in Alzheimer's disease pathogenesis: a review and model system*. Neurobiol Aging, 1993. **14**(1): p. 1-16.
205. Pearson, R.C., et al., *Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(13): p. 4531-4.
206. Roberts, G.W., et al., *On the origin of Alzheimer's disease: a hypothesis*. Neuroreport, 1993. **4**(1): p. 7-9.
207. Vallet, G.T., et al., *The disconnection syndrome in the Alzheimer's disease: the cross-modal priming example*. Cortex, 2013. **49**(9): p. 2402-15.
208. Neufang, S., et al., *Disconnection of frontal and parietal areas contributes to impaired attention in very early Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2011. **25**(2): p. 309-21.
209. Delbeuck, X., M. Van der Linden, and F. Collette, *Alzheimer's disease as a disconnection syndrome?* Neuropsychol Rev, 2003. **13**(2): p. 79-92.
210. Greicius, M.D., et al., *Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4637-42.
211. Dai, Z. and Y. He, *Disrupted structural and functional brain connectomes in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. Neurosci Bull, 2014. **30**(2): p. 217-32.
212. Liu, Y., et al., *Impaired long distance functional connectivity and weighted network architecture in Alzheimer's disease*. Cereb Cortex, 2014. **24**(6): p. 1422-35.
213. Wang, K., et al., *Altered functional connectivity in early Alzheimer's disease: a resting-state fMRI study*. Hum Brain Mapp, 2007. **28**(10): p. 967-78.
214. Duchek, J.M., et al., *Relationship between Stroop performance and resting state functional connectivity in cognitively normal older adults*. Neuropsychology, 2013. **27**(5): p. 516-28.
215. Lakmache, Y., et al., *Interhemispheric disconnection syndrome in Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 9042-6.

216. Blass, J.P. and A. Zemcov, *Alzheimer's disease. A metabolic systems degeneration?* Neurochem Pathol, 1984. **2**(2): p. 103-14.
217. Santoro, A., et al., *Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease.* PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12037.
218. Swerdlow, R.H., *Mitochondria and cell bioenergetics: increasingly recognized components and a possible etiologic cause of Alzheimer's disease.* Antioxid Redox Signal, 2012. **16**(12): p. 1434-55.
219. Ryu, J.K. and J.G. McLarnon, *A leaky blood-brain barrier, fibrinogen infiltration and microglial reactivity in inflamed Alzheimer's disease brain.* J Cell Mol Med, 2009. **13**(9A): p. 2911-25.
220. Deane, R., Z. Wu, and B.V. Zlokovic, *RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier.* Stroke, 2004. **35**(11 Suppl 1): p. 2628-31.
221. Giulian, D., et al., *Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain.* Neurochem Int, 1995. **27**(1): p. 119-37.
222. Burgmans, S., et al., *Amyloid-beta interacts with blood-brain barrier function in dementia: a systematic review.* J Alzheimers Dis, 2013. **35**(4): p. 859-73.
223. Simons, E.R., et al., *Blood brain barrier endothelial cells express candidate amyloid precursor protein-cleaving secretases.* Amyloid, 1998. **5**(3): p. 153-62.
224. Hardy, J., *The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal.* J Neurochem, 2009. **110**(4): p. 1129-34.
225. Tibbling, G., H. Link, and S. Ohman, *Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values.* Scand J Clin Lab Invest, 1977. **37**(5): p. 385-90.
226. Algotsson, A. and B. Winblad, *The integrity of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease.* Acta Neurol Scand, 2007. **115**(6): p. 403-8.
227. Bowman, G.L., et al., *Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance.* Neurology, 2007. **68**(21): p. 1809-14.
228. Matsumoto, Y., et al., *Blood-brain barrier permeability correlates with medial temporal lobe atrophy but not with amyloid-beta protein transport across the blood-brain barrier in Alzheimer's disease.* Dement Geriatr Cogn Disord, 2007. **23**(4): p. 241-5.
229. Akiyama, H., et al., *Inflammation and Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2000. **21**(3): p. 383-421.
230. Lee, Y.J., et al., *Inflammation and Alzheimer's disease.* Arch Pharm Res, 2010. **33**(10): p. 1539-56.
231. Holmes, C. and J. Butchart, *Systemic inflammation and Alzheimer's disease.* Biochem Soc Trans, 2011. **39**(4): p. 898-901.
232. Takeda, S., N. Sato, and R. Morishita, *Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy.* Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 171.
233. Koyama, A., et al., *The role of peripheral inflammatory markers in dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013. **68**(4): p. 433-40.

234. Serrano-Pozo, A., et al., *Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2013. **72**(6): p. 462-71.
235. Simard, A.R., et al., *Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease*. Neuron, 2006. **49**(4): p. 489-502.
236. Mrak, R.E., J.G. Sheng, and W.S. Griffin, *Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(3): p. 273-9.
237. Griffin, W.S., et al., *Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution*. J Neuropathol Exp Neurol, 1995. **54**(2): p. 276-81.
238. Bauer, J., et al., *Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices*. FEBS Lett, 1991. **285**(1): p. 111-4.
239. Tarkowski, E., et al., *Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia*. J Clin Immunol, 1999. **19**(4): p. 223-30.
240. van der Wal, E.A., F. Gomez-Pinilla, and C.W. Cotman, *Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies*. Neuroreport, 1993. **4**(1): p. 69-72.
241. Skoog, I. and D. Gustafson, *Hypertension, hypertension-clustering factors and Alzheimer's disease*. Neurol Res, 2003. **25**(6): p. 675-80.
242. Takeda, S., et al., *The renin-angiotensin system, hypertension and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease: new therapeutic potential*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 2253-65.
243. Takeda, S., et al., *Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(15): p. 7036-41.
244. Sato, N. and R. Morishita, *Roles of vascular and metabolic components in cognitive dysfunction of Alzheimer disease: short- and long-term modification by non-genetic risk factors*. Front Aging Neurosci, 2013. **5**: p. 64.
245. Lo, R.Y. and W.J. Jagust, *Vascular burden and Alzheimer disease pathologic progression*. Neurology, 2012. **79**(13): p. 1349-55.
246. Jellinger, K.A., *Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update*. J Neural Transm, 2002. **109**(5-6): p. 813-36.
247. Launer, L.J., et al., *AD brain pathology: vascular origins? Results from the HAAS autopsy study*. Neurobiol Aging, 2008. **29**(10): p. 1587-90.
248. Toledo, J.B., et al., *Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre*. Brain, 2013. **136**(Pt 9): p. 2697-706.
249. Attems, J. and K.A. Jellinger, *The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease--lessons from pathology*. BMC Med, 2014. **12**: p. 206.
250. Zekry, D., et al., *Degenerative and vascular lesions of the brain have synergistic effects in dementia of the elderly*. Acta Neuropathol, 2002. **103**(5): p. 481-7.

251. Jamieson, G.A., et al., *Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains*. J Med Virol, 1991. **33**(4): p. 224-7.
252. Wozniak, M.A., A.P. Mee, and R.F. Itzhaki, *Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques*. J Pathol, 2009. **217**(1): p. 131-8.
253. Wozniak, M.A., et al., *Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients*. J Med Virol, 2005. **75**(2): p. 300-6.
254. Itzhaki, R.F., et al., *Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease*. Lancet, 1997. **349**(9047): p. 241-4.
255. Itzhaki, R.F. and M.A. Wozniak, *Could antivirals be used to treat Alzheimer's disease?* Future Microbiol, 2012. **7**(3): p. 307-9.
256. Wozniak, M.A., et al., *Antivirals reduce the formation of key Alzheimer's disease molecules in cell cultures acutely infected with herpes simplex virus type 1*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25152.
257. Mattson, M.P. and T. Magnus, *Ageing and neuronal vulnerability*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(4): p. 278-94.
258. Takeda, T., et al., *A new murine model of accelerated senescence*. Mech Ageing Dev, 1981. **17**(2): p. 183-94.
259. Miyamoto, M., et al., *Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM)*. Physiol Behav, 1986. **38**(3): p. 399-406.
260. Wang, F., H. Chen, and X. Sun, *Age-related spatial cognitive impairment is correlated with a decrease in ChAT in the cerebral cortex, hippocampus and forebrain of SAMP8 mice*. Neurosci Lett, 2009. **454**(3): p. 212-7.
261. Li, G., et al., *Hippocampal neuron loss is correlated with cognitive deficits in SAMP8 mice*. Neurol Sci, 2013. **34**(6): p. 963-9.
262. Miyamoto, M., *Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10*. Exp Gerontol, 1997. **32**(1-2): p. 139-48.
263. Flood, J.F. and J.E. Morley, *Learning and memory in the SAMP8 mouse*. Neurosci Biobehav Rev, 1998. **22**(1): p. 1-20.
264. Ohta, A., et al., *Deterioration in learning and memory of fear conditioning in response to context in aged SAMP8 mice*. Neurobiol Aging, 2001. **22**(3): p. 479-84.
265. Fontan-Lozano, A., et al., *Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice*. Mol Cell Neurosci, 2008. **39**(2): p. 193-201.
266. Lopez-Ramos, J.C., et al., *Learning capabilities and CA1-prefrontal synaptic plasticity in a mice model of accelerated senescence*. Neurobiol Aging, 2012. **33**(3): p. 627 e13-26.
267. Del Valle, J., et al., *Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice*. J Alzheimers Dis, 2010. **19**(4): p. 1303-15.

