



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOQUÍMICA, BIOLOGIA
MOLECULAR I BIOMEDICINA

**CARACTERITZACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE KLOTHO EN CERVELL
DURANT L'ENVELLIMENT. ESTUDI DELS EFECTES DE LA SEVA
SOBREEXPRESSIÓ / INHIBICIÓ EN EL DESENVOLUPAMENT DE
DÈFICITS COGNITIUS ASSOCIATS A L'EDAT**

TESI DOCTORAL

ANNA MASSÓ CHACÓN



Universitat Autònoma de Barcelona

**CARACTERITZACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE KLOTHO EN CERVELL
DURANT L'ENVELLIMENT. ESTUDI DELS EFECTES DE LA SEVA
SOBREEXPRESSIÓ / INHIBICIÓ EN EL DESENVOLUPAMENT DE
DÈFICITS COGNITIUS ASSOCIATS A L'EDAT.**

Memòria presentada per

Anna Massó Chacón

Per optar al grau de

Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Miguel Chillón, en el Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El director

Doctoranda

Miguel Chillón Rodríguez

Anna Massó Chacón

Septembre 2015

ÍNDICE

ÍNDEX

ABREVIATURES

RESUM

I. INTRODUCCIÓ	1
1. ENVELLIMENT	1
1.1- Què és l'envelliment?	1
1.2- Característiques de l'envelliment	2
1.3- Causes de l'envelliment vies de senyalització molecular implicades	5
1.4- Models animals per a l'estudi de l'envelliment.	8
1.4.1- Mutacions que promouen la longevitat	8
1.5- Longevitat i envelliment en humans	12
1.5.1- Centenaris i la síndrome de la longevitat	12
1.5.2- Síndromes d'envelliment prematur en humans	13
1.6- Factors extrínsecs que promouen la longevitat	14
1.6.1- Exercici físic	14
1.6.2- Restricció calòrica	15
1.7- Envelliment del Sistema Nerviós Central (SNC)	17
1.8- Envelliment i neurodegeneració.	20
1.8.1-La malaltia d'Alzheimer	20
2. ENVELLIMENT I FUNCIONS COGNITIVES BÀSIQUES	23
1.7- Processos d'aprenentatge i memòria	23
2.2- Estructures cerebrals implicades en processos d'aprenentatge i memòria	25
2.2.1- Hipocamp	25
2.2.2- Escorça o còrtex cerebral	27
2.2.3- Escorça o còrtex prefrontal	27
2.2.4- Cerebel	28
2.3- Dèficits cognitius i alteracions conductuals durant l'envelliment	28
2.4- Vies de senyalització implicades en longevitat i envelliment cognitiu	30
2.5- Potenciació de la memòria i l'aprenentatge durant l'evelliment.	33
3. KLOTHO	37
3.1- Klotho i envelliment	37
3.2- Expressió del gen <i>Klotho</i>	38
3.3- Estructura del gen <i>Klotho</i> i productes proteics	40
3.4- Funcions de klotho en el metabolisme mineral	43
3.5- Funcions de les formes solubles de klotho	46
3.5.1- Inhibició de la senyalització mediada per insulina i IGF-1	47

3.5.2- Supressió de l'estrès oxidatiu.	47
3.5.3- Regulació de la producció D'NO i protecció contra la disfunció endotelial	48
3.5.4- Regulació de l'activitat dels canals iònics de calci	49
3.5.5- Supressió de la senyalització mediada per Wnt	50
3.6- Paper de klotho en SNC	51
3.6.1-Expressió de klotho en SNC	51
3.6.2- Klotho : un factor neuroprotector contra l'estrès oxidatiu	52
3.6.3- Klotho : un neuromodulador en les sinapsis	53
3.6.4- Klotho: un factor mielinitzant	54
3.6.5- Klotho : un potenciador cognitiu	55
3.7- Klotho com a diana terapèutica en processos neurodegeneratius	56
3.7.1- Administració de klotho exògen	57
3.7.2- Increment de l'expressió de klotho endògen	58
4. TERÀPIA GÈNICA I EINES DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA	59
4.1. Vectors virals per transferència gènica	59
4.1.1- Vectors adenoassociats	61
4.1.2- Vectors AAVs amb tropisme per SNC	63
4.2. Estudis de silenciament gènic mitjançant l'ús de vectors AAVs codificants per RNAs interferència	67
II. OBJECTIUS	70
III. RESULTATS	71
1. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE L'EXPRESSIÓ DE KLOTHO EN SNC DURANT L'ENVELLIMENT	71
1.1 Definició de la nomenclatura de les diverses formes proteiques de klotho	71
1.2. Estudi del perfil d'expressió temporal-espacial diferent de les dos isoformes de klotho	72
1.3. Generació d'un anticòs específic contra la proteïna klotho secretada (s-KL)	75
1.4. Detecció de la proteïna klotho secretada en diferents àrees cerebrals en ratolins adults joves i vells	77
1.5. L'expressió de klotho en cervell decau més ràpidament en el ratolí transgènic model d'Alzheimer (3xTg-AD) que en animals sans	79
1.6. L'exercici voluntari constant i moderat durant l'etapa adulta és capaç de contrarestar la caiguda en l'expressió del transcrits s-KL i m-KL	83

2. GENERACIÓ DELS VECTORS VIRALS PER MODIFICAR ELS NIVELLS DE KLOTHO EN SNC	87
2.1. Disseny i generació de vectors plasmídics codificants pels cDNAs de klotho	87
2.2. Disseny i generació de vectors plasmídics codificants pels shRNAs de klotho	92
2.2.1- Disseny i generació d'un vector AAV d'expressió d' shRNAs	93
2.2.2- Disseny i clonatge de les seqüències shRNA contra KL1 i s-KL en un vector AAV.	94
2.2.3- Estudi de l'eficiència dels shRNAs <i>in vitro</i>	96
2.3. Producció dels vectors virals AAVs codificants pels cDNAs/shRNAs de klotho	97
2.4- Caracterització <i>in vitro</i> dels AAVs portadors dels cDNAs/shRNAs de klotho	98
3. ESTUDIS <i>IN VIVO</i>: ANÀLISI DEL PAPER NEUROPROTECTOR DE KLOTHO MITJANÇANT TRANSFERÈNCIA GÈNICA EN SNC	100
3.1- Estudi en ratolins d'edat avançada (12 mesos)	100
3.1.1- Disseny experimental	101
3.1.2.- Dades de supervivència i pes corporal.	102
3.1.3- Funcions sensoriomotores.	104
3.1.4- Ansietat i neofòbia.	105
3.1.5- Funcions cognitives: aprenentatge i memòria	108
3.1.6- Quantificació de genomes virals en SNC d'animals injectats	114
3.1.7- Anàlisi de l'expressió vírica.	116
3.2- Estudi en ratolins adults joves (6 mesos)	117
3.2.1- Disseny experimental	117
3.2.2.- Dades de supervivència i pes corporal	119
3.2.3- Funcions sensoriomotores:	119
3.2.4- Ansietat i neofòbia.	121
3.2.5- Funcions cognitives: aprenentatge i memòria	124
3.2.6- Anàlisi bioquímic dels models animals generats als 12 mesos d'edat.	129
IV. DISCUSSIÓ	134
V. CONCLUSIONS	156
VI. MATERIALS I MÈTODES	158
1. MATERIALS	158

2. MÈTODES	160
2.1. Obtenció i anàlisi del DNA	160
2.2. Construcció dels vectors plasmídics	162
2.3. Obtenció i anàlisi del RNA	165
2.4. Obtenció i anàlisi de proteïnes	168
2.5. Tècniques generals de cultiu cel·lular	172
2.6. Producció de vectors adenoassociats	174
2.7. Tècniques utilitzades <i>in vivo</i>	176
2.8. Anàlisi estadístic dels resultats	181
VII. BIBLIOGRAFIA	182

ABREVIATURES

AAV: virus adenoassociat

A β : pèptid b-amiloide

Ach: Acetilcolina

AChR: receptor acetilcolina

AchE: acetilcolinaesterassa

AD: malaltia d'Alzheimer (de l'anglès *Alzheimer's Disease*)

ADAM: proteïnes desintegrines metaloproteases (de l'anglès *A Disintegrin And Metalloproteinase*)

AKT: proteïna quinasa B

AMPA: àcid a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropioníc

AMPK: quinasa d'adenosina monofosfat

ANOVA: anàlisi de variança

ApoE: apolipoproteïna E

APP: proteïna precursora del pèptid β -amiloide

APS: persulfat amònic

BBB: barrera hematoencefàlica (de l'anglès *Blood Brain Barrier*)

BACE: β -secretassa d'AAP1 (de l'anglès *β -site APP Cleaving Enzyme 1*)

BDNF: factor neurotròfic derivat de cervell (de l'anglès *Brain Derived Neurotrophic Factor*)

BPSD: símptomes neuropsiquiàtrics associats a la demència (de l'anglès *Behavioural and Psychiatric Symptoms of Dementia*)

°C: graus centrígrads

CB: cerebel

cdNA: àcids desoxiribonucleic còpia

ChAT: colina-acetil transferasa

CFS: líquid cefaloraquídi (de l'anglès *CerebroSpinal Fluid*)

CMV: citomegalovirus (i el seu promotor)

CPF: còrtex prefrontal

CR: restricció calòrica

CREB: proteïna d'unió a CRE

CX: còrtex cerebral

DCT: túbuls distals contornejats

DG: gir dentat

DHA: àcid docosahexonoic

DM: diabetis mellitus

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: àcid desoxiribonucleic (de l'anglès *DesoxiriboNucleic Acid*)

EDTA: àcid etilen-diamino-tetraacètic

ELA: Esclèrosi Lateral Amiotròfica

EM: Escleròsi Múltiple

FBS: sèrum fetal boví (de l'anglès *Fetal Bovine Serum*)

FGF: factor de creixement de fibroblasts (de l'anglès *Fibroblast Growth Factor*)

FOXO: factors de transcripció de caixa O (de l'anglès *Forkhead box protein O*)

FIRKO: ratolí knock-out per al receptor d'insulina en teixit adipós

g: unitat de gravetat

GABA: àcid g-aminobutíric

GH: hormona de creixement (de l'anglès *Growth Hormone*)

GSK3: quinasa de la sintasa de glucògen (de l'anglès *Glycogen Synthase Kinase-3*)

HC: hipocamp

HDL: lipoproteïnes d'alta densitat (de l'anglès *High Density Lipoproteins*)

HSV: Herpes virus

icv: intracerebroventricular

IGF: factor de creixement similar a la insulina (de l'anglès *Insulin-like Growth Factor*)

IIS: via de senyalització de la insulina i IGF-1 (de l'anglès *Insulin and Insulin-like Signalling*)

ip: intraperitoneal

IR: receptor de la insulina (de l'anglès *Insulin Receptor*)

Kb: kilobase

KO: *knock-out*

L: litre

LB: Luria Broth's

LDL: liproteïnes de baixa densitat (de l'anglès *Low Density Lipoproteins*)

LTD: depressió a llarg termini (de l'anglès *Long-Term Depression*)

LTM: memòria a llarg termini (de l'anglès *Long Term Memory*)

LTP: potenciació a llarg termini (de l'anglès *Long-Term Potentiation*)

M: molar

MAPK: Quinasa de proteïnes activades per mitogen (de l'anglès *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

mg: miligram

µg: micrograms

mM: milimolar

mL: mil·lilitre

µL: microlitre

MRI: imatge per ressonància magnètica (de l'anglès *Magnetic Resonance Imaging*)

mRNA: àcid ribonucleic missatger

mTOR: diana de rapamicina en cèl·lules de mamífer (de l'anglès *mammalian Target Of Rapamycin*)

MWM: laberint aquàtic de Morris (de l'anglès *Morris Water Maze*)

NE: norepinefrina

NO: òxid nítric

NFκB: factor nuclear potenciador de les cadenes kappa lleugeres de les cèl·lules B activades (de l'anglès *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NIRKO: ratolí knock-out del receptor d'insulina neuronal

NMDA: N-metil-D-aspartat

ORF: pauta de lectura oberta (de l'anglès *Open Reading Frame*)

Pb: parell de bases

PBS: solució salina amb fosfat (de l'anglès *Phosphate Buffered Saline*)

PCR: reacció en cadena de la Polimerasa (de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*)

PCT: túbuls contornejats proximals

PEG: polietilenglicol

PEI: polietilenimina

PET: tomografia per emissió de positrons (de l'anglès *Positron Emission Tomography*)

PI3K: quinasa d'inositol-3-fosfat (de l'anglès *Phosphatidylinositol 3-Kinase*)

POMC: propiomelanocortina

P/S: penicil·lina / estreptomina

PT: aprenentatge espacial (de l'anglès *Place Task*)

PTH: hormona paratiroide

ROS: espècies reactives de l'oxigen (de l'anglès *Reactive Oxygen Species*)

rpm: revolucions per minut

S6K: quinasa p70S6

SDS: dodecil-sulfat de sodi (de l'anglès *Sodium Dodecyl Sulfate*)

shRNA: àcid ribonucleic en forma de forquilla (de l'anglès *Short Hairpin RNA*)

siRNA: àcid ribonucleic petit d'interferència (de l'anglès *Small Interfering RNA*)

SIRT: sirtuina (de l'anglès *Silent mating Type Information Regulation 2 homolog 1*)

SNC: sistema nerviós central

SNP: sistema nerviós perifèric

SOD: superòxid dismutasa

SNP: polimorfisme d'un únic nucleòtid (de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphism*)

SS: seqüència senyal

STM: memòria a curt termini (de l'anglès *Short Term Memory*)

STZ: estreptozotocina (de l'anglès *streptozotocin*)

TEMED: tetrametiletilendiamina

TH: tirosina hidroxilasa

Tris: Tris (hidroximetil)aminometà

VEGF: factor de creixement endotelial vascular (de l'anglès *Vascular Endothelial Growth Factor*)

vg: genomes virals

VDR: Receptor de la vitamina D

WT: *wild-type*

RESUM

Tenint en compte que l'edat és el principal factor de risc per patir deteriorament cognitiu, elucidar si els factors que prolonguen la vida també poden prevenir, retardar o contrarestar la disfunció neuronal associada a l'envelliment o a processos neurodegeneratius esdevé un gran repte amb importants implicacions terapèutiques. Així doncs, en el context d'aquesta tesi centrada en la búsqueda de factors neuroprotectors per retardar la progressió del deteriorament cognitiu associat a l'edat, i en particular hem caracteritzat l'expressió de Klotho, un gen anti-envelliment, en cervell.