268. del Valle, J., et al., *Cerebral amyloid angiopathy, blood-brain barrier disruption and amyloid accumulation in SAMP8 mice*. *Neurodegener Dis*, 2011. **8**(6): p. 421-9.
269. Morley, J.E., et al., *Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory*. *Peptides*, 2000. **21**(12): p. 1761-7.
270. Sureda, F.X., et al., *Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8*. *Exp Gerontol*, 2006. **41**(4): p. 360-7.
271. Canudas, A.M., et al., *Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM)*. *Mech Ageing Dev*, 2005. **126**(12): p. 1300-4.
272. Zhu, Y., et al., *Cell death in the Purkinje cells of the cerebellum of senescence accelerated mouse (SAMP8)*. *Biogerontology*, 2007. **8**(5): p. 537-44.
273. Morley, J.E., et al., *The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1822**(5): p. 650-6.
274. Alvarez-Garcia, O., et al., *Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age*. *Biogerontology*, 2006. **7**(1): p. 43-52.
275. Chiba, Y., et al., *The senescence-accelerated mouse (SAM): a higher oxidative stress and age-dependent degenerative diseases model*. *Neurochem Res*, 2009. **34**(4): p. 679-87.
276. Bayram, B., et al., *Biomarkers of oxidative stress, antioxidant defence and inflammation are altered in the senescence-accelerated mouse prone 8*. *Age (Dordr)*, 2013. **35**(4): p. 1205-17.
277. Tha, K.K., et al., *Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8*. *Brain Res*, 2000. **885**(1): p. 25-31.
278. Butterfield, D.A. and H.F. Poon, *The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease*. *Exp Gerontol*, 2005. **40**(10): p. 774-83.
279. Pallas, M., et al., *From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8)*. *J Alzheimers Dis*, 2008. **15**(4): p. 615-24.
280. Cheng, X.R., W.X. Zhou, and Y.X. Zhang, *The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model*. *Ageing Res Rev*, 2014. **13**: p. 13-37.
281. Gutierrez-Cuesta, J., et al., *Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8*. *J Pineal Res*, 2007. **42**(4): p. 394-402.
282. Wang, C., et al., *DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice*. *Aging Cell*, 2009. **8**(3): p. 311-23.
283. Kawamata, T., et al., *Neuropathological studies on strains of senescence-accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory*. *Exp Gerontol*, 1997. **32**(1-2): p. 161-9.
284. del Valle, J., et al., *Dendritic spine abnormalities in hippocampal CA1 pyramidal neurons underlying memory deficits in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2012. **32**(1): p. 233-40.



285. Yagi, H., et al., *Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain*. J Neuropathol Exp Neurol, 1989. **48**(5): p. 577-90.
286. Chan, Y.C., et al., *Favorable effects of tea on reducing the cognitive deficits and brain morphological changes in senescence-accelerated mice*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2006. **52**(4): p. 266-73.
287. Wu, Y., A.Q. Zhang, and D.T. Yew, *Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus*. Neurochem Int, 2005. **46**(7): p. 565-74.
288. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 245-54.
289. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
290. Goll, M.G. and T.H. Bestor, *Eukaryotic cytosine methyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 481-514.
291. Chan, S.W., I.R. Henderson, and S.E. Jacobsen, *Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 351-60.
292. Ramsahoye, B.H., et al., *Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5237-42.
293. Haines, T.R., D.I. Rodenhiser, and P.J. Ainsworth, *Allele-specific non-CpG methylation of the Nf1 gene during early mouse development*. Dev Biol, 2001. **240**(2): p. 585-98.
294. Hark, A.T., et al., *CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 486-9.
295. Ehrlich, M., et al., *Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells*. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(8): p. 2709-21.
296. Jones, P.L., et al., *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 187-91.
297. Nan, X., et al., *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.
298. Sarraf, S.A. and I. Stancheva, *Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 595-605.
299. Klose, R.J., et al., *DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG*. Mol Cell, 2005. **19**(5): p. 667-78.
300. Tamaru, H. and E.U. Selker, *A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in Neurospora crassa*. Nature, 2001. **414**(6861): p. 277-83.
301. Jackson, J.P., et al., *Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 556-60.
302. Lehnertz, B., et al., *Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin*. Curr Biol, 2003. **13**(14): p. 1192-200.

303. Kornberg, R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, 1974. **184**(4139): p. 868-71.
304. Martin, C. and Y. Zhang, *The diverse functions of histone lysine methylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(11): p. 838-49.
305. Vakoc, C.R., et al., *Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin*. Mol Cell, 2005. **19**(3): p. 381-91.
306. Beisel, C., et al., *Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1*. Nature, 2002. **419**(6909): p. 857-62.
307. Briggs, S.D., et al., *Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 2001. **15**(24): p. 3286-95.
308. Nakamura, T., et al., *ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1119-28.
309. Sedkov, Y., et al., *Methylation at lysine 4 of histone H3 in ecdysone-dependent development of Drosophila*. Nature, 2003. **426**(6962): p. 78-83.
310. Shi, Y., et al., *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell, 2004. **119**(7): p. 941-53.
311. Wang, H., et al., *Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase*. Mol Cell, 2001. **8**(6): p. 1207-17.
312. Cloos, P.A., et al., *The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3*. Nature, 2006. **442**(7100): p. 307-11.
313. Klose, R.J., et al., *The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36*. Nature, 2006. **442**(7100): p. 312-6.
314. Krogan, N.J., et al., *Methylation of histone H3 by Set2 in Saccharomyces cerevisiae is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(12): p. 4207-18.
315. Tsukada, Y., et al., *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins*. Nature, 2006. **439**(7078): p. 811-6.
316. Whetstine, J.R., et al., *Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases*. Cell, 2006. **125**(3): p. 467-81.
317. Feng, Q., et al., *Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain*. Curr Biol, 2002. **12**(12): p. 1052-8.
318. Huyen, Y., et al., *Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 406-11.
319. Krogan, N.J., et al., *The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 721-9.
320. Fodor, B.D., et al., *Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells*. Genes Dev, 2006. **20**(12): p. 1557-62.

321. Johnson, L., X. Cao, and S. Jacobsen, *Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation*. *Curr Biol*, 2002. **12**(16): p. 1360-7.
322. Metzger, E., et al., *LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription*. *Nature*, 2005. **437**(7057): p. 436-9.
323. Nakayama, J., et al., *Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly*. *Science*, 2001. **292**(5514): p. 110-3.
324. Rea, S., et al., *Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases*. *Nature*, 2000. **406**(6796): p. 593-9.
325. Schultz, D.C., et al., *SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins*. *Genes Dev*, 2002. **16**(8): p. 919-32.
326. Shin, S. and R. Janknecht, *Diversity within the JMJD2 histone demethylase family*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **353**(4): p. 973-7.
327. Tachibana, M., et al., *Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 25309-17.
328. Yamane, K., et al., *JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor*. *Cell*, 2006. **125**(3): p. 483-95.
329. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. *Science*, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.
330. Nishioka, K., et al., *PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin*. *Mol Cell*, 2002. **9**(6): p. 1201-13.
331. Schotta, G., et al., *A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin*. *Genes Dev*, 2004. **18**(11): p. 1251-62.
332. Chang, B., et al., *JMJD6 is a histone arginine demethylase*. *Science*, 2007. **318**(5849): p. 444-7.
333. Guccione, E., et al., *Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive*. *Nature*, 2007. **449**(7164): p. 933-7.
334. Hyllus, D., et al., *PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation*. *Genes Dev*, 2007. **21**(24): p. 3369-80.
335. Iberg, A.N., et al., *Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(6): p. 3006-10.
336. Webby, C.J., et al., *Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing*. *Science*, 2009. **325**(5936): p. 90-3.
337. Daujat, S., et al., *Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3*. *Curr Biol*, 2002. **12**(24): p. 2090-7.
338. Di Lorenzo, A. and M.T. Bedford, *Histone arginine methylation*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(13): p. 2024-31.

339. Fabbrizio, E., et al., *Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5*. EMBO Rep, 2002. **3**(7): p. 641-5.
340. Pal, S., et al., *Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9630-45.
341. Harrison, M.J., Y.H. Tang, and D.H. Dowhan, *Protein arginine methyltransferase 6 regulates multiple aspects of gene expression*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(7): p. 2201-16.
342. Pal, S., et al., *mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7475-87.
343. Strahl, B.D., et al., *Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1*. Curr Biol, 2001. **11**(12): p. 996-1000.
344. Wang, H., et al., *Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor*. Science, 2001. **293**(5531): p. 853-7.
345. Santos-Rosa, H., et al., *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 407-11.
346. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2343-60.
347. Lee, D.Y., et al., *Role of protein methylation in regulation of transcription*. Endocr Rev, 2005. **26**(2): p. 147-70.
348. Bannister, A.J., et al., *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 120-4.
349. Lachner, M., et al., *Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 116-20.
350. Garcia-Bassets, I., et al., *Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors*. Cell, 2007. **128**(3): p. 505-18.
351. Wissmann, M., et al., *Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(3): p. 347-53.
352. Schurter, B.T., et al., *Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1*. Biochemistry, 2001. **40**(19): p. 5747-56.
353. Bauer, U.M., et al., *Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation*. EMBO Rep, 2002. **3**(1): p. 39-44.
354. Vettese-Dadey, M., et al., *Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro*. EMBO J, 1996. **15**(10): p. 2508-18.
355. Dhalluin, C., et al., *Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain*. Nature, 1999. **399**(6735): p. 491-6.
356. Hassan, A.H., et al., *Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes*. Cell, 2002. **111**(3): p. 369-79.

357. Kimura, A. and M. Horikoshi, *Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro*. *Genes Cells*, 1998. **3**(12): p. 789-800.
358. Schiltz, R.L., et al., *Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(3): p. 1189-92.
359. Kawasaki, H., et al., *ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation*. *Nature*, 2000. **405**(6783): p. 195-200.
360. Grant, P.A., et al., *Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(9): p. 5895-900.
361. Sobel, R.E., et al., *Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(4): p. 1237-41.
362. Spencer, T.E., et al., *Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase*. *Nature*, 1997. **389**(6647): p. 194-8.
363. Bird, A.W., et al., *Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair*. *Nature*, 2002. **419**(6905): p. 411-5.
364. Clarke, A.S., et al., *Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(4): p. 2515-26.
365. Kueh, A.J., et al., *HBO1 is required for H3K14 acetylation and normal transcriptional activity during embryonic development*. *Mol Cell Biol*, 2011. **31**(4): p. 845-60.
366. Ikura, T., et al., *Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis*. *Cell*, 2000. **102**(4): p. 463-73.
367. Miotto, B. and K. Struhl, *HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin*. *Mol Cell*, 2010. **37**(1): p. 57-66.
368. Parthun, M.R., J. Widom, and D.E. Gottschling, *The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism*. *Cell*, 1996. **87**(1): p. 85-94.
369. Iizuka, M., et al., *Histone acetyltransferase Hbo1: catalytic activity, cellular abundance, and links to primary cancers*. *Gene*, 2009. **436**(1-2): p. 108-14.
370. Kuo, M.H., et al., *Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines*. *Nature*, 1996. **383**(6597): p. 269-72.
371. Kelly, T.J., et al., *Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(19): p. 7051-8.
372. Yang, Y., et al., *Regulation and function of histone acetyltransferase MOF*. *Front Med*, 2014. **8**(1): p. 79-83.
373. Sterner, D.E. and S.L. Berger, *Acetylation of histones and transcription-related factors*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000. **64**(2): p. 435-59.
374. Glozak, M.A., et al., *Acetylation and deacetylation of non-histone proteins*. *Gene*, 2005. **363**: p. 15-23.

375. Marmorstein, R. and R.C. Trievel, *Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1789**(1): p. 58-68.
376. Graff, J. and L.H. Tsai, *Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin*. *Nat Rev Neurosci*, 2013. **14**(2): p. 97-111.
377. Graff, J. and L.H. Tsai, *The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013. **53**: p. 311-30.
378. Mahadevan, L.C., A.C. Willis, and M.J. Barratt, *Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors*. *Cell*, 1991. **65**(5): p. 775-83.
379. Sassone-Corsi, P., et al., *Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3*. *Science*, 1999. **285**(5429): p. 886-91.
380. Lo, W.S., et al., *Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1142-6.
381. Soloaga, A., et al., *MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14*. *EMBO J*, 2003. **22**(11): p. 2788-97.
382. Nowak, S.J. and V.G. Corces, *Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation*. *Trends Genet*, 2004. **20**(4): p. 214-20.
383. Fischle, W., et al., *Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation*. *Nature*, 2005. **438**(7071): p. 1116-22.
384. Wood, A., et al., *The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(37): p. 34739-42.
385. Kim, J., S.B. Hake, and R.G. Roeder, *The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions*. *Mol Cell*, 2005. **20**(5): p. 759-70.
386. Zhu, B., et al., *Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation*. *Mol Cell*, 2005. **20**(4): p. 601-11.
387. Henry, K.W., et al., *Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8*. *Genes Dev*, 2003. **17**(21): p. 2648-63.
388. Kao, C.F., et al., *Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B*. *Genes Dev*, 2004. **18**(2): p. 184-95.
389. Wang, H., et al., *Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing*. *Nature*, 2004. **431**(7010): p. 873-8.
390. Shiiio, Y. and R.N. Eisenman, *Histone sumoylation is associated with transcriptional repression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13225-30.
391. Cuthbert, G.L., et al., *Histone deimination antagonizes arginine methylation*. *Cell*, 2004. **118**(5): p. 545-53.

392. Wang, Y., et al., *Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation*. Science, 2004. **306**(5694): p. 279-83.
393. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
394. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
395. Okamura, K., et al., *The regulatory activity of microRNA\* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(4): p. 354-63.
396. Ro, S., et al., *Tissue-dependent paired expression of miRNAs*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(17): p. 5944-53.
397. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
398. Llave, C., et al., *Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2053-6.
399. Yekta, S., I.H. Shih, and D.P. Bartel, *MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA*. Science, 2004. **304**(5670): p. 594-6.
400. Wu, L., J. Fan, and J.G. Belasco, *MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4034-9.
401. Petersen, C.P., et al., *Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 533-42.
402. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 835-40.
403. Huntzinger, E. and E. Izaurralde, *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 99-110.
404. Ichimura, A., et al., *miRNAs and regulation of cell signaling*. FEBS J, 2011. **278**(10): p. 1610-8.
405. Inui, M., G. Martello, and S. Piccolo, *MicroRNA control of signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 252-63.
406. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
407. Landgraf, P., et al., *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1401-14.
408. Wang, W., E.J. Kwon, and L.H. Tsai, *MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases*. Learn Mem, 2012. **19**(9): p. 359-68.
409. Kosik, K.S. and A.M. Krichevsky, *The Elegance of the MicroRNAs: A Neuronal Perspective*. Neuron, 2005. **47**(6): p. 779-82.
410. Kim, J., et al., *Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 360-5.

411. Sempere, L.F., et al., *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation*. Genome Biol, 2004. **5**(3): p. R13.
412. De Pietri Tonelli, D., et al., *miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex*. Development, 2008. **135**(23): p. 3911-21.
413. Cheng, L.C., et al., *miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche*. Nat Neurosci, 2009. **12**(4): p. 399-408.
414. Fiore, R., et al., *Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels*. EMBO J, 2009. **28**(6): p. 697-710.
415. Vo, N., et al., *A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(45): p. 16426-31.
416. Siegel, G., et al., *A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(6): p. 705-16.
417. Schratt, G.M., et al., *A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development*. Nature, 2006. **439**(7074): p. 283-9.
418. Bak, M., et al., *MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system*. RNA, 2008. **14**(3): p. 432-44.
419. He, M., et al., *Cell-type-based analysis of microRNA profiles in the mouse brain*. Neuron, 2012. **73**(1): p. 35-48.
420. Obernosterer, G., et al., *Post-transcriptional regulation of microRNA expression*. RNA, 2006. **12**(7): p. 1161-7.
421. Kye, M.J., et al., *Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR*. RNA, 2007. **13**(8): p. 1224-34.
422. Natera-Naranjo, O., et al., *Identification and quantitative analyses of microRNAs located in the distal axons of sympathetic neurons*. RNA, 2010. **16**(8): p. 1516-29.
423. Liu, L., et al., *Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection*. Mech Ageing Dev, 2003. **124**(10-12): p. 989-98.
424. Liu, L., et al., *Insufficient DNA methylation affects healthy aging and promotes age-related health problems*. Clin Epigenetics, 2011. **2**(2): p. 349-60.
425. Heyn, H., et al., *Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. 10522-7.
426. Bjornsson, H.T., et al., *Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering*. JAMA, 2008. **299**(24): p. 2877-83.
427. Gentilini, D., et al., *Role of epigenetics in human aging and longevity: genome-wide DNA methylation profile in centenarians and centenarians' offspring*. Age (Dordr), 2013. **35**(5): p. 1961-73.



428. Bollati, V., et al., *Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects*. *Mech Ageing Dev*, 2009. **130**(4): p. 234-9.
429. Kim, M., et al., *DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk*. *PLoS One*, 2010. **5**(3): p. e9692.
430. Moore, L.E., et al., *Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study*. *Lancet Oncol*, 2008. **9**(4): p. 359-66.
431. Bennett-Baker, P.E., J. Wilkowski, and D.T. Burke, *Age-associated activation of epigenetically repressed genes in the mouse*. *Genetics*, 2003. **165**(4): p. 2055-62.
432. Madrigano, J., et al., *Aging and epigenetics: longitudinal changes in gene-specific DNA methylation*. *Epigenetics*, 2012. **7**(1): p. 63-70.
433. Christensen, B.C., et al., *Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context*. *PLoS Genet*, 2009. **5**(8): p. e1000602.
434. Salpea, P., et al., *Postnatal development- and age-related changes in DNA-methylation patterns in the human genome*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(14): p. 6477-94.
435. Murphy, T.M., A.S. Perry, and M. Lawler, *The emergence of DNA methylation as a key modulator of aberrant cell death in prostate cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2008. **15**(1): p. 11-25.
436. Funayama, R. and F. Ishikawa, *Cellular senescence and chromatin structure*. *Chromosoma*, 2007. **116**(5): p. 431-40.
437. Gronniger, E., et al., *Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(5): p. e1000971.
438. Bocklandt, S., et al., *Epigenetic predictor of age*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e14821.
439. Casillas, M.A., Jr., et al., *Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts*. *Mol Cell Biochem*, 2003. **252**(1-2): p. 33-43.
440. Li, Y., et al., *Age-dependent decreases in DNA methyltransferase levels and low transmethylation micronutrient levels synergize to promote overexpression of genes implicated in autoimmunity and acute coronary syndromes*. *Exp Gerontol*, 2010. **45**(4): p. 312-22.
441. Oliveira, A.M., T.J. Hemstedt, and H. Bading, *Rescue of aging-associated decline in Dnmt3a2 expression restores cognitive abilities*. *Nat Neurosci*, 2012. **15**(8): p. 1111-3.
442. Lin, M.J., et al., *DNA methyltransferase gene dDnmt2 and longevity of Drosophila*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(2): p. 861-4.
443. Goll, M.G., et al., *Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2*. *Science*, 2006. **311**(5759): p. 395-8.
444. Bell, J.T., et al., *Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(4): p. e1002629.
445. Dang, W., et al., *Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan*. *Nature*, 2009. **459**(7248): p. 802-7.