Per fer-ho, s'ha estudiat el perfil d'expressió de klotho en cervell tant en condicions d'envelliment normal com en condicions patològiques. En aquest sentit, s'han analitzat els nivells d'expressió de les dos isoformes de klotho (m-KL i s-KL) en diferents àrees cerebrals: còrtex prefrontal, còrtex cerebral, hipocamp i cerebel. D'aquesta manera, s'ha pogut comprovar que durant l'envelliment cerebral fisiològic els nivells d'expressió de les dos isoformes de klotho es veuen reduïts significativament. També s'ha observat que aquesta disminució es veu accelerada en condicions d'envelliment patològic, gràcies als estudis fets en el ratolí *3xTg-AD*. A més, els resultats obtinguts suggereixen que donat que els nivells de klotho en aquest model es troben disminuïts significativament als 6 mesos d'edat, en etapes primerenques de la progressió de la malaltia, podria tenir un ús potencial com a biomarcador de diagnòstic precoç d'Alzheimer. Per contra, s'ha vist que l'exposició a uns hàbits de vida saludable, com la pràctica d'exercici físic moderat continuat durant l'etapa adulta, alenteix la baixada en els nivells d'expressió de klotho en cervell.

De manera important, per primer cop, s'ha detectat la proteïna secretada de klotho produïda per splicing alternatiu (s-KL) utilitzant un nou anticòs dissenyat i generat en aquest treball (K113). S'ha pogut observar que malgrat l'mRNA de s-KL s'expressa de manera similar en cervell que en ronyó, a nivell de proteïna s-KL és 9-10 vegades més abundant en cervell que en ronyó, suggerint que el seu paper principal és a SNC. És més, els resultats del nostre estudi mostren que s-KL presenta un perfil d'expressió espacio-temporal diferent del de m-KL, suggerint que ambdues isoformes poden tenir funcions diferents en cervell.

Per últim, s'han estudiat els efectes de la sobreexpressió/inhibició de klotho en SNC (utilitzant estratègies de teràpia gènica amb vectors adenoassociats de tropisme neuronal) sobre les capacitats cognitives de ratolins adults i ancians. S'ha vist que la modificació dels nivells de les dues isoformes de klotho (m-KL i s-KL) també té efectes sobre els símptomes neuropsiquiàtrics associats a la demència (BPSD). A més, la sobreexpressió de klotho (sobretot m-KL) també presenta un cert efecte ansiolític, i la seva inhibició, l'efecte contrari. Finalment, destacar que també s'ha pogut comprovar que, independentment de l'edat, la sobreexpressió de m-KL i s-KL permet millorar les capacitats cognitives dels animals en relació a la memòria de treball (*T-maze*) i als processos d'aprenentatge i memòria espacial (*Morris Water Maze*). Aquests resultats suggereixen que Klotho podria ser una diana amb potencial terapèutic pel tractament dels dèficits cognitius associats a l'envelliment.

I. INTRODUCCIÓ

1. ENVELLIMENT

1.1. Què és l'envelliment?

L'envelliment no disposa d'una definició que sigui universalment acceptada, però es podria descriure com la suma de tots els canvis que tenen lloc en un organisme amb el pas del temps i que condueixen a pèrdues funcionals i en darrer terme, a la mort. En línies generals, es considera que l'envelliment es manifesta a partir del moment de màxima vitalitat: al voltant dels trenta anys en l'home. En qualsevol cas, la majoria d'autors coincideixen a assenyalar que quan acaba el procés de desenvolupament somàtic (corporal, físic) comença el procés d'envelliment. A més, l'estudi de l'envelliment es complica pel fet conegut com a envelliment diferencial: no tots els individus envelleixen al mateix ritme ni tots els òrgans i sistemes del mateix individu ho fan al mateix temps. Hi ha, doncs, un envelliment diferencial entre individus de la mateixa espècie i entre òrgans del mateix individu, la qual cosa implica una elevada heterogeneïtat en les respostes fisiològiques desencadenades.

Des del punt de vista cel·lular, un aspecte important és que, per alguns autors, només envelleixen les cèl·lules post mitòtiques, és a dir, les que han perdut la capacitat per dividir-se. Hayflick (*University of California, San Francisco, EEUU*) en estudis ja clàssics dels anys seixanta, utilitzant cèl·lules en cultiu, va establir que el nombre de divisions que pot experimentar una cèl·lula està determinat genèticament i va definir el "*límit de Hayflick*" com el nombre màxim de divisions que poden donar-se en una cèl·lula abans que aquesta degeneri i mori. No obstant, aquest concepte presenta el problema que es pot considerar relacionat amb la diferenciació i no amb l'envelliment cel·lular. Així, les cèl·lules deixen de dividir-se perquè s'han diferenciat i no perquè han envellit. Anàlogament al "*límit de Hayflick*" sembla que la longevitat màxima d'una espècie està també genèticament determinada. En el cas de la nostra espècie cal situar-la al voltant dels 120 anys.

Un concepte relacionat i, potser més restrictiu que el d'envelliment, és el de senescència. Es pot definir la senescència com el conjunt de canvis involutius que ocorren en les fases finals de la vida. Aquests canvis condueixen a alteracions morfològiques i funcionals que al capdavall porten a la mort. Així, mentre que l'envelliment comença en edats primerenques, potser juvenils, de la vida, la senescència es reserva per a les edats finals de la vida, en les quals els canvis involutius que condueixen a la mort es fan més patents.

1.2. Característiques de l'envelliment

Amb l'envelliment apareixen una sèrie de canvis (morfològics, funcionals i bioquímics) que porten a errors funcionals i a la mort. Aquests canvis han estat sistematitzats de la següent manera:

- a) Hi ha un augment de la taxa de mortalitat després de la maduració. L'observació de la corba de supervivència porta a concloure, que la taxa de mortalitat es manté relativament constant, per accelerar-se després, bruscament, en les fases tardanes de la vida.
- b) Es produeixen canvis en la composició de l'organisme. En els mamífers es produeix una disminució de la "massa magra" i un augment de la proporció de greix en l'organisme. Altres canvis característics de les cèl·lules envellides són l'augment en el contingut de lipofuscina ("*pigment de l'envelliment*") i l'augment d'entrecreuaments entre les matrius d'algunes molècules, com el col·lagen. També s'observa una important disminució dels enzims que formen les defenses antioxidants, per exemple el glutatió reductasa I la glucosa 6 fosfat deshidrogenasa. Això, juntament amb el fet que la generació de radicals lliures augmenta amb l'edat, fa que la cèl·lula vella es trobi especialment desprotegida contra l'acció danyina d'aquestes molècules derivades dels radicals lliures d'oxigen I que per tant, es produeixen lesions en proteïnes, àcids nucleics i altres macromolècules.
- c) Una característica fonamental de l'organisme envellit és la pèrdua de la capacitat per recuperar-se de les agressions. Els canvis moleculars condueixen a alteracions en cèl·lules i teixits que fan difícil mantenir la homeòstasis. Hi ha una gran quantitat de canvis funcionals progressius que tendeixen a provocar un deteriorament general de l'organisme. Més que canvis en els valors de l'estat estacionari, el que es perd és la capacitat de mantenir els valors normals, és a dir, es perd capacitat homeostàtica. Per tant, disminueix la capacitat de l'organisme per adaptar-se a l'estrès.
- d) Els organismes envellits tenen major predisposició a malalties de diversos tipus. Possiblement això és degut en part, a un marcat deteriorament del sistema immune. Mentre que la resposta a antígens exògens disminueix, la resposta als endògens augmenta, la qual cosa condueix a una major incidència de les malalties autoimmunes.

Fenotips d'envelliment conservats evolutivament.				
Fenotip	<i>H.Sapiens</i>	<i>M.Musculus</i>	<i>D.Melanogaster</i>	<i>C.elegans</i>
Funció cardíaca disminuïda	Sí	Sí	Sí	NA
Apoptòsi, senescència	Sí	Sí	Sí	?
Càncer, hiperplasia	Sí	Sí	No	No
Inestabilitat genòmica	Sí	Sí	Sí	Sí
Agregats macromoleculars	Sí	Sí	Sí	Sí
Diminució de les capacitats cognitives (memoria i aprenentatge)	Sí	Sí	?	?
Nivells disminuïts d'hormona del creixement (GH), dehidroandrosterona (DHEA), testosterona, IGF.	Sí	Sí	?	?
Nivells incrementats de gonadotropines i insulina.	Sí	Sí	NA	NA
Funció tiroïdes reduïda	Sí	Sí	NA	NA
Immunitat innata reduïda	Sí	Sí	Si	Sí
Augment dels processos inflamatoris.	Sí	Sí	No	No
Canvis morfològics en la pell/ cutícula	Sí	Sí	?	Sí
Menor funció mitocondrial	Sí	Sí	Sí	Sí
Sarcopenia	Sí	Sí	Sí	Sí
Osteoporosis	Sí	Sí	NA	NA
Patrons alterats del son/descans	Sí	Sí	Sí	?
Menor capacitat visual	Sí	Sí	?	NA
Desmielinització	Sí	Sí	?	Sí
Arteriosclerosis	Sí	No	NA	NA
Canvis en el greix	Sí	Sí	?	?

Taula 1.1- Fenotips d'envelliment conservats entre diferents espècies. (Adaptat de Boyette et al. 2014) [5]

A més, recentment, *López-Otín et al. (2013)* ha proposat una llista de nou característiques comunes a nivell cel·lular i molecular de l'envelliment dels mamífers [6]:

1. Inestabilitat genòmica: L'acumulació de dany al material genòmic amb el pas del temps provoca mutacions en el DNA nuclear i mitocondrial i alteracions en l'estructura nuclear de cèl·lules senescentes. Sovint, aquestes lesions no poden ser reparades pels mecanismes de reparació de la cèl·lula, que disminueixen la seva eficiència amb l'edat.
2. Escurçament dels telòmers: Les cèl·lules somàtiques de l'organisme que no expressen la telomerasa, és a dir, la majoria de cèl·lules en mamífers, pateixen una pèrdua progressiva de la llargada de la regió telomèrica a cada replicació del DNA.

3. Alteracions epigenètiques: D'entre les quals destaquen alteracions en els patrons de metilació del DNA, en les modificacions post-translacional d'histones i en la remodelació de la cromatina.
4. Pèrdua de proteostasi: Algunes malalties neurodegeneratives (com l'Alzheimer o el Parkinson) es caracteritzen per l'expressió de proteïnes mal plegades. En els sistemes cel·lular encarregats del manteniment de la homeòstasi proteica (sistema de xaperones, sistema ubiquitina-proteosoma i sistema autofàgic-lisosomal) s'han observat canvis associats a l'envelliment, que impliquen una menor eficàcia.
5. Desregulació de la detecció de nutrients: Degut a alteracions en l'eix somatotròpic que inclou l'hormona de creixement (GH, *growth hormone*) i les seves dianes els factors de transcripció FOXO i els complexos mTOR, a través de la via de senyalització de la insulina i IGF-1 (IIS: *Insulin and Insulin-like growth factor Signalling*).
6. Disfunció mitocondrial: Causada per una pèrdua d'eficàcia de la cadena respiratòria mitocondrial que genera una pèrdua excessiva d'electrons i redueix la producció d'ATP. Això augmenta la producció de ROS i accelera el procés d'envelliment en mamífers.
7. Senescència cel·lular: Implica l'aturada del cicle cel·lular juntament amb diversos canvis fenotípics estereotipats.
8. Esgotament de cèl·lules mare: Té lloc una disminució de la capacitat de regeneració dels teixits, tal i com s'observa en el procés d'hematopoiesi [7] i en la majoria d'estructures que contenen cèl·lules mare adultes com el còrtex prefrontal o les fibres musculars en ratolí [8].
9. Comunicació intracel·lular alterada: A nivell endocrí, neuroendocrí i neuronal, augmenten els processos inflamatoris, es redueix la capacitat d'immunovigilància davant d'agents patògens o cèl·lules malignes i els canvis en la composició cel·lular provoquen alteracions en les vies de senyalització neurohormonals.

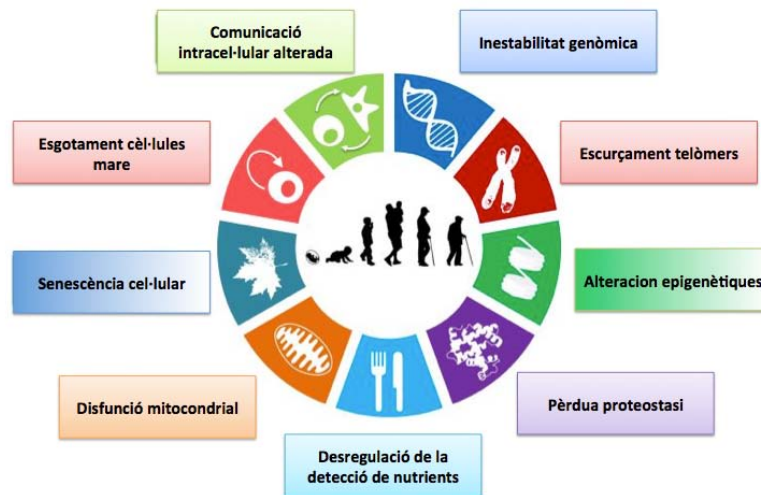


Figura 1.1- Característiques de l'envelliment. En aquest esquema s'enumeren les nou característiques comunes a nivell cel·lular i molecular de l'envelliment dels mamífers. (Adaptat de López-Otín et al., 2013) [6]

1.3. Causes de l'envelliment vies de senyalització molecular implicades

La teoria postulada per *Bell* (1988) sobre l'envelliment dels organismes sexuals es considera un dels principis fonamentals en biogerontologia. En termes generals, contempla que la distinció entre la línia germinal i la línia somàtica és el que determina la presència del procés de senescència. D'acord amb les teories genètiques del desenvolupament, l'envelliment és part d'un control continu del desenvolupament i la maduració, programat genèticament [9]. Les cèl·lules que contínuament estan proliferant com ara les hidres (*Hydra viridis*), no mostren signes d'envelliment. De fet, és creu que les hidres són úniques en el regne animal, en el sentit que no envelleixen i son biològicament immortals. Per contra, quan un organisme cessa el seu creixement, comença el procés d'envelliment. No obstant, aquelles manipulacions que redueixen la taxa de creixement també retarden el procés d'envelliment i promouen la longevitat. Per exemple, la restricció calòrica (reducció de la ingesta de nutrients) disminueix el creixement i augmenta l'esperança de vida en diverses espècies des de llevats a ratolins. La rapamicina, que inhibeix el creixement dels llevats, també desaccelera l'envelliment. Paral·lelament, la inactivació de la via de senyalització de la insulina/ IGF-1 condueix a un increment en la longevitat [10],[11],[12].

Tenint en compte que les condicions que retarden el creixement permeten alhora alentir l'envelliment, es plausible pensar que tots dos processos biològics presenten mecanismes similars. Sembla ser, que el motor que impulsa el creixement i l'envelliment, és la via de senyalització

evolutivament conservada TOR (target of rapamycin). En mamífers, TOR (mTOR) controla el creixement cel·lular i el metabolisme en resposta als nutrients (aminoàcids), factors de creixement (insulina, IGF-1) i l'estat energètic de la cèl·lula (ATP). mTOR activa el creixement cel·lular regulant positivament diversos processos anabòlics com ara la transcripció, síntesi proteica, biogènesis de ribosomes, transport de nutrients i metabolisme mitocondrial, i negativament els catabòlics com la degradació de mRNAs, la proteòlisis dependent d'ubiquitinització i l'autofàgia. TOR es una proteïna quinasa específica de serina/treonina atípica, que s'organitza en dos complexos multiproteics diferents funcional i estructuralment, TORC1 i TORC2 (mTOR1 i mTOR2 en mamífers), cadascun dels quals senyalitza a través de diferents vies efectores. Els dos substrats fosforilables més ben caracteritzats de mTOR són S6K i 4E-BP1, a través dels quals mTORC1 regula la traducció i Akt/PKB que permet a mTORC2 controlar el cicle cel·lular [13-15]).