446. Kaeberlein, M., M. McVey, and L. Guarente, *The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms*. *Genes Dev*, 1999. **13**(19): p. 2570-80.
447. Viswanathan, M. and L. Guarente, *Regulation of Caenorhabditis elegans lifespan by sir-2.1 transgenes*. *Nature*, 2011. **477**(7365): p. E1-2.
448. Greer, E.L., et al., *Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in C. elegans*. *Nature*, 2010. **466**(7304): p. 383-7.
449. Greer, E.L., et al., *Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2011. **479**(7373): p. 365-71.
450. Jin, C., et al., *Histone demethylase UTX-1 regulates C. elegans life span by targeting the insulin/IGF-1 signaling pathway*. *Cell Metab*, 2011. **14**(2): p. 161-72.
451. Maures, T.J., et al., *The H3K27 demethylase UTX-1 regulates C. elegans lifespan in a germline-independent, insulin-dependent manner*. *Aging Cell*, 2011. **10**(6): p. 980-90.
452. Cheng, H.L., et al., *Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(19): p. 10794-9.
453. Lagouge, M., et al., *Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha*. *Cell*, 2006. **127**(6): p. 1109-22.
454. Oberdoerffer, P., et al., *SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging*. *Cell*, 2008. **135**(5): p. 907-18.
455. Pearson, K.J., et al., *Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span*. *Cell Metab*, 2008. **8**(2): p. 157-68.
456. Peleg, S., et al., *Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice*. *Science*, 2010. **328**(5979): p. 753-6.
457. Mostoslavsky, R., et al., *Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 315-29.
458. Han, Y., et al., *Stress-associated H3K4 methylation accumulates during postnatal development and aging of rhesus macaque brain*. *Aging Cell*, 2012. **11**(6): p. 1055-64.
459. O'Sullivan, R.J., et al., *Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(10): p. 1218-25.
460. Scaffidi, P. and T. Misteli, *Lamin A-dependent nuclear defects in human aging*. *Science*, 2006. **312**(5776): p. 1059-63.
461. Shumaker, D.K., et al., *Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(23): p. 8703-8.
462. Narita, M., et al., *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. *Cell*, 2003. **113**(6): p. 703-16.
463. Zhang, R., et al., *Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA*. *Dev Cell*, 2005. **8**(1): p. 19-30.

464. Polo, S.E. and S.P. Jackson, *Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications*. Genes Dev, 2011. **25**(5): p. 409-33.
465. Sedelnikova, O.A., et al., *Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(2): p. 168-70.
466. Sedelnikova, O.A., et al., *Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging*. Aging Cell, 2008. **7**(1): p. 89-100.
467. Herbig, U., et al., *Cellular senescence in aging primates*. Science, 2006. **311**(5765): p. 1257.
468. Lanceta, J., et al., *MicroRNA group disorganization in aging*. Exp Gerontol, 2010. **45**(4): p. 269-78.
469. Zhang, J., et al., *Comparative profiling of genes and miRNAs expressed in the newborn, young adult, and aged human epididymides*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010. **42**(2): p. 145-53.
470. Ibanez-Ventoso, C. and M. Driscoll, *MicroRNAs in C. elegans Aging: Molecular Insurance for Robustness?* Curr Genomics, 2009. **10**(3): p. 144-53.
471. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D152-7.
472. Pincus, Z., T. Smith-Vikos, and F.J. Slack, *MicroRNA predictors of longevity in Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet, 2011. **7**(9): p. e1002306.
473. Kato, M., et al., *Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in C. elegans*. RNA, 2011. **17**(10): p. 1804-20.
474. de Lencastre, A., et al., *MicroRNAs both promote and antagonize longevity in C. elegans*. Curr Biol, 2010. **20**(24): p. 2159-68.
475. Ibanez-Ventoso, C., et al., *Modulated microRNA expression during adult lifespan in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2006. **5**(3): p. 235-46.
476. Kimura, K.D., et al., *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. Science, 1997. **277**(5328): p. 942-6.
477. Tatar, M., et al., *A mutant Drosophila insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function*. Science, 2001. **292**(5514): p. 107-10.
478. Bluher, M., B.B. Kahn, and C.R. Kahn, *Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue*. Science, 2003. **299**(5606): p. 572-4.
479. Boehm, M. and F. Slack, *A developmental timing microRNA and its target regulate life span in C. elegans*. Science, 2005. **310**(5756): p. 1954-7.
480. Kato, M., et al., *TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(7): p. 881-9.
481. Sayed, D. and M. Abdellatif, *AKT-ing via microRNA*. Cell Cycle, 2010. **9**(16): p. 3213-7.
482. Wang, X.H., et al., *MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009. **36**(2): p. 181-8.

483. Shan, Z.X., et al., *Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **381**(4): p. 597-601.
484. Wei, Y., Y.J. Zhang, and Y. Cai, *Growth or longevity: the TOR's decision on lifespan regulation*. *Biogerontology*, 2013. **14**(4): p. 353-63.
485. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. *Cell*, 2012. **149**(2): p. 274-93.
486. Kaeberlein, M., et al., *Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients*. *Science*, 2005. **310**(5751): p. 1193-6.
487. Jia, K., D. Chen, and D.L. Riddle, *The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate C. elegans larval development, metabolism and life span*. *Development*, 2004. **131**(16): p. 3897-906.
488. Vellai, T., et al., *Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in C. elegans*. *Nature*, 2003. **426**(6967): p. 620.
489. Kapahi, P., et al., *Regulation of lifespan in Drosophila by modulation of genes in the TOR signaling pathway*. *Curr Biol*, 2004. **14**(10): p. 885-90.
490. Harrison, D.E., et al., *Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice*. *Nature*, 2009. **460**(7253): p. 392-5.
491. Menghini, R., et al., *MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1*. *Circulation*, 2009. **120**(15): p. 1524-32.
492. Lee, J., et al., *A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(17): p. 12604-11.
493. Strum, J.C., et al., *MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1*. *Mol Endocrinol*, 2009. **23**(11): p. 1876-84.
494. Rane, S., et al., *Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes*. *Circ Res*, 2009. **104**(7): p. 879-86.
495. Han, M., J. Toli, and M. Abdellatif, *MicroRNAs in the cardiovascular system*. *Curr Opin Cardiol*, 2011. **26**(3): p. 181-9.
496. D'Alessandra, Y., et al., *Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction*. *Eur Heart J*, 2010. **31**(22): p. 2765-73.
497. Sayed, D., et al., *MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy*. *Circ Res*, 2007. **100**(3): p. 416-24.
498. Hamrick, M.W., et al., *The adipokine leptin increases skeletal muscle mass and significantly alters skeletal muscle miRNA expression profile in aged mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **400**(3): p. 379-83.
499. Guller, I. and A.P. Russell, *MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function*. *J Physiol*, 2010. **588**(Pt 21): p. 4075-87.

500. Chen, J.F., T.E. Callis, and D.Z. Wang, *microRNAs and muscle disorders*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 1): p. 13-20.
501. Rottiers, V. and A.M. Naar, *MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 239-50.
502. Vinciguerra, M., et al., *Unsaturated fatty acids inhibit the expression of tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN) via microRNA-21 up-regulation in hepatocytes*. Hepatology, 2009. **49**(4): p. 1176-84.
503. Junn, E. and M.M. Mouradian, *MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential*. Pharmacol Ther, 2012. **133**(2): p. 142-50.
504. Provost, P., *MicroRNAs as a molecular basis for mental retardation, Alzheimer's and prion diseases*. Brain Res, 2010. **1338**: p. 58-66.
505. Eacker, S.M., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Understanding microRNAs in neurodegeneration*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(12): p. 837-41.
506. Smith, P., et al., *In vivo regulation of amyloid precursor protein neuronal splicing by microRNAs*. J Neurochem, 2011. **116**(2): p. 240-7.
507. Vilardo, E., et al., *MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons*. J Biol Chem, 2010. **285**(24): p. 18344-51.
508. Zhu, H.C., et al., *MicroRNA-195 downregulates Alzheimer's disease amyloid-beta production by targeting BACE1*. Brain Res Bull, 2012. **88**(6): p. 596-601.
509. Hebert, S.S., et al., *Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(17): p. 6415-20.
510. Wang, W.X., et al., *The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1*. J Neurosci, 2008. **28**(5): p. 1213-23.
511. Boissonneault, V., et al., *MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1*. J Biol Chem, 2009. **284**(4): p. 1971-81.
512. Haskell, W.L., et al., *Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association*. Med Sci Sports Exerc, 2007. **39**(8): p. 1423-34.
513. Nelson, M.E., et al., *Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association*. Med Sci Sports Exerc, 2007. **39**(8): p. 1435-45.
514. Chodzko-Zajko, W.J., et al., *American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults*. Med Sci Sports Exerc, 2009. **41**(7): p. 1510-30.
515. Gremeaux, V., et al., *Long-term lifestyle intervention with optimized high-intensity interval training improves body composition, cardiometabolic risk, and exercise parameters in patients with abdominal obesity*. Am J Phys Med Rehabil, 2012. **91**(11): p. 941-50.
516. Schoeller, D.A., *Measurement of energy expenditure in free-living humans by using doubly labeled water*. J Nutr, 1988. **118**(11): p. 1278-89.

517. Crouter, S.E., K.G. Clowers, and D.R. Bassett, Jr., *A novel method for using accelerometer data to predict energy expenditure*. J Appl Physiol (1985), 2006. **100**(4): p. 1324-31.
518. Strath, S.J., et al., *Validity of the simultaneous heart rate-motion sensor technique for measuring energy expenditure*. Med Sci Sports Exerc, 2002. **34**(5): p. 888-94.
519. Freedson, P.S. and K. Miller, *Objective monitoring of physical activity using motion sensors and heart rate*. Res Q Exerc Sport, 2000. **71**(2 Suppl): p. S21-9.
520. Ainslie, P., T. Reilly, and K. Westerterp, *Estimating human energy expenditure: a review of techniques with particular reference to doubly labelled water*. Sports Med, 2003. **33**(9): p. 683-98.
521. Voss, M.W., et al., *Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity*. Trends Cogn Sci, 2013. **17**(10): p. 525-44.
522. O'Callaghan, R.M., E.W. Griffin, and A.M. Kelly, *Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus*. Hippocampus, 2009. **19**(10): p. 1019-29.
523. Greenwood, B.N., et al., *Exercise-induced stress resistance is independent of exercise controllability and the medial prefrontal cortex*. Eur J Neurosci, 2013. **37**(3): p. 469-78.
524. Brown, D.A., et al., *Short-term treadmill running in the rat: what kind of stressor is it?* J Appl Physiol (1985), 2007. **103**(6): p. 1979-85.
525. Novak, C.M., P.R. Burghardt, and J.A. Levine, *The use of a running wheel to measure activity in rodents: relationship to energy balance, general activity, and reward*. Neurosci Biobehav Rev, 2012. **36**(3): p. 1001-14.
526. De Bono, J.P., et al., *Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **290**(4): p. R926-34.
527. Hermes, G., et al., *Post-weaning chronic social isolation produces profound behavioral dysregulation with decreases in prefrontal cortex synaptic-associated protein expression in female rats*. Physiol Behav, 2011. **104**(2): p. 354-9.
528. Valzelli, L., *The "isolation syndrome" in mice*. Psychopharmacologia, 1973. **31**(4): p. 305-20.
529. Weiss, I.C., et al., *Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat*. Behav Brain Res, 2004. **152**(2): p. 279-95.
530. Fone, K.C. and M.V. Porkess, *Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders*. Neurosci Biobehav Rev, 2008. **32**(6): p. 1087-102.
531. Bianchi, M., et al., *Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(10): p. 2894-902.
532. Grippo, A.J., et al., *Social isolation disrupts autonomic regulation of the heart and influences negative affective behaviors*. Biol Psychiatry, 2007. **62**(10): p. 1162-70.
533. Stranahan, A.M., D. Khalil, and E. Gould, *Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis*. Nat Neurosci, 2006. **9**(4): p. 526-33.