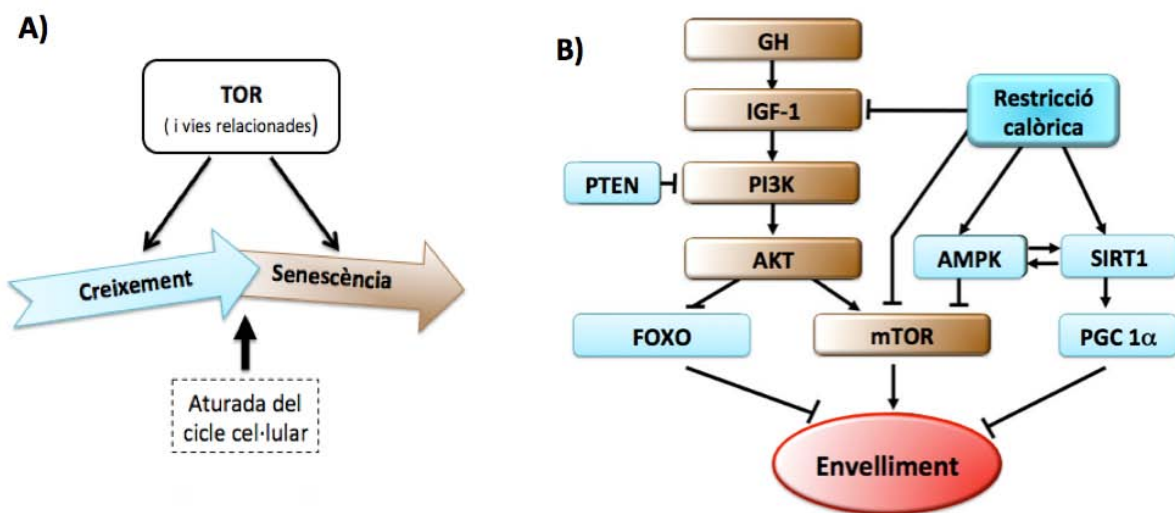


Figura 1.2- Paper de mTOR en senescència cel·lular i envelliment (A) Geroconversió del creixement cel·lular a la senescència cel·lular, quan el cicle cel·lular s'atura. Aquest fenomen de geroconversió és resultat d'un creixement continu dirigit per mTOR i vies de senyalització molecular relacionades. (Adaptat de *Blagosklonny et al.*, 2009).[13] **(B)** Desregulació de la detecció de nutrients. Esquema general de l'eix somatotròpic GH, via de senyalització IIS, i la seva relació amb la restricció calòrica i l'envelliment. Les molècules que afavoreixen l'envelliment es mostren en marró, mentre que les que tenen propietats anti-envelliment es mostren en blau. (Adaptat de *Lopez-Otin et al.*, 2013) [6].

De fet, gran part dels darrers resultats innovadors que mostren que la restricció calòrica [16] o la inhibició de la senyalització de la via d'insulina i IGF-1 [11] en models murins permeten augmentar l'esperança de vida són consistent amb l'observació que una menor activació de TOR proporciona efectes similars.

Alternativament, la contribució genètica podria actuar com a modulador de la diferent capacitat dels individus a respondre davant els canvis patits al llarg de la vida. Aquesta seria una concepció menys determinista del paper dels gens, més en sintonia amb les teories estocàstiques que proposen com a causa de l'envelliment el dany que aleatòriament poden patir les molècules vitals. En aquest sentit, alguns autors donen suport al fet que molts dels canvis soferts durant l'envelliment són degut a les alteracions provocades pels radicals lliures, molt especialment per les espècies reactives de l'oxigen generades pel metabolisme aerobi. De les moltes reaccions que els radicals lliures produeixen en l'organisme, s'esmenten les més significatives i les que estan lligades a patologies conegudes.

- *Peroxidació lipídica*: Els dobles enllaços dels àcids grassos insaturats o fosfolípids poliinsaturats són molt susceptibles a l'acció dels radicals lliures, en un procés auto catalític amb el resultat de fragmentació dels àcids grassos i la formació d'hidroperòxids i aldehids citotòxics. Aquest fet, pot produir la lesió de les membranes cel·lulars i d'altres components intracel·lulars. Els lipoperòxids tenen un paper molt important en el procés d'aterosclerosi.
- *Oxidació de proteïnes*: Aquest ha estat un mecanisme poc estudiat, possiblement perquè les proteïnes tenen un gran *turnover* i els seus metabòlits no s'acumulen. Actualment s'obre una via d'investigació en l'oxidació d'enzims pel fet que alguns aminoàcids carboxilats poden convertir, per l'acció dels radicals lliures, els seus grups carboxil en grups carbonil i en aquesta situació són molt més susceptibles a la degradació proteolítica, els enzims s'inactiven i es modifica l'eficàcia de les reaccions que catalitzen.
- *Peroxidació de l'òxid nítric (NO)*: L'òxid nítric es un radical lliure gasós i un mediador important en molts processos fisiològics i patològics. Creua fàcilment les membranes i actua com a missatger intercel·lular tot modulant el flux sanguini, i té un paper important a nivell endotelial com a agent antitrombòtic. Així mateix, s'ha vist que té una acció antimicrobiana i que pot actuar com a destructor de cèl·lules cancerígenes. Es produeix per l'acció del òxid nítric sintetasa, enzim que té tres isoformes.



Tot i que el NO és un radical lliure, té molt poca toxicitat atès que és molt volàtil i no s'acumula. No obstant, esdevé altament tòxic per la reacció amb un radical superòxid i la formació del peroxinitrit (ONOO⁻), un oxidant molt potent que s'ha relacionat amb malalties renals, cròniques i inflamatòries, amb processos neurodegeneratius i amb artritis reumatoide.



- *Lesió oxidativa del DNA*: Els radicals lliures poden produir una lesió important en el DNA, tant mitocondrial com cel·lular. La lesió oxidativa del DNA pot induir mutagènesis espontànies que poden tenir un paper important en l'envelliment i en la carcinogènesi.

1.4.. Models animals per a l'estudi de l'envelliment.

La primera aproximació experimental que la durada de la vida és un caràcter hereditari es va realitzar en mosques del gènere *Drosophila* [17],[18],[19]. Es va observar que diferents soques i línies derivades d'individus adults capturats de les poblacions naturals tenien diferents però reproduïbles expectatives de vida. Posteriorment, els experiments de selecció van assenyalar l'existència de gens amb capacitat d'augmentar de manera significativa aquestes expectatives. No obstant, és molt difícil identificar quants i quins gens estan involucrats en aquest procés. La majoria dels estudis s'han centrat més en l'allargament de la vida que en la seva reducció, ja que aquest últim cas sol anar acompanyat d'alteracions patològiques que dificulten l'estudi del procés. S'ha vist que aquests gens poden participar en funcions molt diferents: metabolisme respiratori, replicació i reparació del DNA, control del cicle cel·lular, etc.

1.4.1- Mutacions que promouen la longevitat.

L'aïllament del gen *daf-2* en el nematode *C.elegans* va demostrar que les mutacions en un sol gen poden estendre la vida d'un organisme sense que aquest perdi eficàcia biològica de forma significativa. Els mutants *daf-2* poden viure el doble de temps que els individus normals. El gen afectat forma part de la família de receptors de la insulina i és activat per l'equivalent de la insulina en el cuc i després transmet el missatge des de la membrana cel·lular a la maquinaria metabòlica de la cèl·lula. Els cucs viuen més quan el receptor està inactiu perquè és quan les cèl·lules utilitzen menys glucosa i produeixen menys radicals lliures. En principi, alimentant menys aquests animals es disminuiria l'acció del receptor i s'allargaria el seu temps de vida. L'increment de longevitat associat amb la disminució de la senyal *daf-2* és anàleg a l'increment de longevitat en mamífers associat amb la restricció calòrica [20] [21].

Des de la identificació del gen *daf-2* es va iniciar la recerca del que s'han anomenat "*gens de longevitat*". Els candidats són aquells que participen en la ruta d'acció de la insulina i vies acoblades, en definitiva, gens reguladors de la utilització de l'energia. A més, molts d'ells, com els que participen en la traducció del senyal insulínic, apareixen conservats evolutivament. La plasticitat en la durada de la vida, evident en la filogènia animal, es podria deure a la variació en el temps d'alliberament d'hormones que controlen la vitalitat i la mortalitat, així com a la variació a la resposta a aquestes hormones [22].

En *Drosophila* s'han descrit diversos exemples de gens que prolonguen la vida. Un d'ells és el gen *Indy* (*I'm not dead yet*), que codifica per a un possible transportador en el cicle de Krebs. Una reducció de l'expressió d'*Indy* augmenta al doble l'expectativa de vida mitjana i més del 40% la vida màxima possible [23, 24]. Les mosques no perden la seva capacitat de reproducció ni tampoc la seva activitat física. S'ha proposat que les mutacions *Indy* poden induir un estat similar a la restricció calòrica [25].

Tenint en compte la hipòtesi de l'estrès oxidatiu com a causa de l'envelliment, s'esperaria que l'augment de la dosi d'aquells gens que codifiquen per a enzims antioxidants poguessin allargar la vida. De fet, els mutants de *Drosophila* amb pèrdua de funció gènica en qualsevol dels tres enzims antioxidants: catalasa, superòxid dismutasa depenent de Cu/Zn (SOD) i tioredoxina reductasa (TxR), exhibeixen una vida més curta en la fase adulta [26] [27]. No obstant, la introducció d'una còpia addicional del gen SOD no ha donat lloc a mosques més longeves com es podria esperar [28]. Tampoc les mosques transgèniques que sobreexpressen el gen de la catalasa tenen vides més llargues [29]. En canvi, en una sèrie de treballs molt interessants, s'ha descrit un increment de la vida de les mosques d'entre un 40-50% quan qualsevol dels gens humans SOD1 o SOD2, se sobreexpressa en motoneurons d'adult en *Drosophila* [30-32]. En general però, els resultats obtinguts dels experiments d'augment de dosi d'aquest tipus de gens han estat força contradictoris [33-36].

També s'ha pogut comprovar que la longevitat de diferents models murins pot ser augmentada degut a mutacions que interfereixen amb la biosíntesi o l'acció de l'hormona de creixement (GH), IGF-1 o insulina en teixit adipós [37]. Per exemple, els ratolins amb mutacions en els gens *Prop-1* (*Ames Dwarf mouse*) i *Pit-1* (*Snell Dwarf mouse*) que codifiquen per factors de transcripció encarregats del desenvolupament pituitari, presenten un menor taxa de creixement corporal i una mida reduïda i alhora tenen una major esperança de vida d'entre el 40-60% comparat amb ratolins normals [38]. Les mutacions en aquests gens condueixen a un dèficit hormonal de GH, IGF-1, prolactina i TSH. A més, aquests animals presenten uns valors inferiors en els nivells de glucosa i

insulina basals i una major sensibilitat a la insulina exògena [39]. Malgrat els ratolins *knock-out* per a IGF-1 no són viables [40] i que els *knock-out* per a insulina moren prematurament als 8 dies de vida [41], una disminució moderada de la senyalització mediada per insulina i IGF-1 s'ha demostrat capaç d'estendre la longevitat en ratolins. D'aquesta manera, la pèrdua d'una única copia del gen *Igf1r* té com a resultat l'augment aproximat d'un 26% en la longevitat (les femelles viuen un 33% més que els controls, els mascles només un 16%) [42]. Aquest fet té lloc amb un mínim efecte sobre el creixement corporal. De manera esperada, els nivells d'IGF-1 en sèrum es troben augmentats en ambdós sexes en aquest model. Cal tenir en compte, que en ratolins, la disrupció genètica del receptor d'insulina o de proteïnes implicades en la seva cascada de senyalització, normalment condueix al desenvolupament de resistència a la insulina i a la diabetis [43]. Tanmateix però, els ratolins *knock-out* pel receptor d'insulina específicament en teixit adipós (ratolins *FIRKO*) neixen amb la freqüència esperada, sobreviuen bé després del deslletament, són fèrtils i no desenvolupen diabetis [44]. És més, presenten uns nivells disminuïts de triglicèrids en sèrum però nivells normals d'àcids grassos lliures, colesterol, lactat i IGF-1. Curiosament, malgrat una menor presència de greix corporal, el ratolí *FIRKO* té uns nivells de leptina en plasma 25% superiors als controls a l'edat de 10 mesos [45]. L'esperança de vida en ambdós sexes també es veu augmentada. Així doncs, mentre que l'esperança de vida mitja del genotip del grup control correspon als 30 mesos, un 80% dels ratolins *FIRKO* romanen vius a aquesta mateixa edat [46].

En els darrers anys, nombrosos estudis han permès establir una relació entre el gen SIRT1, que forma part de la família de les sirtuïnes, i la longevitat. Les sirtuïnes són un tipus de desacetilases dependents de NAD⁺, que s'encarreguen de desacetilar histones i d'altres proteïnes [47]. La connexió entre les sirtuïnes i la longevitat es basa en el descobriment que els efectes de la restricció calòrica sobre l'esperança de vida, són mediats com a mínim en part, pels gens ortòlegs *Sir2/SIRT1* en llevats, mosques i 10ematodes. Tot i que la funció exacta d'aquest gen es desconeix, els seus efectes activadors sobre la respiració mitocondrial sembla ser que tindrien un paper clau en l'allargament de l'esperança de vida [48]. D'acord amb el vincle entre la funció SIRT1 i el metabolisme, polimorfismes en aquest gen s'han associat amb la despesa energètica i els nivells d'expressió de SIRT1 es troben fortament correlacionats amb la sensibilitat a la insulina en humans [49]. Un estudi recent ha demostrat que el ratolí transgènic que sobreexpressa *Sirt1* presenta una millor condició de salut i està protegit contra les malalties típiques de l'envelliment com la diabetis o el càncer però no mostra una major esperança de vida [50]. La inesperada absència d'un efecte fenotípic sobre la longevitat en aquest model transgènic subratlla les dificultats de traslladar les conclusions obtingudes en llevats,

nematodes i mosques a mamífers. Per tant, s'està a l'espera de nous resultats addicionals relatius a la possible relació entre SIRT1 i la longevitat en ratolins i humans.

A finals dels anys 90, el laboratori de *M.Kuro-o* (Universitat de Texas, Dallas, EEUU) va descriure que la sobreexpressió de la proteïna *klotho* en ratolins era capaç d'augmentar de manera significativa l'esperança de vida en ambdós sexes, i es va suggerir que aquesta proteïna podria actuar com una hormona anti-envelliment. La demostració que la sobreexpressió de *klotho* permet augmentar la longevitat fou particularment important perquè prèviament s'havia vist, que els ratolins homozigots per a l'al·lel hipomòrfic d'aquest gen, tenien una vida extremadament curta amb múltiples canvis histopatològics propis d'un envelliment accelerat [51]. La cerca dels mecanismes responsables de l'increment de longevitat en el transgènic de *klotho*, ha permès arribar a conclusions molt interessants, algunes de les quals suggereixen un important enllaç entre el metabolisme mineral i l'envelliment [52, 53]. En aquest model, els mascles són hiperinsulinèmics i normoglicèmics, la qual cosa implica una lleugera resistència a la insulina, a més, en ambdós sexes, s'ha pogut comprovar una menor capacitat de la insulina o IGF-1 administrats exògenament per suprimir els nivells de glucosa circulants [54]. Aquest fet, ha permès establir una associació inesperada entre la resistència a la insulina/IGF-1 i una major longevitat ja que en d'altres models murins, com en ratolins sotmesos a restricció calòrica (CR), s'observa una major sensibilitat a la insulina. La supressió de la senyalització insulínica degut als nivells reduïts d'insulina i IGF-1 en ratolins CR, *GHR-KO*, *Ames* i *Snell*, i la resistència a insulina/IGF-1 en el model de *klotho* podrien constituir el nou "denominador comú" entre aquestes condicions fisiològiques divergents i explicar el seu impacte similar sobre la longevitat [55]. Altres mecanismes probables que estarien contribuint a l'augment de l'esperança de vida dels ratolins *klotho* inclouen el control de l'estrès oxidatiu mitjançant la inducció de l'enzim manganès superòxid dismutassa (SOD) a través de l'activació dels factors de transcripció FoxO [56] així com també la inhibició de l'apoptosi i la senescència cel·lular en l'endoteli vascular [57]. De particular interès va ser la demostració que *klotho* regula la senyalització mediada pel factor de creixement de fibroblasts 23 (FGF-23) i que la deleció de qualsevol d'ambdós gens, *fgf-23* o *klotho*, produeix un increment en els nivells de fòsfor, calci i el metabòlit actiu de la vitamina D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] [58]. Això suggereix que malgrat els problemes associats a uns nivells insuficients de vitamina D en la gent gran, la hipervitaminosi D pot conduir al desenvolupament de múltiples característiques d'un envelliment prematur [59]. D'altra banda, l'activació del receptor de potencial transitori TRPV5 per part de *klotho* implica que, mitjançant la modulació de la reabsorció de calci renal, es podrien veure afectats els nivells sèrics de calci [60].

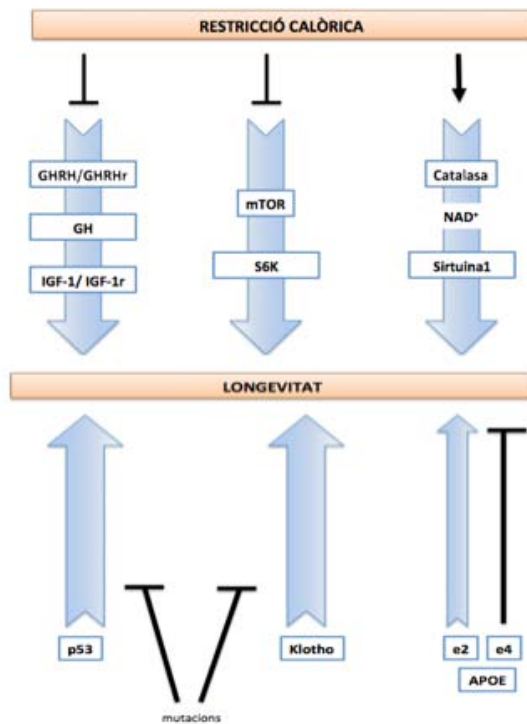


Figura 1.3- Vies de senyalització implicades en longevitat. Les vies GHRH/GH; IGF-1;-IGF-1r i mTOR-S6K, son inhibides per la restricció calòrica (CR) i indueixen la longevitat en mamífers. La via catalasa-Sirt1, que s'activa per la CR, indueix també longevitat a través del mitocondri. Les mutacions en els gens p53 i klotho es relacionen amb l'envelliment. Un dels al·lels ApoE, e2 es correlaciona positivament amb longevitat en humans, i e4 correlaciona negativament. (Adaptat de Bao et al. 2014) [1].

1.5. Longevitat i envelliment en humans

1.5.1- Centenaris i la síndrome de la longevitat

En algunes famílies, s'ha observat una gran longevitat. Així, els parents de les persones centenàries tenen una probabilitat major de fer els cent anys que la resta de la població. S'especula que per arribar a aquestes edats, les persones han de manca d'aquelles variants gèniques associades amb un major risc de morir prematurament i, a més, ser portadors d'aquells altres variants gèniques amb caràcter protector [61]. S'ha fet una llista de possibles gens candidats on buscar aquestes variants, com ara, a més dels descrits en els models animals, aquells altres involucrats en el control de la resposta immunitària en el metabolisme carcinogènic i en el metabolisme del colesterol o en el seu transport per sang [62, 63]. En principi, és plausible que les variants al·lèliques dels gens involucrats en el metabolisme del colesterol, per exemple, puguin tenir cert efecte en la durada de la vida als humans. S'ha vist que els descendents dels centenaris tenen majors nivells de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL, *high density lipoproteins*) i nivells més baixos de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL, *low density lipoproteins*). De fet, s'ha qualificat de "síndrome de longevitat" la major expectativa de vida d'aquelles famílies amb nivells extremadament baixos de partícules lipoproteiques de baixa

densitat. Fins avui, el resultat més significatiu és l'obtingut per al gen *ApoE*, que codifica l'apolipoproteïna E, un constituent important de les lipoproteïnes de baixa densitat. En concret, l'al·lel E4 d'aquest gen és considerat com un factor de risc per a la malaltia d'Alzheimer i la malaltia coronària. Els centenaris en canvi, tendeixen a mostrar una major prevalença de l'al·lel E2, que es considera un factor de protecció [64-67].

Recentment, s'ha identificat una regió en el cromosoma 4 humà, portadora d'un gen possiblement implicat en la longevitat. Dels 50 gens presents en aquesta regió, s'ha prestat atenció al gen *MTP* (que codifica per una proteïna microsomal) donada la seva implicació en l'ensamblatge de les lipoproteïnes [68]. S'ha observat l'associació entre diversos polimorfismes d'aquest gen amb la resistència a la insulina i amb la distribució del greix, i s'ha observat la menor prevalença d'alguns d'aquests polimorfismes en persones longeves [69]. Altres gens candidats s'han localitzat tots en una mateixa regió cromosòmica: en 11p15.5. Es tracta dels gens *TH* (tirosina hidroxilasa), *INS* (proinsulina), *IGF-2* (factor 2 de creixement similar a la insulina), *HRAS1* (protoncogen) i *SIRT3* (sirtuina 3). Tots formen part de rutes funcionals conservades en l'evolució. Alguns d'aquests gens s'han considerat dianes per a l'acció de nous medicaments que puguin prolongar la vida en condicions saludables [70-72].

1.5.2- Síndromes d'envelliment prematur en humans

Alguns canvis en un sol gen són responsables de l'acceleració de l'envelliment en l'ésser humà, com és el cas de la progèria i la síndrome de Werner. La progèria és una patologia molt rara de la qual s'ha estimat una incidència de 1/8.000.000. Apareix en les edats més primerenques i els nens tenen l'aspecte d'una persona anciana i pateixen les degeneracions físiques i les malalties típiques d'aquesta edat. A l'abril del 2003 es va descobrir que aquest síndrome es devia a una mutació en el gen *LaminaA*, implicat en nombroses funcions incloent la replicació del DNA, la transcripció i l'organització de la cromatina i del nucli durant la divisió cel·lular. La mutació més freqüent és una substitució C->T que activa un lloc críptic de processament i elimina 150 nucleòtids en el RNA missatger madur [73, 74].

En la síndrome de Werner, els pacients desenvolupen prematurament arteriosclerosi, intolerància a la glucosa, osteoporosi, pèrdua de pèl, atrofia de la pell i menopausa en el cas de les dones. L'envelliment progressiu fa que el seu aspecte sigui d'uns 30 anys més que l'edat real i la majoria mort, generalment, abans dels cinquanta anys. El gen responsable de la malaltia fou identificat l'any

1991 en el cromosoma 8p. Finalment es va concretar que aquest gen devia participar en el recompte de les divisions cel·lulars, ja que els cultius de fibroblasts dels pacients només es divideixen unes vint vegades en lloc de cinquanta o seixanta com ocorre en les cèl·lules normals. Aquest gen, anomenat *WRN*, codifica una helicassa de la família RecQ, amb capacitat de desenrotllar el DNA i implicada en processos de replicació i reparació del DNA. Per aquestes característiques, aquesta síndrome es classifica dins dels síndromes amb inestabilitat cromosòmica [70-72].



Figura 1.4- Manifestacions fenotípiques de la síndrome de Werner. Com a adolescent (esquerra), aquesta pacient presentava una aparença normal, però a l'edat de 48 anys (dreta) els efectes de la malaltia de Werner eren ja molt evidents [2].

1.6. Factors extrínsecs que promouen la longevitat

1.6.1- Exercici físic

Envellir comporta de manera inevitable una pèrdua progressiva de la capacitat de funcionament de la majoria d'òrgans i estructures corporals. Disminueix la capacitat pulmonar, cardíaca i renal i es perd densitat òssia i massa muscular. A aquestes pèrdues, s'hi afegeix l'impacte de les malalties agudes i cròniques. Aquests canvis tenen efectes en la condició física i es tradueixen en una reducció de la força muscular, de la velocitat de la marxa, de la resistència, de l'equilibri i de la flexibilitat. Finalment, els canvis en l'activitat i el rendiment físic influeixen, juntament amb altres factors, en la capacitat de dur a terme les activitats de la vida diària de manera autònoma. De fet, la capacitat funcional és un dels principals indicadors de salut en les persones grans. Participar en una activitat física regular provoca una sèrie de respostes favorables que contribueixen a un envelliment saludable [75]. De fet, l'efecte de l'exercici físic se suma a l'efecte de la resta d'hàbits que determinen l'estil de vida saludable. Així, les persones que segueixen una alimentació saludable, que es mantenen mentalment actives, que tenen una ingesta moderada d'alcohol i que no fumen, si a més fan exercici

físic, tindran encara més probabilitats de viure més anys i de viure'ls millor. A continuació es nombren algunes de les millores aconseguides amb la pràctica de l'exercici físic [76].

3) Adaptacions a nivell fisiològic

- *Cardiovasculars*: Redueix el risc de malalties cardíaques. Prevé la arteriosclerosi i disminueix el risc d'infarts. Amb l'entrenament, el cor augmenta la seva grandària bombejant més sang en cada sístole (augment del volum sistòlic) la qual cosa permet economitza el treball del miocardi. A més, disminueix la sensació de fatiga.
- *Respiratòries*: Millora la funció pulmonar, es requereix un menor volum respiratori minut per absorbir la mateixa quantitat d'oxigen i augmenta la capacitat vital (màxima quantitat d'aire expulsada dels pulmons).
- *Metabòliques*: Col·labora en la disminució de la taxa de colesterol LDL i de triglicèrids. L'augment del consum de greixos durant l'activitat, contribueix a la pèrdua de pes. També millora la resposta immunològica davant infeccions o agressions. De diferent tipus.
- *Sistema locomotor* (òssos, músculs, lligament, etc.): Enforteix els teixits i el to muscular. Augmenta l'elasticitat i incrementa la força i la resistència dels músculs.

b) Adaptacions a nivell psicològic: Ajuda a alliberar tensions, combatre i millorar els símptomes de l'ansietat i la depressió proporcionant un estat de benestar. A causa del desgast i el cansament que produeix l'exercici, l'organisme necessita descans. Per tant, ajuda a regular la fase de son i a combatre l'insomni.

1.6.2- Restricció calòrica

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, com més aportació calòrica per ingesta, major *turnover* metabòlic i major formació de radicals lliures, que, al seu torn, condiciona que aquests actuïn d'una manera lesiva per a les cèl·lules i, per tant, que s'acceleri l'envelliment. En treballs experimentals en animals, s'ha vist que les dietes hipocalòriques allarguen la vida [77-80]. Rates amb una ingesta del 60% a la consumida pel grup control *ad libitum*, presentaven una esperança de vida d'entre un 30-50% superior [81, 82]. Així mateix, hi ha treballs que demostren que persones que, per hàbits alimentaris, han mantingut una dieta hipocalòrica tenen menys risc de tenir diabetis, aterosclerosi,

malalties renals i càncer [83, 84]. D'acord amb aquesta teoria, hi ha treballs experimentals en animals que demostren que la restricció calòrica incrementa l'activitat de la catalasa, un important enzim antioxidant [85]. També s'ha observat que en condicions hipocalòriques el dany del DNA en nuclis i mitocòndries de rates és quinze vegades inferior al grup control amb alimentació *ad libitum* [86]. Hi ha altres treballs que demostren una millora dels sistemes immunes lligats als limfòcits T en micos sotmesos a dietes hipocalòriques [87]. Aquesta és una petita revisió de treballs experimentals, però son moltes les publicacions que evidencien que les dietes hipocalòriques allarguen la vida i retarden els signes de l'envelliment.

No obstant, en els darrers anys han sorgit algunes veus crítiques amb la “universalització” d'aquest nou paradigma en gerontologia, el concepte que una reducció de la ingesta calòrica retarda el procés d'envelliment i augmenta l'esperança de vida en organismes de diversos grups filogenètics [88, 89]. Així doncs, diverses evidències emergents qüestionen alguns dels principis fonamentals d'aquest dogma. Per exemple, una disparitat és que l'augment de longevitat associat a la restricció calòrica no és universal, i fins i tot pot no ser compartida entre diferents soques d'una mateixa espècie [90]. Un altre recel és que el grup control, alimentat *ad libitum*, generalment està format per animals amb sobrepès que són propensos a l'aparició primerenca de malalties i a una mort prematura. Per tant, no són un grup control ideal per als estudis de longevitat. De fet, un examen exhaustiu de les dades de pes corporal i longevitat amb dades corresponents a més de 60.000 ratolins i rates, suggereix que l'augment de l'esperança de vida en genotips específics mediada per la restricció calòrica es troba directament relacionada amb l'augment del pes corporal, també sota un regim *ad libitum*. En aquest grups la restricció calòrica també fa disminuir la temperatura corporal, la taxa metabòlica i la producció d'agents oxidants [91] [92].