534. Bassuk, S.S. and J.E. Manson, *Physical activity and cardiovascular disease prevention in women: a review of the epidemiologic evidence*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010. **20**(6): p. 467-73.
535. Bianchi, C., et al., *Optimizing management of metabolic syndrome to reduce risk: focus on life-style*. *Intern Emerg Med*, 2008. **3**(2): p. 87-98.
536. Colberg, S.R., *Physical activity, insulin action, and diabetes prevention and control*. *Curr Diabetes Rev*, 2007. **3**(3): p. 176-84.
537. Horton, E.S., *Effects of lifestyle changes to reduce risks of diabetes and associated cardiovascular risks: results from large scale efficacy trials*. *Obesity* (Silver Spring), 2009. **17 Suppl 3**: p. S43-8.
538. Metkus, T.S., Jr., K.L. Baughman, and P.D. Thompson, *Exercise prescription and primary prevention of cardiovascular disease*. *Circulation*, 2010. **121**(23): p. 2601-4.
539. Mobius-Winkler, S., et al., *How to improve endothelial repair mechanisms: the lifestyle approach*. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010. **8**(4): p. 573-80.
540. Saraceni, C. and T.L. Broderick, *Cardiac and metabolic consequences of aerobic exercise training in experimental diabetes*. *Curr Diabetes Rev*, 2007. **3**(1): p. 75-84.
541. Zanuso, S., et al., *Exercise for the management of type 2 diabetes: a review of the evidence*. *Acta Diabetol*, 2010. **47**(1): p. 15-22.
542. Balady, G.J., et al., *Usefulness of exercise testing in the prediction of coronary disease risk among asymptomatic persons as a function of the Framingham risk score*. *Circulation*, 2004. **110**(14): p. 1920-5.
543. Blair, S.N., et al., *Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women*. *JAMA*, 1996. **276**(3): p. 205-10.
544. Blair, S.N., et al., *Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men*. *JAMA*, 1995. **273**(14): p. 1093-8.
545. Goraya, T.Y., et al., *Prognostic value of treadmill exercise testing in elderly persons*. *Ann Intern Med*, 2000. **132**(11): p. 862-70.
546. Gregg, E.W., et al., *Relationship of changes in physical activity and mortality among older women*. *JAMA*, 2003. **289**(18): p. 2379-86.
547. Manson, J.E., et al., *Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(10): p. 716-25.
548. Manson, J.E., et al., *A prospective study of walking as compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(9): p. 650-8.
549. Myers, J., et al., *Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(11): p. 793-801.
550. Schiattarella, G.G., et al., *Physical activity in the prevention of peripheral artery disease in the elderly*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 12.
551. Vigorito, C. and F. Giallauria, *Effects of exercise on cardiovascular performance in the elderly*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 51.

552. Kokkinos, P., et al., *Exercise capacity and mortality in black and white men*. *Circulation*, 2008. **117**(5): p. 614-22.
553. Kujala, U.M., et al., *Relationship of leisure-time physical activity and mortality: the Finnish twin cohort*. *JAMA*, 1998. **279**(6): p. 440-4.
554. Myers, J., et al., *Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men*. *Am J Med*, 2004. **117**(12): p. 912-8.
555. Gulati, M., et al., *Exercise capacity and the risk of death in women: the St James Women Take Heart Project*. *Circulation*, 2003. **108**(13): p. 1554-9.
556. Mora, S., et al., *Ability of exercise testing to predict cardiovascular and all-cause death in asymptomatic women: a 20-year follow-up of the lipid research clinics prevalence study*. *JAMA*, 2003. **290**(12): p. 1600-7.
557. Morris, J.N., *Exercise in the prevention of coronary heart disease: today's best buy in public health*. *Med Sci Sports Exerc*, 1994. **26**(7): p. 807-14.
558. Chobanian, A.V., et al., *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report*. *JAMA*, 2003. **289**(19): p. 2560-72.
559. *The World Health report 2002: reducing risks, promoting healthy life*, 2002, World Health Organization: Geneva, World Health Organization, 2002. p. 1-230.
560. Cornelissen, V.A. and R.H. Fagard, *Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors*. *Hypertension*, 2005. **46**(4): p. 667-75.
561. Fagard, R.H., *Exercise characteristics and the blood pressure response to dynamic physical training*. *Med Sci Sports Exerc*, 2001. **33**(6 Suppl): p. S484-92; discussion S493-4.
562. Grimm, R.H., Jr., et al., *Relationships of quality-of-life measures to long-term lifestyle and drug treatment in the Treatment of Mild Hypertension Study*. *Arch Intern Med*, 1997. **157**(6): p. 638-48.
563. Kokkinos, P.F., P. Narayan, and V. Papademetriou, *Exercise as hypertension therapy*. *Cardiol Clin*, 2001. **19**(3): p. 507-16.
564. Pescatello, L.S., et al., *American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension*. *Med Sci Sports Exerc*, 2004. **36**(3): p. 533-53.
565. Helmrich, S.P., et al., *Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(3): p. 147-52.
566. Hu, F.B., et al., *Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women: a prospective study*. *JAMA*, 1999. **282**(15): p. 1433-9.
567. Manson, J.E., et al., *A prospective study of exercise and incidence of diabetes among US male physicians*. *JAMA*, 1992. **268**(1): p. 63-7.
568. Church, T.S., et al., *Cardiorespiratory fitness and body mass index as predictors of cardiovascular disease mortality among men with diabetes*. *Arch Intern Med*, 2005. **165**(18): p. 2114-20.



569. Hu, F.B., et al., *Physical activity and risk for cardiovascular events in diabetic women*. Ann Intern Med, 2001. **134**(2): p. 96-105.
570. Wei, M., et al., *Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes*. Ann Intern Med, 2000. **132**(8): p. 605-11.
571. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. N Engl J Med, 2002. **346**(6): p. 393-403.
572. Tuomilehto, J., et al., *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance*. N Engl J Med, 2001. **344**(18): p. 1343-50.
573. Miller, J.P., et al., *Strength training increases insulin action in healthy 50- to 65-yr-old men*. J Appl Physiol (1985), 1994. **77**(3): p. 1122-7.
574. Smutok, M.A., et al., *Aerobic versus strength training for risk factor intervention in middle-aged men at high risk for coronary heart disease*. Metabolism, 1993. **42**(2): p. 177-84.
575. Shepherd, P.R. and B.B. Kahn, *Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1999. **341**(4): p. 248-57.
576. Durstine, J.L. and W.L. Haskell, *Effects of exercise training on plasma lipids and lipoproteins*. Exerc Sport Sci Rev, 1994. **22**: p. 477-521.
577. Kokkinos, P.F. and B. Fernhall, *Physical activity and high density lipoprotein cholesterol levels: what is the relationship?* Sports Med, 1999. **28**(5): p. 307-14.
578. Leon, A.S. and O.A. Sanchez, *Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention*. Med Sci Sports Exerc, 2001. **33**(6 Suppl): p. S502-15; discussion S528-9.
579. Kokkinos, P.F., et al., *Miles run per week and high-density lipoprotein cholesterol levels in healthy, middle-aged men. A dose-response relationship*. Arch Intern Med, 1995. **155**(4): p. 415-20.
580. Kraus, W.E., et al., *Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins*. N Engl J Med, 2002. **347**(19): p. 1483-92.
581. Stefanick, M.L., et al., *Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol*. N Engl J Med, 1998. **339**(1): p. 12-20.
582. Williams, P.T., *High-density lipoprotein cholesterol and other risk factors for coronary heart disease in female runners*. N Engl J Med, 1996. **334**(20): p. 1298-303.
583. Wood, P.D., et al., *The effects on plasma lipoproteins of a prudent weight-reducing diet, with or without exercise, in overweight men and women*. N Engl J Med, 1991. **325**(7): p. 461-6.
584. Church, T.S., et al., *Associations between cardiorespiratory fitness and C-reactive protein in men*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1869-76.
585. Abramson, J.L. and V. Vaccarino, *Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults*. Arch Intern Med, 2002. **162**(11): p. 1286-92.
586. Ford, E.S., *Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults*. Epidemiology, 2002. **13**(5): p. 561-8.