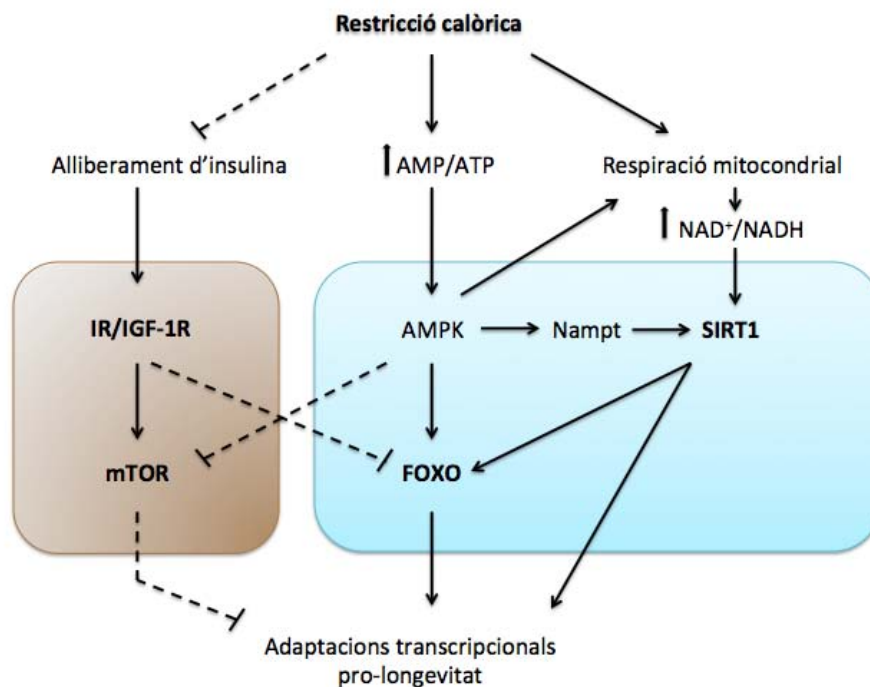


Figura 1.5- Visió integrativa de les vies de senyalització, en mamífers, implicades en la regulació dels efectes de la restricció calòrica. Per exemple, la restricció calòrica pot ser detectada, no només per SIRT1 com un canvi en la ratio $NAD^+/NADH$, sinó també per AMPK com un canvi en la ratio AMP/ATP. AMPK pot regular la respiració mitocondrial, que alhora pot regular positivament SIRT1. Ambdues proteïnes poden afectar l'activitat dels factors de transcripció FOXO, els quals també han estat relacionats amb la regulació del metabolisme i la longevitat. És més, la restricció calòrica promou una menor senyalització de la via de la insulina, tenint efectes també sobre FOXO. Així doncs, les respostes metabòliques a la restricció calòrica, serien conseqüència de l'equilibri entre aquestes xarxes de senyalització cel·lular. (SIRT1: Silent Information Regulator T1; AMPK: AMP-activated protein kinase; FOXO: Forkhead Box O1) . (Adaptat de Cantó. *Et al.* 2009) [48].

1.7- Envel·liment del Sistema Nerviós Central (SNC)

La societat en la que vivim va envellint progressivament i s'estima que en els propers 50 anys, la proporció de gent gran en la població augmentarà fins a duplicar la seva dimensió actual, podent arribar a igualar el nombre de persones joves. Aquest increment, lligat a una millora en l'esperança de vida, comporta un important impacte tant en l'àmbit social com de la salut ja que com a conseqüència d'aquesta major longevitat, el deteriorament cognitiu i les demències estan esdevenint un dels problemes de salut més importants de les últimes dècades, amb més d'un 50% de persones majors de 85 anys afectades per la malaltia d'Alzheimer als EEUU [93].

El procés d'envel·liment al SNC es manifesta per un seguit de canvis involutius comuns a totes les espècies de mamífers, com ara l'atrofia de les neurones piramidals, la disminució del número de

sinapsis, la disminució del número de receptors dopaminèrgics a l'estriat, l'acumulació de pigments i productes d'oxidació, i l'increment de l'activitat dels astròcits i la microglia. També és comú observar dipòsits de proteïna així com anormalitats en el citoesquelet de les neurones, que en el cas de l'esser humà es manifesten en forma de cabdell [94].

Els canvis en la morfologia neuronal associats a l'envelliment són selectius i sembla ser que no existeix un patró universal per tot el cervell. No obstant, al contrari del que es creia inicialment [95-99], s'ha pogut comprovar que en la majoria d'àrees cerebrals, la pèrdua neuronal sembla no tenir un paper significatiu en el deteriorament cognitiu relacionat amb l'edat [100, 101]. Per contra, una característica general dels efectes de l'envelliment sobre la morfologia neuronal són canvis regionals específics en la densitat i el nombre de ramificacions dendrítiques [3]. Aquest fet esdevé especialment important en les neurones del còrtex prefrontal (CPF), que són molt més vulnerables a l'efecte de l'envelliment que les neurones hipocàmpals [102].

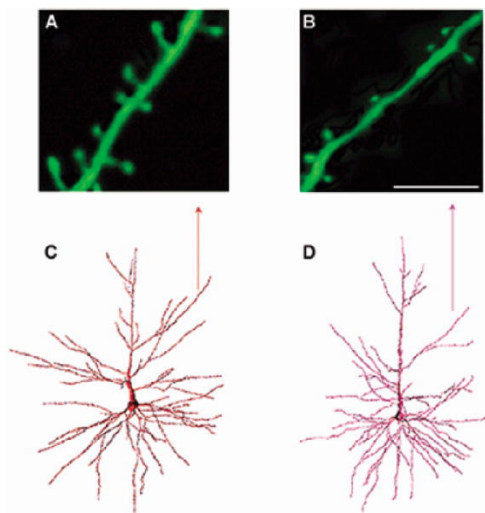


Figura 1.6- Pèrdua de la densitat d'espines sinàptiques associada a l'edat. Imatges representatives de la densitat d'espines en les neurones piramidals del neocòrtex de micos joves (10-12 anys) (A) i vells (24-25 anys) (B). A destacar l'increment en la densitat sinàptica en animals joves respecte els vells. En els panells C i D es mostren exemples de neurones traçades amb *Lucifer Yellow*, i reconstruïdes en 3D. la neurona en (C) pertany a un animal jove i en (D) a un animal vell. (Barnes *et al.* 2006)[3].

Paral·lelament, durant l'envelliment, es poden observar canvis en la neurotransmissió química [103]. Per exemple, té lloc una disminució de l'alliberació d'acetilcolina a l'estriat, l'escorça i l'hipocamp [104, 105] i de dopamina a l'estriat [106]. També té lloc una disminució de la transmissió noradrenèrgica [107], serotoninèrgica [108] i aminoacidèrgica [109] en certes regions cerebrals.

Un altre procés afectat durant l'envelliment és la plasticitat cerebral. El terme plasticitat s'utilitza per denotar una correcta adaptabilitat de l'estructura i la funció del sistema nerviós a les condicions externes. La plasticitat cerebral inclou fenòmens com la dinàmica estructural de neurones i la plasticitat sinàptica [110]. En el SNC, el sistema glutamatèrgic és el responsable de l'estimulació de la plasticitat sinàptica. El sistema glutamatèrgic controla el fluxe de calci a les neurones a través de

canals controlats per glutamat, els receptors NMDA (N-metil-D-aspartat). Tant un excès com un dèficit de glutamat dona lloc a alteracions en els processos cognitius [111]. En condicions fisiològiques, l'activació d'aquests receptors representa el mecanisme bàsic d'aprenentatge i dels processos de memòria en neurones, gràcies als potencials d'acció sinàptica a llarg termini o LTPs (*long-term synaptic potentiation*) [112]. Així doncs, es coneix que els LTP en hipocamp decauen molt més ràpid en animals vells [113]. En el cervell envellit, l'excès de glutamat pot ser conseqüència del dany oxidatiu a les proteïnes que regulen el seus nivells, la glutamina sintasa i el transportador GLT1. Una disminució del metabolisme mitocondrial i el conseqüent dèficit energètic en un SNC envellit pot promoure també nivells elevats de glutamat. L'increment dels nivells de glutamat implica un augment en l'estimulació dels receptors NMDA la qual cosa pot desencadenar problemes de memòria i fins i tot pot induir l'apoptosi neuronal [110].

Per últim, cal esmentar que la plasticitat sinàptica en el SNC no es limita únicament a la comunicació entre neurones, sinó que implica també la funció dels astrocits i les cèl·lules glials [114]. Els astròcits són capaços de modificar la plasticitat sinàptica regulant l'alliberament de neurotransmissors. L'estrès oxidatiu que acompanya el procés d'envelliment produeix una disminució en la funció sinàptica degut a l'acumulació d'astròcits amb dany oxidatiu i de la proteïna glial fibril·lar àcida (GFAP) [115].

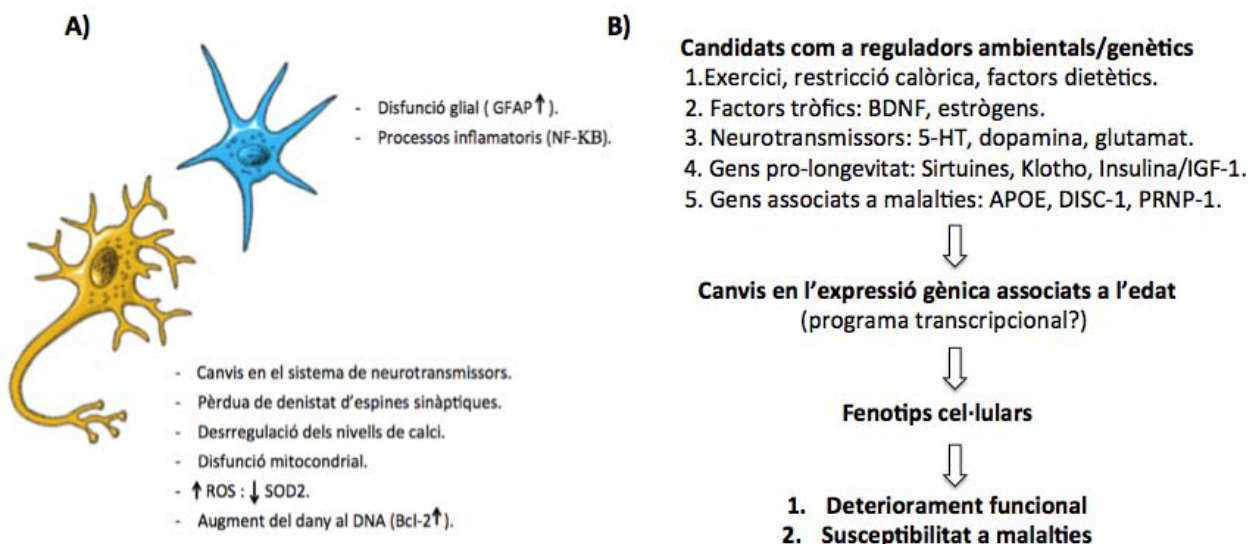


Figura 1.7- Canvis moleculars associats a l'envelliment normal en neurones i glia i els possibles moduladors, mediadors i conseqüències funcionals. (A) Representació del fenotip cel·lular associat a l'envelliment en neurones (groc) i en glia (blau). Entre parèntesi es mostren alguns exemples representatius de canvis en l'expressió gènica associats a l'edat. **(B)** Esquema dels possibles moduladors, mediadors i de les conseqüències de l'envelliment cerebral. (Adaptat de *Glorioso et al. 2011* [116])

1.8- Envel·liment i neurodegeneració.

Les malalties neurodegeneratives són patologies cròniques i progressives del sistema nerviós central ocasionades per la pèrdua continuada de neurones del cervell i de la medul·la espinal. La pèrdua de neurones ve motivada per factors mediambientals, mutacions genètiques o per la degeneració neuronal conseqüència de l'envelliment, entre altres factors desencadenants. Malalties com ara l'Alzheimer, l'esclerosi múltiple, la corea de Huntington, el Parkinson, la distrofia muscular o l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA), són alguns exemples del que pot provocar l'alteració dels complexos circuits neuronals. Totes elles són patologies molt invalidants pels greus canvis físics i de conducta que pateixen els malalts .

En paral·lel, l'augment de l'esperança de vida de la població representa un increment de persones d'edat avançada i per tant, una major incidència de malalties neurodegeneratives associades a l'envelliment i una menor capacitat d'auto-recuperació. La més comuna és la malaltia d'Alzheimer, amb més de 26 milions d'afectats actualment al món, un nombre que podria quadruplicar-se l'any 2050.

1.8.1-La malaltia d'Alzheimer

L'Alzheimer (AD de l'anglès *Alzheimer disease*) és la demència més comuna. És una malaltia incurable, degenerativa i terminal. Va ser descrita per primer cop pel psiquiatre i neuròleg alemany Alois Alzheimer l'any 1906, per la qual cosa se li va donar el seu nom [117]. Les principals troballes patològiques associades a l'AD són les plaques senils i els cabdells neurofibrilars presents a l'escorça, que contenen pèptid β -amiloide i proteïna tau hiperfosforilada, respectivament [118]. L'acumulació d'aquestes proteïnes malplegades provoca pèrdua neuronal i dany en les sinapsis, tot i així la patogènesi d'aquestes proteïnes malplegades encara no es comprén del tot [119, 120]. Com a factor de risc clau per l'AD, els canvis cel·lulars que acompanyen el procés d'envelliment podrien estar associats a aquests fenòmens de mal plegament i agregació protèica [121, 122]. A més, l'envelliment també va acompanyat amb un increment en l'estrès oxidatiu i la disfunció mitocondrial. El cervell és un òrgan particularment sensible a la disfunció mitocondrial degut a la seva elevada demanda bioenergètica. Per tant, aquesta disminució de la funció mitocondrial pot contribuir a l'envelliment mitocondrial i fer que les neurones esdevinguin més vulnerables als canvis patològics associats a l'edat [93, 123]. Entre les possibles etiologies de la malaltia també trobem l'alteració dels sistemes de neurotransmisors. De totes les hipòtesis que intenten descriure la patogènesi de l'AD, la més

estudiada és la “hipòtesi colinèrgica”. La correlació trobada entre el dèficit colinèrgic (nivells baixos d’acetilcolina) i la pèrdua de les capacitats cognitives dels malalts és el que ha motivat la intensa investigació en aquest punt, essent una de les aproximacions terapèutiques més explotada en els darrers anys. No obstant, es creu que el dèficit colinèrgic va seguit d’un dèficit d’altres neurotransmisors, a part de la destrucció neuronal i del dipòsit de β -amiloide.

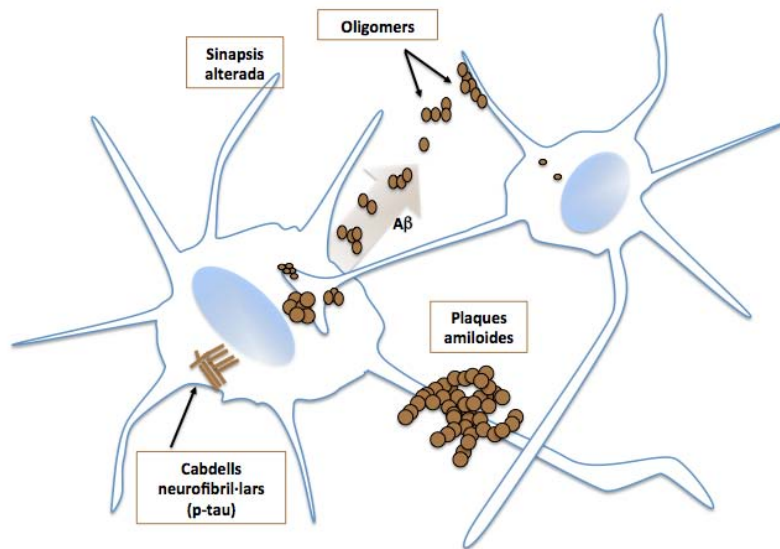


Figura 1.8- Esdeveniments patològics neuronals en la malaltia d'Alzheimer.

L'oligomerització del peptid β -amiloide i la formació de plaques, altera les sinapsis neuronals dificultant la comunicació. D'altra banda, la hiperfosforil·lació de la proteïna tau permet la formació de cabdells neurofibril·lars que també impedeixen el correcte funcionament de les neurones.

Malgrat que la causa d'aquesta malaltia és diferent en funció del cas, hi ha força símptomes comuns[124]. Els primers a manifestar-se solen ser confosos per efectes de l'edat o causes de l'èstres [125] i corresponen a pèrdues de memòria així com per la dificultat per recordar coses apreses recentment. Davant sospites, el diagnòstic generalment es confirma amb una avaluació conductual del pacient, amb tests cognitius i si es pot, amb un escaner cerebral [126, 127]. A mesura que la malaltia avança, apareixen altres símptomes com la confusió, la irritabilitat i l'agressivitat, canvis d'humor, pèrdua de memòria a llarg termini i de sensibilitat [125, 128].

Tot i que, els problemes de memòria són el segell tan de l'AD com de l'envelliment cerebral, la patologia i neurofisiologia d'ambdós processos es diferent. Les imatges per resonància magnètica funcional (fMRI) i els estudis histopatològics en AD mostren una reducció de l'activitat metabòlica i l'inici de la pèrdua neuronal en l'escorça entorrinal i la regió CA1 de l'hipocamp [129, 130]. En l'envelliment cerebral normal, aquesta reducció s'inicia en el subículum i el gir dentat, enlloc de l'hipocamp [131, 132]. En condicions normals, els estudis d'fMRI mostren que durant l'envelliment, les diferents regions cerebrals perden la capacitat de coordinació per facilitar les funcions cognitives d'ordre superior [133, 134]. Aquest fet però, no és degut a la pèrdua de neurones de l'escorça, que

és mínim en l'envelliment però important en AD [100]. Les alteracions en la connectivitat entre àrees cerebrals podria estar relacionada amb la desorganització de les fibres mielinitzades que connecten les neurones de diferents regions de l'escorça [133] o a canvis en la fisiologia sinàptica de les neurones envellides [135].

De moment, no hi ha cap tractament preventiu o curatiu per l'AD. Existeixen diversos medicaments que poden alleujar certs símptomes, com l'agitació, l'ansietat, depressió, al·lucinacions, confusió i insomni. Desgraciadament, aquests medicaments solen ser eficaços en un nombre limitat de pacients, només durant un cert temps i poden causar efectes secundaris indesitjables. De moment, la investigació científica està condicionada encara per tres limitacions importants: el desconeixement de la etiologia, les dificultats de diagnosi i la falta de criteris ben definits d'eficàcia terapèutica [136]. Actualment els tractaments principals, segueixen tres línies bàsiques:

- 1)** Potenciar les facultats cognitives que li resten al pacient: El primer resultat clínic útil d'aquesta línia es van obtenir amb la tacrina, un inhibidor de l'acetilcolinesterasa, però presenta un inconvenient important i és la seva hepatotoxicitat, motiu pel qual va ser retirada d'Espanya l'any 1998 [137]. Actualment, els inhibidors de l'acetilcolinesterasa comercialitzats en aquest país són el donezepil i la rivastigmina. L'eficàcia clínica obtinguda amb aquests fàrmacs és molt moderada, essent especialment útil en fases inicials de la malaltia [138].
- 2)** Retardar la progressió de la malaltia: S'ha avançat poc per aquest camí. Diversos estudis han comprovat l'eficàcia preventiva dels antiinflamatoris en pacients amb formes lleus d'AD [139]. Altres investigacions giran en torn a l'estudi dels possibles efectes positius dels fàrmacs pel tractament del colesterol, la insulina i fàrmacs pel tractament de la diabetis, els estrogens i compostos antioxidants com la vitamina E.
- 3)** Controlar la disfunció emocional: Pel tractament de les alteracions conductuals en pacients d'AD s'ha realitzat proves amb diversos fàrmacs antipsicòtics com la olanzapina [140]. Tot i que han mostrat alguns beneficis en els símptomes neuropsiquiàtrics dels pacients, presenten nombrosos efectes secundaris no desitjables.

2. ENVELLIMENT I FUNCIONS COGNITIVES BÀSIQUES

2.1- Processos d'aprenentatge i memòria

La memòria és el procés cognitiu mitjançant el qual es codifica, emmagatzema i recupera una informació determinada o un succés concret. És el procés psicològic que ens permet aprendre. Al llarg dels anys, l'estudi de la memòria i l'aprenentatge ha estat abordat des de diferents aproximacions teòriques i a partir de diversos mètodes de recerca, la qual cosa ha permès un gran augment del coneixement del seu funcionament tant normal com patològic. El processament i emmagatzematge posterior de l'informació no es produeix en un únic moment, sinó que es requereixen una sèrie de passos previs a l'emmagatzematge permanent [141]. A més, per a conèixer quin material ha estat memoritzat, és necessària una tercera fase del procés: la recuperació. Així, les fases fonamentals en el procés de memòria són:

- 1) *Codificació*: Implica el processament conscient o inconscient de la informació, amb la finalitat de que sigui emmagatzemada posteriorment. Consisteix en la transformació dels estímuls sensorials en diferents codis d'emmagatzematge.
- 2) *Emmagatzematge o consolidació*: En aquesta fase, es crea i es manté un registre temporal o permanent de la informació.
- 3) *Recuperació*: Fa referència a l'accès i evocació de la informació emmagatzemada a partir de la qual es crea una representació conscient o s'executa un comportament après.

Tot i que els conceptes de memòria i aprenentatge fan referència a dos processos ben diferenciats i amb característiques molt dispars, estan íntimament relacionats i es basen l'un en l'altre. Al llarg dels anys, s'han anat proposant diferents criteris per a la taxonomia o classificació dels diferents tipus de memòria i aprenentatge. Si prenem com a base criteris qualitius, podem diferenciar entre:

- **Processos d'aprenentatge i memòria explícits** (conscients o declaratius): Fa referència al coneixement general i personal que té cada individu. La seva característica principal és que la informació és accessible a la consciència i és susceptible de ser verbalitzada. Es pot dividir en dos categories: *memòria semàntica* (inclou informació general deslligada del context) o *memòria episòdica* (està subjecta a parametres espaciotemporals). El lòbul temporal medial és l'estructura cerebral on subjau l'aprenentatge explícit i aquest sistema també produeix l'aprenentatge espacial, és

a dir, l'aprenentatge de les relacions entre els diferents estímuls que es troben en un context determinat. Això ha fet que s'hagi proposat un nou marc explicatiu dins de l'estudi de la memòria: la "*memòria relacional dependent d'hipocamp*". Sota aquesta nomenclatura es poden incloure tant les memòries basades en l'establiment de relacions entre fets relacionats temporalment (memòria episòdica), entre conceptes (memòria semàntica) i entre elements d'un context espacial (memòria espacial).

- **Processos d'aprenentatge i memòria implícits** (inconscients o no declaratius): Són difícilment expressable amb el llenguatge i tenen un alt grau de rigidesa, la qual cosa dificulta la seva modificació. La memòria implícita constitueix una categoria molt heterogènia dins de la qual s'inclouen diferents formes d'aprenentatge que són independents de la integritat del lòbul temporal medial i que podem agrupar en *aprenentatge no associatiu* (habitució i sensibilització), *priming* (identificació d'estímuls iguals o similars als presentats anteriorment), *aprenentatge associatiu* (condicionament clàssic i condicionament instrumental) i *aprenentatge procedimental* (adquisició de destreses, repertoris conductuals o procediments amb un alt component motor) [142-144].

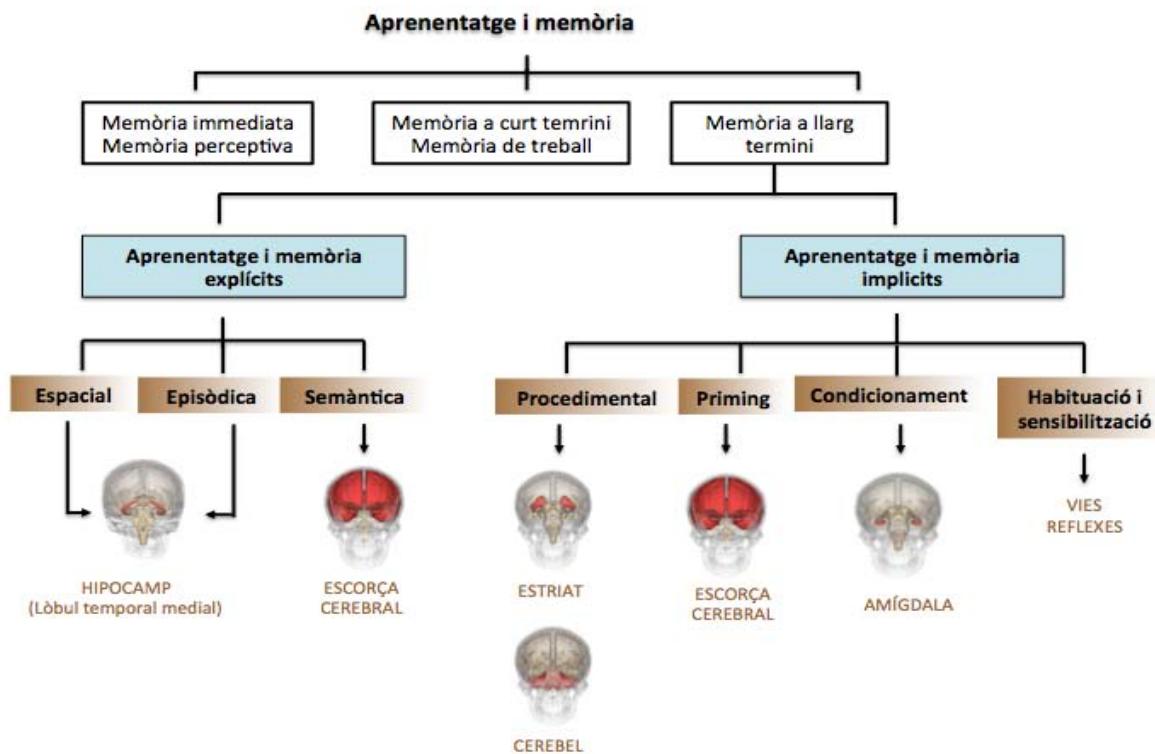


Figura 1.9- Classificació dels processos d'aprenentatge i memòria tenint en compte criteris temporals i qualitius. (Adaptat de Rendeiro et al. 2009) [145].

Un altra classificació àmpliament utilitzada dels diferents tipus de memòria deriva dels estudis de *Ebbinghaus* a finals de segle i de *Müller i Pilzecker* (1900), i distingeix entre memòria a curt termini

(*short-term memory* o STM) i memòria a llarg termini (*long-term memory* o LTM). En aquests treballs es proposa que un cop la informació és emmagatzemada en STM, han de tenir lloc una sèrie de processos temporals per consolidar la informació a llarg termini. També es va comprovar que durant STM i la consolidació d'LTM la informació és molt sensible a diverses intervencions, però quan la memòria està consolidada, és relativament estable i insensible a les perturbacions [142]. Aquestes investigacions també van demostrar que la formació d'LTM depèn de la síntesi proteica en cervell durant un breu període de temps durant i després de l'aprenentatge (6102451)[146].

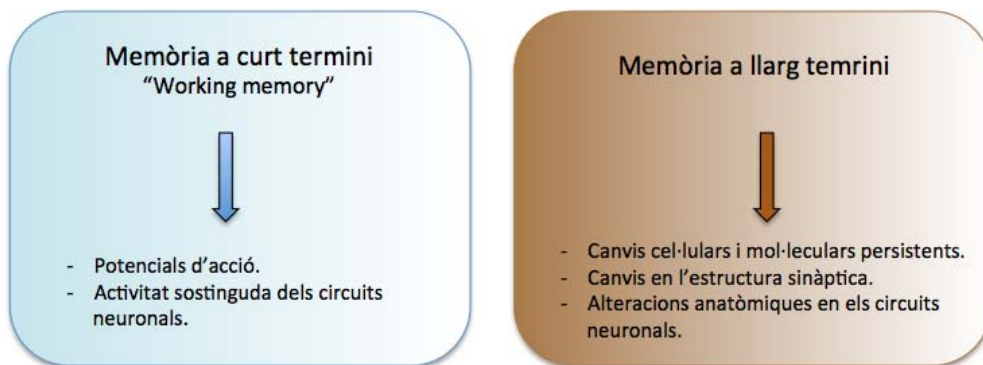


Figura 1.10- Els mecanismes per emmagatzemar la memòria a curt termini són diferents dels subjacents a la memòria a llarg termini . (Adaptat de Sweatt et al. 2010) [147].

2.2- Estructures cerebrals implicades en processos d'aprenentatge i memòria

2.2.1- Hipocamp

L'hipocamp és l'estructura cerebral més directament relacionada amb l'aprenentatge i la memòria [148]. Aquesta estructura, localitzada a la cara medial del lòbul temporal, té un paper determinant en l'adquisició d'informació nova, i intervé tant en la codificació com en la consolidació de material nou i possibilita la transferència d'aquest material de la memòria a curt termini a la memòria a llarg termini. Per tant, l'emmagatzematge a llarg termini de la informació és molt improbable sense la intervenció de l'hipocamp. A més, les escorces entorínica, perirínica i es troben estretament lligades a l'hipocamp gràcies a l'existència tant d'aferències com d'eferències amb el mateix hipocamp.