587. Mattusch, F., et al., *Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training*. Int J Sports Med, 2000. **21**(1): p. 21-4.
588. Yeh, E.T. and J.T. Willerson, *Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 370-1.
589. Ridker, P.M., R.J. Glynn, and C.H. Hennekens, *C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction*. Circulation, 1998. **97**(20): p. 2007-11.
590. Golbidi, S. and I. Laher, *Exercise induced adipokine changes and the metabolic syndrome*. J Diabetes Res, 2014. **2014**: p. 726861.
591. Lockard, M.M., et al., *Exercise training-induced changes in coagulation factors in older adults*. Med Sci Sports Exerc, 2007. **39**(4): p. 587-92.
592. Wang, J.S., et al., *Effects of exercise training and deconditioning on platelet aggregation induced by alternating shear stress in men*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(2): p. 454-60.
593. Womack, C.J., P.R. Nagelkirk, and A.M. Coughlin, *Exercise-induced changes in coagulation and fibrinolysis in healthy populations and patients with cardiovascular disease*. Sports Med, 2003. **33**(11): p. 795-807.
594. Colcombe, S. and A.F. Kramer, *Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study*. Psychol Sci, 2003. **14**(2): p. 125-30.
595. Smith, P.J., et al., *Aerobic exercise and neurocognitive performance: a meta-analytic review of randomized controlled trials*. Psychosom Med, 2010. **72**(3): p. 239-52.
596. Colcombe, S.J., et al., *Aerobic exercise training increases brain volume in aging humans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006. **61**(11): p. 1166-70.
597. Colcombe, S.J., et al., *Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3316-21.
598. Gordon, B.A., et al., *Neuroanatomical correlates of aging, cardiopulmonary fitness level, and education*. Psychophysiology, 2008. **45**(5): p. 825-38.
599. Marks, B.L., et al., *Role of aerobic fitness and aging on cerebral white matter integrity*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1097**: p. 171-4.
600. Colcombe, S.J., et al., *Aerobic fitness reduces brain tissue loss in aging humans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2003. **58**(2): p. 176-80.
601. Davatzikos, C. and S.M. Resnick, *Degenerative age changes in white matter connectivity visualized in vivo using magnetic resonance imaging*. Cereb Cortex, 2002. **12**(7): p. 767-71.
602. O'Sullivan, M., et al., *Evidence for cortical "disconnection" as a mechanism of age-related cognitive decline*. Neurology, 2001. **57**(4): p. 632-8.
603. Erickson, K.I., et al., *Physical activity predicts gray matter volume in late adulthood: the Cardiovascular Health Study*. Neurology, 2010. **75**(16): p. 1415-22.

604. Erickson, K.I., et al., *Aerobic fitness is associated with hippocampal volume in elderly humans*. *Hippocampus*, 2009. **19**(10): p. 1030-9.
605. Erickson, K.I., et al., *Exercise training increases size of hippocampus and improves memory*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(7): p. 3017-22.
606. Pereira, A.C., et al., *An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(13): p. 5638-43.
607. Chaddock, L., et al., *A neuroimaging investigation of the association between aerobic fitness, hippocampal volume, and memory performance in preadolescent children*. *Brain Res*, 2010. **1358**: p. 172-83.
608. Chaddock, L., et al., *Aerobic fitness and executive control of relational memory in preadolescent children*. *Med Sci Sports Exerc*, 2011. **43**(2): p. 344-9.
609. Brown, J., et al., *Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis*. *Eur J Neurosci*, 2003. **17**(10): p. 2042-6.
610. Trejo, J.L., E. Carro, and I. Torres-Aleman, *Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus*. *J Neurosci*, 2001. **21**(5): p. 1628-34.
611. van Praag, H., et al., *Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(23): p. 13427-31.
612. van Praag, H., G. Kempermann, and F.H. Gage, *Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus*. *Nat Neurosci*, 1999. **2**(3): p. 266-70.
613. Cotman, C.W. and N.C. Berchtold, *Physical activity and the maintenance of cognition: learning from animal models*. *Alzheimers Dement*, 2007. **3**(2 Suppl): p. S30-7.
614. Eadie, B.D., V.A. Redila, and B.R. Christie, *Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density*. *J Comp Neurol*, 2005. **486**(1): p. 39-47.
615. van Praag, H., et al., *Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice*. *J Neurosci*, 2005. **25**(38): p. 8680-5.
616. Kim, H., et al., *The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups*. *Int J Dev Neurosci*, 2007. **25**(4): p. 243-9.
617. Lee, H.H., et al., *Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups*. *Brain Dev*, 2006. **28**(3): p. 147-54.
618. Blackmore, D.G., et al., *Exercise increases neural stem cell number in a growth hormone-dependent manner, augmenting the regenerative response in aged mice*. *Stem Cells*, 2009. **27**(8): p. 2044-52.
619. Kannangara, T.S., et al., *Running reduces stress and enhances cell genesis in aged mice*. *Neurobiol Aging*, 2011. **32**(12): p. 2279-86.
620. Kleim, J.A., N.R. Cooper, and P.M. VandenBerg, *Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex*. *Brain Res*, 2002. **934**(1): p. 1-6.

621. Ding, Y., et al., *Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin*. *Neuroscience*, 2004. **124**(3): p. 583-91.
622. Lopez-Lopez, C., D. LeRoith, and I. Torres-Aleman, *Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(26): p. 9833-8.
623. Ding, Q., et al., *Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function*. *Neuroscience*, 2006. **140**(3): p. 823-33.
624. Fabel, K., et al., *VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis*. *Eur J Neurosci*, 2003. **18**(10): p. 2803-12.
625. Martinowich, K., H. Manji, and B. Lu, *New insights into BDNF function in depression and anxiety*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(9): p. 1089-93.
626. Adlard, P.A. and C.W. Cotman, *Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression*. *Neuroscience*, 2004. **124**(4): p. 985-92.
627. Cotman, C.W. and N.C. Berchtold, *Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity*. *Trends Neurosci*, 2002. **25**(6): p. 295-301.
628. Yamada, K., M. Mizuno, and T. Nabeshima, *Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory*. *Life Sci*, 2002. **70**(7): p. 735-44.
629. Vaynman, S., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla, *Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields*. *J Neurosci Res*, 2004. **76**(3): p. 356-62.
630. Vaynman, S., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla, *Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition*. *Eur J Neurosci*, 2004. **20**(10): p. 2580-90.
631. Berchtold, N.C., et al., *Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus*. *Neuroscience*, 2005. **133**(3): p. 853-61.
632. Binder, E., et al., *Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice*. *Behav Brain Res*, 2004. **155**(2): p. 197-206.
633. Droste, S.K., et al., *Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level*. *Neuroendocrinology*, 2007. **86**(1): p. 26-37.
634. Droste, S.K., et al., *Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis*. *Endocrinology*, 2003. **144**(7): p. 3012-23.
635. Greenwood, B.N., et al., *Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons*. *J Neurosci*, 2003. **23**(7): p. 2889-98.
636. Dimeo, F., et al., *Benefits from aerobic exercise in patients with major depression: a pilot study*. *Br J Sports Med*, 2001. **35**(2): p. 114-7.
637. Lai, S.M., et al., *Therapeutic exercise and depressive symptoms after stroke*. *J Am Geriatr Soc*, 2006. **54**(2): p. 240-7.

638. Singh, N.A., et al., *A randomized controlled trial of high versus low intensity weight training versus general practitioner care for clinical depression in older adults*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2005. **60**(6): p. 768-76.
639. Nibuya, M., S. Morinobu, and R.S. Duman, *Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments*. J Neurosci, 1995. **15**(11): p. 7539-47.
640. Hunsberger, J.G., et al., *Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF*. Nat Med, 2007. **13**(12): p. 1476-82.
641. Karp, A., et al., *Mental, physical and social components in leisure activities equally contribute to decrease dementia risk*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2006. **21**(2): p. 65-73.
642. Vaynman, S. and F. Gomez-Pinilla, *Revenge of the "sit": how lifestyle impacts neuronal and cognitive health through molecular systems that interface energy metabolism with neuronal plasticity*. J Neurosci Res, 2006. **84**(4): p. 699-715.
643. Wilson, R.S., et al., *Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease*. JAMA, 2002. **287**(6): p. 742-8.
644. Etner, J.L., et al., *A meta-regression to examine the relationship between aerobic fitness and cognitive performance*. Brain Res Rev, 2006. **52**(1): p. 119-30.
645. Heyn, P., B.C. Abreu, and K.J. Ottenbacher, *The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis*. Arch Phys Med Rehabil, 2004. **85**(10): p. 1694-704.
646. Burns, J.M., et al., *Cardiorespiratory fitness in early-stage Alzheimer disease*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2008. **22**(1): p. 39-46.
647. Honea, R.A., et al., *Cardiorespiratory fitness and preserved medial temporal lobe volume in Alzheimer disease*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2009. **23**(3): p. 188-97.
648. Weinstein, A.M., et al., *The association between aerobic fitness and executive function is mediated by prefrontal cortex volume*. Brain Behav Immun, 2012. **26**(5): p. 811-9.
649. Lautenschlager, N.T., et al., *Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial*. JAMA, 2008. **300**(9): p. 1027-37.
650. Burdette, J.H., et al., *Using network science to evaluate exercise-associated brain changes in older adults*. Front Aging Neurosci, 2010. **2**: p. 23.
651. Voss, M.W., et al., *Functional connectivity: a source of variance in the association between cardiorespiratory fitness and cognition?* Neuropsychologia, 2010. **48**(5): p. 1394-406.
652. Voss, M.W., et al., *Plasticity of brain networks in a randomized intervention trial of exercise training in older adults*. Front Aging Neurosci, 2010. **2**.
653. Hamer, M. and Y. Chida, *Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence*. Psychol Med, 2009. **39**(1): p. 3-11.
654. Middleton, L.E., et al., *Physical activity over the life course and its association with cognitive performance and impairment in old age*. J Am Geriatr Soc, 2010. **58**(7): p. 1322-6.