El procés d'adquisició i consolidació de la memòria comença amb el registre i processament dels estímuls que arriben de l'exterior en una o més àrees de l'escorça cerebral, les quals codifiquen i integren informació de totes les modalitats sensorials. La informació aquí sintetitzada és enviada a l'escorça de l'hipocamp i a l'escorça perirínica mitjançant rutes descendents corticohipocampals, i arriba posteriorment a l'escorça entorrínica, la porta d'entrada més important a l'hipocamp. Des d'aquí es projecta, a través de via perforant, a la circumvolució dentada, per arribar finalment a l'hipocamp. A més, l'hipocamp també reb informació procedent de l'amígdala, la qual té un paper modulador sobre l'aprenentatge, de manera que potencia els aprenentatges dels estímuls i les situacions amb càrrega emocional. Una vegada que el procés de codificació dut a terme per l'hipocamp ha finalitzat, la informació és novament enviada a l'escorça cerebral. El camp CA1 de l'hipocamp i el subicle són les principals estructures encarregades de generar aquestes eferències. A més, des de l'hipocamp també s'envia informació per mitjà del fòrnix, als cossos mamil·lars de l'hipotàlem. Posteriorment, la informació és remesa al tàlem posterior, des d'on viatja a les àrees d'associació de l'escorça cerebral per a ser finalment emmagatzemada. Així doncs, les estructures temporals medials, resulten imprescindibles per a la consolidació i l'emmagatzematge de la informació a llarg termini, però a les regions de l'escorça d'associació, en les quals la informació es va processar per primera vegada, és on s'emmagatzemarà d'una manera definitiva. Per tant, l'hipocamp té un paper fonamental en l'emmagatzematge inicial de la memòria a llarg termini però aquesta implicació és temporal i es produeix a l'inici de l'aprenentatge, ja que posteriorment la informació emmagatzemada es transferix a altres regions corticals [145].

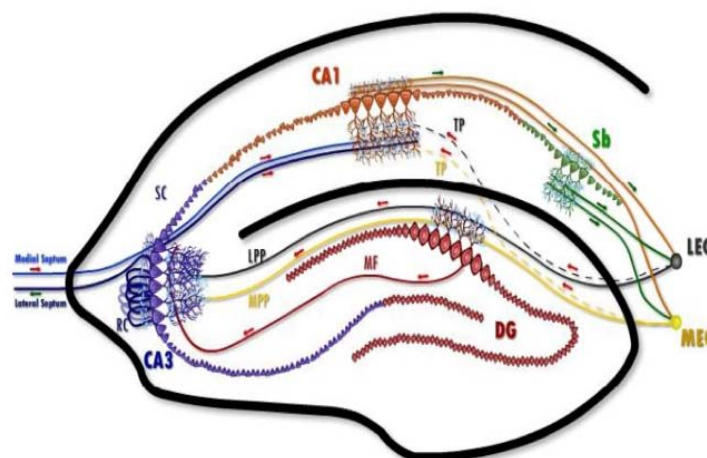


Figura 1.11- Anatomia de l'hipocamp. L'estructura bàsica és molt similar en humans, primats no-humans i rosegadors. En el circuit trisinàptic, la informació flueix des de l'escorça entorrínica (MEC i LEC) cap al gir dentat (DG) a través de la via perforant (via perforant lateral (LPP) i via perforant medial (MPP)) i aleshores cap a les cèl·lules de la regió CA3 i CA1, i finalment, cap a les cèl·lules piramidals subiculars que, a la vegada, projecten cap a les capes profundes de l'EC. (Rendeiro et al. 2009) [145].

2.2.2- Escorça o còrtex cerebral

Pel que fa al paper que té l'escorça cerebral en el procés d'aprenentatge, és fonamental conèixer que els records estan formats per xarxes neuronals àmpliament distribuïdes per tota l'escorça. Aquestes xarxes formen les denominades empremtes mnèsiques i es formen per l'estimulació conjunta de diferents neurones a partir d'un mateix esdeveniment (seguint el principi de Hebb), de manera que queden interconnectades per mitjà de sinapsis i formen una xarxa. Tal i com s'ha descrit anteriorment, en el lòbul temporal medial es duen a terme els processos de transferència de la informació per a emmagatzemar-la posteriorment a llarg termini, però en l'escorça cerebral es produeix l'emmagatzematge permanent.

És important assenyalar les diverses funcions en les quals se centren les diferents regions de l'escorça cerebral. L'*escorça posterior* o postrolàndica es dedica principalment al processament perceptiu, i té un paper determinant en l'emmagatzematge dels records que adquireixen qualsevol dels nostres sentits. D'altra banda, l'escorça frontal o prerolàndica té, entre d'altres funcions, el processament i representació de les accions motores, el raonament i la producció del llenguatge. L'escorça temporal (excloses les regions medials descrites anteriorment) sembla ser clau en el manteniment de la memòria a llarg termini, ja que les lesions que la comprometen es manifesten amb amnèsia retrògrada. Així mateix, hi ha una especialització hemisfèrica, de manera que l'hemisferi dret està més relacionat amb material no verbal i l'esquerre, amb material de caràcter verbal. A més de la seva implicació en l'emmagatzematge del coneixement semàntic, l'escorça parietal, sobretot de l'hemisferi dret, sembla estar implicada en el record de la disposició espacial d'objectes i persones.

2.2.3- Escorça o còrtex prefrontal

Pel que fa al lòbul frontal, l'àrea més estudiada i millor coneguda funcionalment és l'escorça prefrontal. Està molt implicada en el manteniment temporal de la informació explícita al llarg del procés d'establiment i consolidació de la memòria, i també en la discriminació i organització temporal dels records. En humans l'escorça prefrontal constitueix el 30% de tota l'escorça cerebral i és l'àrea del cervell que té un desenvolupament ontogenètic i una mielinització més tardana. Els pacients amb patologia prefrontal no mostren una síndrome amnèsica clàssica sinó que presenten una dificultat o incapacitat per a manejar temporalment els records de manera eficaç, per a ordenar-los cronològicament i per a recordar com i quan es va adquirir una informació determinada. Una altra

de les implicacions d'aquestes lesions és la dificultat que poden tenir aquests pacients a l'hora de fer tasques o activitats que impliquin una seqüència de respostes en un ordre determinat.

L'escorça prefrontal dorsolateral és la regió que assumeix el control general sobre les operacions de memòria de treball en totes les modalitats sensorials. En la recerca amb humans sans, un dels paradigmes més emprats en l'estudi de la memòria de treball són les tasques de resposta demorada (*delayed response tasks*, en anglès), en les quals s'ha de memoritzar temporalment una informació determinada que permetrà respondre adequadament més tard. Gràcies a la tècniques de neuroimatge modernes s'ha pogut distingir l'activitat cerebral al llarg del procés complet de memòria a curt termini, és a dir, durant la codificació de la informació, el seu manteniment (període de retard del qual s'encarregaria la memòria de treball), i la resposta donada pel subjecte.



Figura 1.12- Localització anatòmica de l'escorça o còrtex prefrontal (mostrat en vermell) en l'hemisferi cerebral esquerra en humans. Visió frontal, lateral i medial ("BodyParts3D" ©, The Database Center for Life Science)

2.2.4- Cerebel

El cerebel és una estructura que representa més del 10% del cervell, també té dos hemisferis i les seves funcions principals es relacionen amb l'equilibri i la coordinació. Rep informació dels ulls, les orelles, els músculs i les articulacions sobre els moviments del cos i la seva posició. Després de processar la informació, envia missatges a través de la resta del cervell i de la medulla espinal. S'ha demostrat que el cerebel també té un paper important en l'aprenentatge i la memòria [149].

2.3- Dèficits cognitius i alteracions conductuals durant l'envelliment

Encara que la memòria de cada persona és única, es pot esperar o és freqüent que, amb l'edat, es produeixin canvis en alguns aspectes que en determinen l'eficiència, com ara els següents:

- Esdevé més difícil prestar atenció a més d'una cosa alhora.
- Aprendre alguna cosa nova requereix més esforç.

- Es fa més lenta la recuperació d'informació de coses antigues.

Les funcions neurològiques durant l'envelliment normal han estat estudiades extensament en diversos estudis transversals i metaanàlisis. S'ha observat que hi ha una disminució d'entre el 40 i el 60% de la velocitat cognitiva en individus no dements de 80 anys comparat amb adults de 20 anys. El procés d'envelliment afecta de manera diferent les capacitats cognitives (Figura 1.13). Per exemple, l'habilitat verbal, la velocitat de processament de la informació, la resolució de problemes, la funció inhibitoria, la memòria de treball, la memòria a llarg termini i l'habilitat espacial disminueixen amb l'edat, mentre que les habilitats relacionades amb el coneixement o l'expertesa, com el vocabulari, el coneixement del món, el coneixement general i la memòria implícita es mantenen estables amb l'edat, i fins i tot poden arribar a millorar [116].

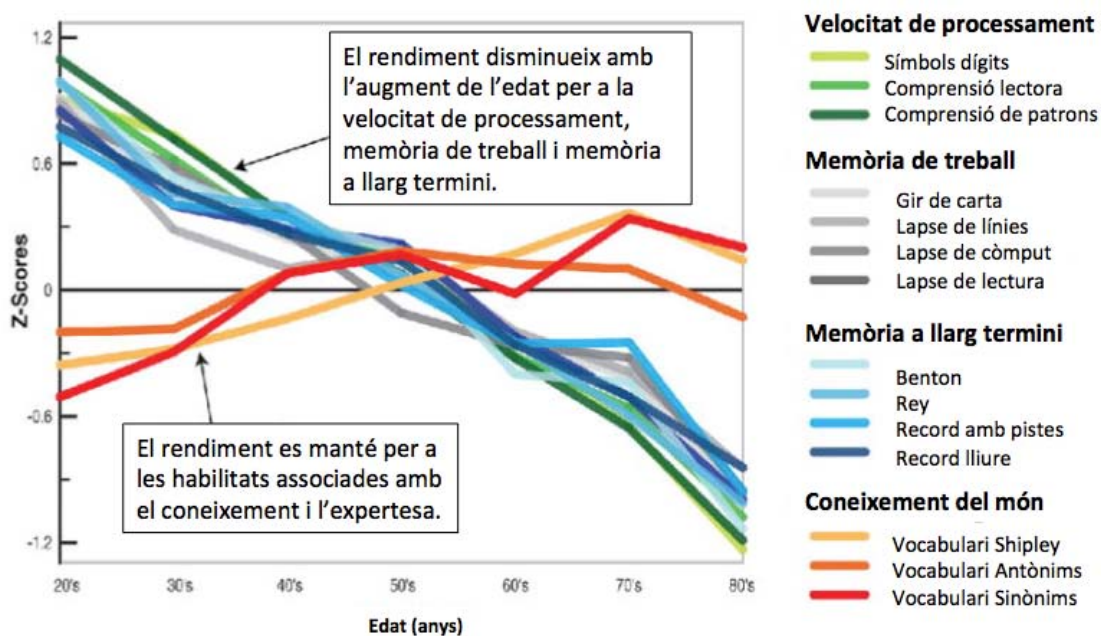


Figura 1.13- Efectes diferencials de l'envelliment sobre diversos processos cognitius. L'eix y correspon a la distància respecte la mitjana en desviacions estàndards respecte l'habilitat cognitiva explicada al llistat. (Adaptat de *Glorioso et al. 2011*) [116].

La gran afectada per l'envelliment és la memòria episòdica: la part de la memòria a llarg termini que conté els fets de la vida diària. Per això, és possible començar a experimentar dificultat per recordar coses quotidianes, coma ara el nom d'algú que acabem de conèixer, on hem deixat les claus, o on hem aparcat el cotxe. Alhora, esdevé més difícil processar grans quantitats d'informació. També s'observen canvis en la percepció afectiva i de l'humor amb l'augment de l'edat. Les persones ancianes mostren major dificultat per identificar les emocions de tristesa o ràbia respecte els joves.

Tots els sentits reben informació de l'entorn (llum, vibracions sonores, etc.) que es converteix en un impuls nerviós i s'envia a l'escorça cerebral, on s'interpreta com una sensació amb significat. Per pèrdua sensorial s'entén la disminució de la capacitat per respondre a estímuls que afecten els sentits. Per percebre una sensació, l'estímul ha d'arribar a una intensitat determinada, anomenada llindar. Amb l'envelliment, aquest llindar s'eleva, de manera que la quantitat o la intensitat de l'estímul sensorial necessària per ser conscient de la sensació ha de ser més gran [150, 151].

2.4- Vies de senyalització implicades en longevitat i envelliment cognitiu

El declivi o la pèrdua de les funcions cerebrals, incloent l'aprenentatge i la memòria, és un dels efectes més devastadors i temuts de l'envelliment. A més, els desordres psiquiàtrics i neurodegeneratius com l'esquizofrènia, la depressió, l'Alzheimer, el Parkinson o la malaltia de Huntington, també comporten alteracions cognitives associades a l'edat. Per tant, en darrer terme, per a la prevenció d'aquestes patologies és necessari entendre els mecanismes moleculars subjacents i els seus vincles amb el procés d'envelliment. Tal i com es mostra en la *Taula 1.2*, diversos estudis a nivell molecular i cel·lular indiquen que hi hauria un fort solapament entre les vies que regulen la longevitat en un organisme i la disminució de les capacitats cognitives amb l'edat, així com també els processos neurodegeneratius [152]

Via de senyalització	Efectes en l'envelliment d'organismes models	Efectes en l'envelliment cerebral en mamífers
Insulina/ IGF-1	Una disminució en la senyalització d'aquesta via augmenta la resistència a l'estrès i l'esperança de vida.	Una disminució en la senyalització d'aquesta via redueix la patologia d'AD; paradoxalment, l'augment de la senyalització podria ser neuroprotector.
mTOR	Una disminució en la senyalització d'aquesta via augmenta l'esperança de vida, augmenta l'autofàgia i disminueix la traducció de proteïnes.	La regulació de l'autofàgia i la homeòstasi proteica pot modular l'agregació tòxica de proteïnes en malalties neurodegeneratives.
Funció mitocondrial	Una funció severament disminuïda causa una reducció en l'esperança de vida, però una funció moderadament disminuïda permet augmentar l'esperança de vida.	La reducció progressiva de la funció amb l'edat contribueix al declivi cognitiu i la patologia. No obstant, evidències preliminars suggereixen que una reducció suau de la funció podria activar vies beneficioses.
Sirtuïnes	Poden augmentar o disminuir l'esperança de vida en contextes diferents.	Poden ser neuroprotectors o perjudicials per les neurones, depenent del context.
Restricció calòrica	A nivells òptims, augmenta l'esperança de vida.	Augmenta la preservació de la funció cognitiva durant l'envelliment.

Taula 1.2- Vies de senyalització que influencien l'envelliment en organismes model i l'envelliment cerebral en mamífers. (Adaptat de Bishop et al. 2010) [93].