655. Liang, K.Y., et al., *Exercise and Alzheimer's disease biomarkers in cognitively normal older adults*. *Ann Neurol*, 2010. **68**(3): p. 311-8.
656. Head, D., et al., *Exercise Engagement as a Moderator of the Effects of APOE Genotype on Amyloid Deposition*. *Arch Neurol*, 2012. **69**(5): p. 636-43.
657. Adlard, P.A., et al., *Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease*. *J Neurosci*, 2005. **25**(17): p. 4217-21.
658. Sakurai, T., et al., *Involvement of leucine zipper transcription factor-like protein 1 (Lztfl1) in the attenuation of cognitive impairment by exercise training*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **416**(1-2): p. 125-9.
659. Bayod, S., et al., *Voluntary Exercise Promotes Beneficial Anti-aging Mechanisms in SAMP8 Female Brain*. *J Mol Neurosci*, 2015. **55**(2): p. 525-32.
660. Sanchez-Roige, S., et al., *Long-term wheel running changes on sensorimotor activity and skeletal muscle in male and female mice of accelerated senescence*. *Age (Dordr)*, 2014. **36**(5): p. 9697.
661. Barres, R., et al., *Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle*. *Cell Metab*, 2012. **15**(3): p. 405-11.
662. Nitert, M.D., et al., *Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2012. **61**(12): p. 3322-32.
663. McGee, S.L., et al., *Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 24): p. 5951-8.
664. Vissing, K., et al., *Effect of sex differences on human MEF2 regulation during endurance exercise*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **294**(2): p. E408-15.
665. Keller, P., et al., *A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype*. *J Appl Physiol (1985)*, 2011. **110**(1): p. 46-59.
666. Nakajima, K., et al., *Exercise effects on methylation of ASC gene*. *Int J Sports Med*, 2010. **31**(9): p. 671-5.
667. Radom-Aizik, S., et al., *Effects of exercise on microRNA expression in young males peripheral blood mononuclear cells*. *Clin Transl Sci*, 2012. **5**(1): p. 32-8.
668. Gomez-Pinilla, F., et al., *Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation*. *Eur J Neurosci*, 2011. **33**(3): p. 383-90.
669. Tsankova, N.M., et al., *Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action*. *Nat Neurosci*, 2006. **9**(4): p. 519-25.
670. Fischer, A., et al., *Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling*. *Nature*, 2007. **447**(7141): p. 178-82.
671. Guan, J.S., et al., *HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity*. *Nature*, 2009. **459**(7243): p. 55-60.
672. Abel, T. and R.S. Zukin, *Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders*. *Curr Opin Pharmacol*, 2008. **8**(1): p. 57-64.

673. Fischer, A., et al., *Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(12): p. 605-17.
674. Sananbenesi, F. and A. Fischer, *The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases*. Biol Chem, 2009. **390**(11): p. 1145-53.
675. Stilling, R.M. and A. Fischer, *The role of histone acetylation in age-associated memory impairment and Alzheimer's disease*. Neurobiol Learn Mem, 2011. **96**(1): p. 19-26.
676. Elsner, V.R., et al., *Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus*. Neuroscience, 2011. **192**: p. 580-7.
677. Selvi, B.R., et al., *Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(10-12): p. 840-53.
678. Collins, A., et al., *Exercise improves cognitive responses to psychological stress through enhancement of epigenetic mechanisms and gene expression in the dentate gyrus*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4330.
679. Sommer, M., et al., *DeltaNp63alpha overexpression induces downregulation of Sirt1 and an accelerated aging phenotype in the mouse*. Cell Cycle, 2006. **5**(17): p. 2005-11.
680. Sasaki, T., et al., *Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal*. Aging Cell, 2006. **5**(5): p. 413-22.
681. Ferrara, N., et al., *Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats*. Rejuvenation Res, 2008. **11**(1): p. 139-50.
682. Koltai, E., et al., *Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats*. Mech Ageing Dev, 2010. **131**(1): p. 21-8.
683. Dumke, C.L., et al., *Successive bouts of cycling stimulates genes associated with mitochondrial biogenesis*. Eur J Appl Physiol, 2009. **107**(4): p. 419-27.
684. Gurd, B.J., et al., *High-intensity interval training increases SIRT1 activity in human skeletal muscle*. Appl Physiol Nutr Metab, 2010. **35**(3): p. 350-7.
685. Marfe, G., et al., *The effect of marathon on mRNA expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins and sirtuins family in male recreational long-distance runners*. BMC Physiol, 2010. **10**: p. 7.
686. Saijo, K., et al., *A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death*. Cell, 2009. **137**(1): p. 47-59.
687. Hanzu, F.A., et al., *Histone demethylase KDM1A represses inflammatory gene expression in preadipocytes*. Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(12): p. E616-25.
688. Siebold, A.P., et al., *Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate Drosophila longevity and stress resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 169-74.
689. Ooi, L. and I.C. Wood, *Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(7): p. 544-54.
690. Lu, T., et al., *REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease*. Nature, 2014. **507**(7493): p. 448-54.

691. Amente, S., L. Lania, and B. Majello, *The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1829**(10): p. 981-6.
692. Janzer, A., et al., *Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylase 1 (HDAC1) synergistically repress proinflammatory cytokines and classical complement pathway components*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **421**(4): p. 665-70.
693. Mosammamarast, N., et al., *The histone demethylase LSD1/KDM1A promotes the DNA damage response*. *J Cell Biol*, 2013. **203**(3): p. 457-70.
694. Porro, A., S. Feuerhahn, and J. Lingner, *TERRA-reinforced association of LSD1 with MRE11 promotes processing of uncapped telomeres*. *Cell Rep*, 2014. **6**(4): p. 765-76.
695. Jarriault, S. and I. Greenwald, *Suppressors of the egg-laying defective phenotype of sel-12 presenilin mutants implicate the CoREST corepressor complex in LIN-12/Notch signaling in C. elegans*. *Genes Dev*, 2002. **16**(20): p. 2713-28.
696. Smialowska, A. and R. Baumeister, *Presenilin function in Caenorhabditis elegans*. *Neurodegener Dis*, 2006. **3**(4-5): p. 227-32.
697. Chicas, A., et al., *H3K4 demethylation by Jarid1a and Jarid1b contributes to retinoblastoma-mediated gene silencing during cellular senescence*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(23): p. 8971-6.
698. Tee, A.E., et al., *The histone demethylase JMJD1A induces cell migration and invasion by up-regulating the expression of the long noncoding RNA MALAT1*. *Oncotarget*, 2014. **5**(7): p. 1793-804.
699. Cho, H.S., et al., *The JmjC domain-containing histone demethylase KDM3A is a positive regulator of the G1/S transition in cancer cells via transcriptional regulation of the HOXA1 gene*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(3): p. E179-89.
700. Kim, J.Y., et al., *KDM3B is the H3K9 demethylase involved in transcriptional activation of Imo2 in leukemia*. *Mol Cell Biol*, 2012. **32**(14): p. 2917-33.
701. Berry, W.L. and R. Janknecht, *KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells*. *Cancer Res*, 2013. **73**(10): p. 2936-42.
702. Gupta-Agarwal, S., et al., *G9a/GLP histone lysine dimethyltransferase complex activity in the hippocampus and the entorhinal cortex is required for gene activation and silencing during memory consolidation*. *J Neurosci*, 2012. **32**(16): p. 5440-53.
703. Huang, J., et al., *G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(13): p. 9636-41.
704. Cho, H.S., et al., *Enhanced expression of EHMT2 is involved in the proliferation of cancer cells through negative regulation of SIAH1*. *Neoplasia*, 2011. **13**(8): p. 676-84.
705. Wang, Z., et al., *Hypoxia-induced down-regulation of neprilysin by histone modification in mouse primary cortical and hippocampal neurons*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e19229.
706. Salz, T., et al., *Histone Methyltransferase hSETD1A Is a Novel Regulator of Metastasis in Breast Cancer*. *Mol Cancer Res*, 2015. **13**(3): p. 461-9.
707. Li, H., et al., *The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(28): p. 19489-500.



708. Ceol, C.J., et al., *The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset*. *Nature*, 2011. **471**(7339): p. 513-7.
709. Calnan, D.R., et al., *Methylation by Set9 modulates FoxO3 stability and transcriptional activity*. *Aging (Albany NY)*, 2012. **4**(7): p. 462-79.
710. Shen, X., et al., *EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency*. *Mol Cell*, 2008. **32**(4): p. 491-502.
711. Hidalgo, I., et al., *Ezh1 is required for hematopoietic stem cell maintenance and prevents senescence-like cell cycle arrest*. *Cell Stem Cell*, 2012. **11**(5): p. 649-62.
712. Liu, Y., et al., *Histone Lysine Methyltransferase Ezh1 Promotes TLR-Triggered Inflammatory Cytokine Production by Suppressing Tollip*. *J Immunol*, 2015. **194**(6): p. 2838-46.
713. Yaffe, K., et al., *The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline*. *JAMA*, 2004. **292**(18): p. 2237-42.
714. von Bernhardi, R., et al., *Pro-inflammatory conditions promote neuronal damage mediated by Amyloid Precursor Protein and decrease its phagocytosis and degradation by microglial cells in culture*. *Neurobiol Dis*, 2007. **26**(1): p. 153-64.
715. Noh, K.M., et al., *Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-dependent epigenetic remodeling is critical to ischemia-induced neuronal death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(16): p. E962-71.
716. Gao, Z., et al., *The master negative regulator REST/NRSF controls adult neurogenesis by restraining the neurogenic program in quiescent stem cells*. *J Neurosci*, 2011. **31**(26): p. 9772-86.
717. Abrajano, J.J., et al., *REST and CoREST modulate neuronal subtype specification, maturation and maintenance*. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e7936.
718. Abrajano, J.J., et al., *Differential deployment of REST and CoREST promotes glial subtype specification and oligodendrocyte lineage maturation*. *PLoS One*, 2009. **4**(11): p. e7665.
719. Iwata, N., et al., *Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin*. *Science*, 2001. **292**(5521): p. 1550-2.
720. Kaliman, P., et al., *Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process*. *Ageing Res Rev*, 2011. **10**(4): p. 475-86.
721. Takeda, T., *Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice*. *Neurochem Res*, 2009. **34**(4): p. 639-59.
722. Silhol, M., et al., *Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats*. *Neuroscience*, 2005. **132**(3): p. 613-24.
723. Zeng, Y., et al., *Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging*. *J Neurosci*, 2011. **31**(49): p. 17800-10.
724. Barrientos, R.M., et al., *Aging-related changes in neuroimmune-endocrine function: implications for hippocampal-dependent cognition*. *Horm Behav*, 2012. **62**(3): p. 219-27.

725. Burnouf, S., et al., *Hippocampal BDNF expression in a tau transgenic mouse model*. *Curr Alzheimer Res*, 2012. **9**(4): p. 406-10.
726. Nagahara, A.H. and M.H. Tuszynski, *Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders*. *Nat Rev Drug Discov*, 2011. **10**(3): p. 209-19.
727. Bonneh-Barkay, D. and C.A. Wiley, *Brain extracellular matrix in neurodegeneration*. *Brain Pathol*, 2009. **19**(4): p. 573-85.
728. Caltagarone, J., Z. Jing, and R. Bowser, *Focal adhesions regulate Abeta signaling and cell death in Alzheimer's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1772**(4): p. 438-45.
729. Akbarian, S., M.S. Beerli, and V. Haroutunian, *Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition*. *JAMA Neurol*, 2013. **70**(6): p. 711-8.
730. Van den Hove, D.L., et al., *Epigenetically regulated microRNAs in Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2014. **35**(4): p. 731-45.
731. Jung, H.J. and Y. Suh, *MicroRNA in Aging: From Discovery to Biology*. *Curr Genomics*, 2012. **13**(7): p. 548-57.
732. Mastroeni, D., et al., *Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2011. **32**(7): p. 1161-80.
733. Huidobro, C., A.F. Fernandez, and M.F. Fraga, *Aging epigenetics: causes and consequences*. *Mol Aspects Med*, 2013. **34**(4): p. 765-81.
734. Tammen, S.A., S. Friso, and S.W. Choi, *Epigenetics: the link between nature and nurture*. *Mol Aspects Med*, 2013. **34**(4): p. 753-64.
735. Di Bernardo, G., M. Cipollaro, and U. Galderisi, *Chromatin modification and senescence*. *Curr Pharm Des*, 2012. **18**(13): p. 1686-93.
736. Zhou, S. and J. Zhou, *Neurtin, a neurotrophic factor in nervous system physiology*. *Curr Med Chem*, 2014. **21**(10): p. 1212-9.
737. Lyman, M., et al., *Neuroinflammation: the role and consequences*. *Neurosci Res*, 2014. **79**: p. 1-12.
738. Jana, M., C.A. Palencia, and K. Pahan, *Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease*. *J Immunol*, 2008. **181**(10): p. 7254-62.
739. Andres, M.E., et al., *CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(17): p. 9873-8.
740. Gonzalez, H., et al., *Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases*. *J Neuroimmunol*, 2014. **274**(1-2): p. 1-13.
741. Cheng, X.R., et al., *Differential gene expression profiles in the hippocampus of senescence-accelerated mouse*. *Neurobiol Aging*, 2007. **28**(4): p. 497-506.
742. Kozarova, A., J.W. Hudson, and P.O. Vacratsis, *The dual-specificity phosphatase hYVH1 (DUSP12) is a novel modulator of cellular DNA content*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(10): p. 1669-78.

743. Casadesus, G., et al., *Neuronal cell cycle re-entry markers are altered in the senescence accelerated mouse P8 (SAMP8)*. J Alzheimers Dis, 2012. **30**(3): p. 573-83.
744. Kim, K.Y., et al., *Parkin is a lipid-responsive regulator of fat uptake in mice and mutant human cells*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3701-12.
745. Wang, W., et al., *Delayed neuronal death and damage of GDNF family receptors in CA1 following focal cerebral ischemia*. Brain Res, 2004. **1023**(1): p. 92-101.
746. Bourasset, F., et al., *Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. Neuropharmacology, 2009. **56**(4): p. 808-13.
747. Hashimoto, T., et al., *CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV*. EMBO J, 2002. **21**(7): p. 1524-34.
748. van Horsen, J., et al., *Collagen XVIII: a novel heparan sulfate proteoglycan associated with vascular amyloid depositions and senile plaques in Alzheimer's disease brains*. Brain Pathol, 2002. **12**(4): p. 456-62.
749. Colin, C., et al., *Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using Suppression Subtractive Hybridization*. Oncogene, 2006. **25**(19): p. 2818-26.
750. Ariga, T., T. Miyatake, and R.K. Yu, *Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related disorders: amyloidogenesis and therapeutic strategies--a review*. J Neurosci Res, 2010. **88**(11): p. 2303-15.
751. Urade, Y. and O. Hayaishi, *Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1482**(1-2): p. 259-71.
752. Chen, C.P., R.L. Chen, and J.E. Preston, *Age-related increase of prostaglandin D(2) synthase concentration and glycation in ovine cerebrospinal fluid*. Exp Gerontol, 2009. **44**(10): p. 639-45.
753. Jacobs, S., et al., *Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3902-7.
754. Hsiao, Y.H., et al., *Amelioration of social isolation-triggered onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficit by N-acetylcysteine in a transgenic mouse model*. Neurobiol Dis, 2012. **45**(3): p. 1111-20.
755. Paris, D., et al., *Impaired angiogenesis in a transgenic mouse model of cerebral amyloidosis*. Neurosci Lett, 2004. **366**(1): p. 80-5.
756. Paris, D., et al., *Inhibition of angiogenesis by Abeta peptides*. Angiogenesis, 2004. **7**(1): p. 75-85.
757. Desai, B.S., et al., *Evidence of angiogenic vessels in Alzheimer's disease*. J Neural Transm, 2009. **116**(5): p. 587-97.
758. Latimer, C.S., et al., *Reversal of glial and neurovascular markers of unhealthy brain aging by exercise in middle-aged female mice*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26812.
759. Zhang, F., et al., *Roles of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B (BDNF/TrkB) signalling in Alzheimer's disease*. J Clin Neurosci, 2012. **19**(7): p. 946-9.

760. Cassilhas, R.C., et al., *Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms*. Neuroscience, 2012. **202**: p. 309-17.
761. An, K., et al., *Neuritin can normalize neural deficits of Alzheimer's disease*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1523.
762. Abel, J.L. and E.F. Rissman, *Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain*. Int J Dev Neurosci, 2013. **31**(6): p. 382-90.
763. Lovatell, G.A., et al., *Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus*. Neurobiol Learn Mem, 2013. **101**: p. 94-102.
764. Cogswell, J.P., et al., *Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways*. J Alzheimers Dis, 2008. **14**(1): p. 27-41.
765. Maes, O.C., et al., *MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders*. Curr Genomics, 2009. **10**(3): p. 154-68.
766. Mallick, B. and Z. Ghosh, *A complex crosstalk between polymorphic microRNA target sites and AD prognosis*. RNA Biol, 2011. **8**(4): p. 665-73.
767. Li, Y., M. Daniel, and T.O. Tollefsbol, *Epigenetic regulation of caloric restriction in aging*. BMC Med, 2011. **9**: p. 98.
768. Park, S., R. Mori, and I. Shimokawa, *Do sirtuins promote mammalian longevity? A critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction*. Mol Cells, 2013. **35**(6): p. 474-80.
769. Rizza, W., N. Veronese, and L. Fontana, *What are the roles of calorie restriction and diet quality in promoting healthy longevity?* Ageing Res Rev, 2014. **13**: p. 38-45.
770. Weiss, E.P. and L. Fontana, *Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(4): p. H1205-19.
771. Goel, A. and B.B. Aggarwal, *Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs*. Nutr Cancer, 2010. **62**(7): p. 919-30.
772. Ravindran, J., S. Prasad, and B.B. Aggarwal, *Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?* AAPS J, 2009. **11**(3): p. 495-510.
773. Shanmugam, M.K., R. Kannaiyan, and G. Sethi, *Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer*. Nutr Cancer, 2011. **63**(2): p. 161-73.
774. Shukla, Y. and R. Singh, *Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1215**: p. 1-8.
775. Cheung, K.L. and A.N. Kong, *Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention*. AAPS J, 2010. **12**(1): p. 87-97.
776. Keum, Y.S., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of broccoli sprouts on the suppression of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: implication of induction of Nrf2, HO-1 and apoptosis and the suppression of Akt-dependent kinase pathway*. Pharm Res, 2009. **26**(10): p. 2324-31.

777. Uauy, R. and A.D. Dangour, *Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids*. Nutr Rev, 2006. **64**(5 Pt 2): p. S24-33; discussion S72-91.
778. Bouwens, M., et al., *Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells*. Am J Clin Nutr, 2009. **90**(2): p. 415-24.
779. Nithianantharajah, J. and A.J. Hannan, *Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(9): p. 697-709.
780. Weaver, I.C., et al., *Epigenetic programming by maternal behavior*. Nat Neurosci, 2004. **7**(8): p. 847-54.
781. Kundakovic, M. and F.A. Champagne, *Early-life experience, epigenetics, and the developing brain*. Neuropsychopharmacology, 2015. **40**(1): p. 141-53.
782. Crews, D., et al., *Nature, nurture and epigenetics*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **398**(1-2): p. 42-52.
783. Farb, N.A., A.K. Anderson, and Z.V. Segal, *The mindful brain and emotion regulation in mood disorders*. Can J Psychiatry, 2012. **57**(2): p. 70-7.
784. Ludwig, D.S. and J. Kabat-Zinn, *Mindfulness in medicine*. JAMA, 2008. **300**(11): p. 1350-2.
785. Rosenkranz, M.A., et al., *A comparison of mindfulness-based stress reduction and an active control in modulation of neurogenic inflammation*. Brain Behav Immun, 2013. **27**(1): p. 174-84.
786. Schmidt, S., et al., *Treating fibromyalgia with mindfulness-based stress reduction: results from a 3-armed randomized controlled trial*. Pain, 2011. **152**(2): p. 361-9.
787. Kaliman, P., et al., *Rapid changes in histone deacetylases and inflammatory gene expression in expert meditators*. Psychoneuroendocrinology, 2014. **40**: p. 96-107.