D'entre les troballes més interessants fetes en els darrers anys en relació a aquest tema destaquen:

- a) Via de senyalització de la insulina/IGF.1 (IIS):** En *C.elegans* s'ha demostrat que IIS influencia l'aprenentatge per termotaxis [153]. És més, els mutants per a IIS que presenten una major esperança de vida mostren millors capacitats per associar la temperatura amb el menjar, tant a edats joves com avançades [154]. És més, els mutants *daf-2* que també presenten una major esperança de vida són capaços d'associar la temperatura i la inanició de manera més eficient que els controls. Aquesta major capacitat en els mutants *daf-2* depèn del sensor neuronal de Ca^{2+} NCS-1, un component clau del circuit termosensorial [155]. Així, es creu que una reducció en la via de senyalització de la insulina no altera la plasticitat neuronal sinó que permet establir una associació més ràpida i prolonga la durada d'aquesta associació [156]. És a dir, la via IIS tindria un paper més important en la recuperació que en l'adquisició de memòria [93].
- b) Restricció calòrica (CR):** La reducció de la ingesta d'aliments s'ha demostrat que és capaç de augmentar l'esperança de vida en un ventall d'organismes molt ampli que inclou llevats, nemàtodes, mosques i rosegadors. Estudis recents en primats indicarien que la CR permetria evitar el desenvolupament de patologies com atròfia cerebral, però encara es troba en debat si és capaç d'augmentar-ne l'esperança de vida [80, 157, 158]. En estudis fets amb *Drosophila* s'ha vist que les mosques en condicions de CR, i que viuen de mitja un 14%, tenen millors capacitats d'aprenentatge, fins i tot a edats avançades. A més la CR també sembla atenuar el deteriorament cognitiu associat a l'edat en rates [159].
- c) Funció mitocondrial:** Nombroses evidències suggereixen que l'estructura i la funció neuronal són particularment vulnerables a la disfunció mitocondrial [160]. Els estudis d'envelliment en organismes invertebrats proporcionen una base comuna per la mitopatologia i el declivi cognitiu. Diversos grups conservats de gens que influencien el metabolisme mitocondrial, la plasticitat neuronal i la funció sinàptica mostren canvis d'expressió amb l'edat. S'ha observat per exemple, que la inhibició en *Drosophila* de l'expressió dels gens del complex I i IV de la cadena respiratòria específicament en neurones adultes és suficient per augmentar l'esperança de vida [161]. L'associació entre la morfologia neuronal i els efectes conductuals suggereixen que la disfunció mitocondrial podria, en part, ser responsable del deteriorament en les capacitats cognitives durant l'envelliment [162].
- e) Autofàgia i homeòstasi proteica:** La via de l'autofàgia també està implicada en envelliment i deteriorament cognitiu. L'activitat autofàgica disminueix amb l'edat i els gens que controlen

aquest procés es troben fortament associats a la regulació de la longevitat en mosques i nematodes [163]. En *Drosophila*, la sobreexpressió dels gens relacionats amb l'autofàgia en neurones augmenta la longevitat, mentre que la seva repressió provoca defectes neuronals i mort prematura [164]. D'altra banda, la inducció de processos autofàgics utilitzant espermidina és capaç de reduir l'agregació de proteïnes ubiquitinitzades i protegeix del deteriorament cognitiu lligat a l'envelliment [165].

e) Senyalització a través de TOR: Una disminució de la senyalització a través de la quinasa TOR (*target of rapamycin*) augmenta l'esperança de vida en diversos organismes [166-170]. En relació als processos cognitius s'ha vist que la reducció del complex mTORC2 provoca un deteriorament de la memòria a llarg termini en mosques [171]. De manera similar, l'administració a llarg termini de rapamicina evita la desmielinització neuronal i la neurodegeneració observada durant l'envelliment en rates senescentes accelerades OXYS, una soca caracteritzada per la sobreproducció de radicals lliures [172]. En models murins d'AD, l'administració de rapamicina millora les capacitats cognitives, possiblement a través de la preservació de la integritat vascular i la funció cerebral [173].

Per tant, existeixen cada cop més evidències que aquelles vies encarregades de regular la longevitat també participen en la disfunció neuronal i el deteriorament cognitiu associat a l'edat (*Figura 1.1.4*). De fet, la manipulació d'aquestes vies de senyalització en diversos organismes afecta l'estructura i la funció neuronal i conseqüentment desencadena l'aparició de desordres cognitius. A destacar, però, el fet que gran part d'aquests estudis s'han dut a terme en organismes invertebrats i que per tant, la rellevància d'aquestes troballes en l'envelliment neuronal i la patofisiologia del SNC en organismes superiors, incloent humans, encara no ha estat estudiada. Adreçar aquests estudis contribuiria al desenvolupament d'estratègies i aproximacions terapèutiques amb l'objectiu de combatre el deteriorament cognitiu i determinades condicions de neurodegeneració associades al procés d'envelliment.

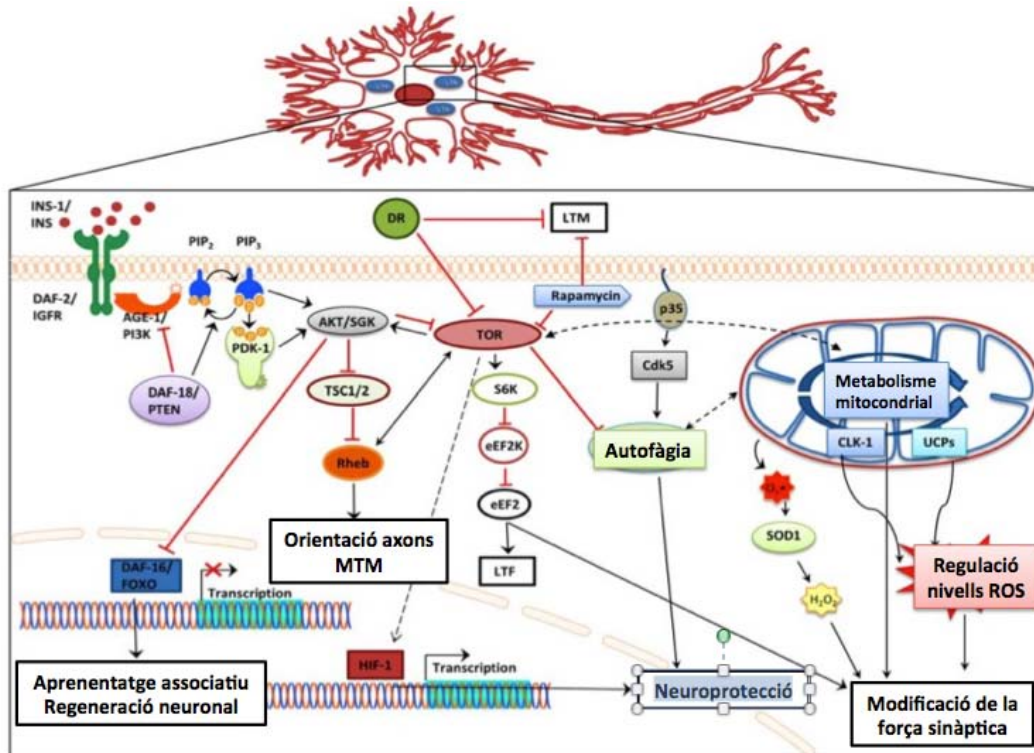


Figura 1.14- Efectes de la senyalització a través de IIS, CR, TOR i funcions mitocondrials i d'autofàgia sobre la formació de memòria. DAF-2/IGFR: receptor del factor de creixement similar a la insulina; DR: restricció dietària; INS: insulina; LTF: facilitació a llarg termini; LTM: memòria a llarg termini; MTM: memòria a mig termini (Adaptat de Tavernarakis et al. 2014) [152].

2.5- Potenciació de la memòria i l'aprenentatge durant l'evelliment.

Els dèficits en l'aprenentatge i la memòria observats en animals vells, poden ser previnguts, retardats o fins i tot revertits amb determinats tractaments. La controvèrsia i el debat continu que genera les implicacions ètiques de l'ús, o mal ús, de medicaments o drogues per millorar la funció cognitiva (com el metilfenidat) en individus sans, ha emmascarat les necessitats dels potencials grups beneficiaris, aquelles persones afectades per condicions patològiques en les quals la seva capacitat cognitiva es veu compromesa [174]. No obstant, existeixen evidències clares que donen suport a la potencial eficiència d'alguns d'aquests tractaments farmacològics, que també reben el nom de *nootropics* o drogues intel·ligents, de l'anglès *smart drugs*, en relació a la memòria de treball, la motivació i l'atenció [175-177]. Aquestes substàncies realitzen la seva funció a través de diversos mecanismes, per exemple, redueixen els danys físics o químics que el cervell pot rebre i alenteixen el deteriorament natural de les seves funcions, reparen danys ja soferts pel cervell o milloren les funcions cerebrals en aportar-li més oxigen, augmenten el nombre de neurotransmissors i redueixen

la seva degradació [174, 178]. Algunes de les més estudiades i utilitzades són derivats de les amfetamines [179], agents eugeroics com el modafinil [180], la cafeïna [181-183] o la nicotina [184].

En comparació, les intervencions no-farmacològiques per potenciar la funció cognitiva en models animals inclouen l'enriquiment ambiental, l'exercici físic i la dieta. En primer lloc, trobem abundants evidències que canvis en la dieta, principalment en la ingesta de nutrients i la suplementació amb compostos específics, tenen un impacte significatiu en la capacitat cognitiva [185]. Un exemple, són els àcids grassos omega-3, els quals són essencials per a la funció cerebral. L'àcid docosahexaenoic (DHA) és un àcid omega-3 crucial per la integritat de les membranes sinàptiques que està implicat en el desenvolupament neuronal i la funció sinàptica [186] a través de la modulació directa dels canals de potassi dependents de voltatge Kv1.5 per mantenir el potencial de membrana [187]. En estudis amb rates s'ha vist que la suplementació de la dieta amb omega-3 produeix un augment en l'expressió d'un factor neurotròfic clau, el BDNF en còrtex i hipocamp [188]. Per contra, una dieta deficient en àcids omega-3, especialment durant el desenvolupament cerebral, s'associa a una menor plasticitat neuronal i a l'aparició de canvis de comportament relacionats amb l'ansietat [189]. Altres derivats alimentaris han demostrat tenir efectes pro-cognitius. Per una revisió completa veure [190-194].

D'altra banda, se sap que el sobrepès i la obesitat són factors de risc per a un baix rendiment cognitiu i el desenvolupament de dèficits cognitius i demències [195]. De fet, existeix un camp emergent dins la recerca clínica amb la finalitat d'estudiar la relació entre el pes corporal i la funció cognitiva [196-198]. Els efectes beneficiosos de la restricció calòrica s'han relacionat amb una resposta neuroendocrina per disminuir la disponibilitat energètica originada al hipotàlem [199] i també amb la capacitat per contrarestar les alteracions hipocampals que afecten proteïnes clau implicades en senyalització neuronal associades a l'envelliment, gràcies a un augment en l'expressió de la subunitat NR2B del receptor NMDA de glutamat [200].

D'altra banda, l'efectivitat de l'activitat física per modular les capacitats cognitives es troba ben descrita en l'actual bibliografia científica. Realment, les evidències que donen suport als efectes beneficiosos de l'exercici sobre la funció cognitiva són tan convincents que els resultats obtinguts en els estudis preclínic estan essent examinats per identificar possibles dianes moleculars per a noves intervencions farmacològiques que s'inclou dins la "*farmacomimètica de l'exercici*" [201]. No obstant, els mecanismes biològics responsables dels efectes positius de l'activitat física sobre els

processos cognitius encara està en debat, tot i que processos com l'angiogènesi [202], la neurogènesi [203] o la sinaptogènesi [204] es veuen afectats.

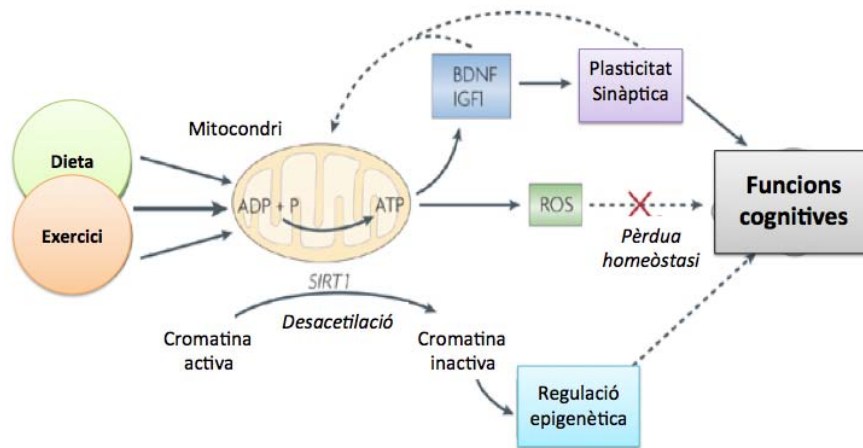


Figura 1.15- Múltiples sistemes de senyalització afectades per l'activitat física. (Adaptat de Gomez-Pinilla et al. 2008) [185].

Una de les molècules que sembla tenir un paper clau en els beneficis cognitius aportats per l'exercici és el factor de creixement BDNF, el qual participa en processos de neuroplasticitat, neuroprotecció, creixement i diferenciació, durant el desenvolupament i en el cervell adult [205]. A més de la seva funció tròfica, el BDNF ha emergit com un regulador clau de moltes altres funcions neuronals com l'alliberació de neurotransmissors [206] i la plasticitat sinàptica [207]. Neeper et al. l'any 1995 van observar per primer cop com l'activitat física afectava la producció de BDNF en cervell [208]. De manera sorprenent, es va demostrar que els efectes més notables de l'exercici sobre l'mRNA de BDNF tenia lloc en regions no relacionades directament amb el sistema motor, sinó en àrees associades amb la funció cognitiva com l'hipocamp o l'escorça. En treballs posterior s'ha vist, que l'exercici voluntari en rates fa augmentar tant els nivells de proteïna com d'mRNA de BDNF en hipocamp, cerebel i còrtex prefrontal [209]. Aquestes observacions suggereixen que l'exercici físic, a través de la regulació de la síntesi de BDNF, pot ser neuroprotector i evitar l'aparició de dèficits cognitius associats a l'edat i a processos neurodegeneratius com l'Alzheimer. Paral·lelament, sembla ser que l'exercici potencia la neurogènesi hipocampal a través de l'estimulació de la producció d'IGF-1 [210]. A més, IGF-1 també és clau en els fenòmens d'angiogènesi cerebral derivats de l'activitat física. Un dels mecanismes pels quals IGF-1 és capaç d'induir la formació de nous vasos sanguinis és indirectament a través de la síntesi de VEGF [211]. És més, l'expressió d'IGF-1 i VEGF es veu augmentada després de l'exercici aeròbic, permetent la formació de nous vasos, un fenomen que té lloc tant en la infantesa com en la vellesa [212]. A més, els sistemes de neurotransmissors també es

veuen afectats per l'exercici. Alguns dels canvis induïts en rates en condicions d'exercici són, per exemple, un augment en els nivells de serotonina en totes les àrees cerebrals [213] i de noradrenalina en l'escorça prefrontal [214], una major densitat de receptors de dopamina en l'estriat [215] i de receptors muscarínics en l'hipocamp [216]. En relació als mecanismes de transducció, se sap que la via de senyalització més important que es troba mitjançant els efectes de l'exercici sobre la plasticitat sinàptica en hipocamp són les proteïnes quinases activades per mitògens (MAP-K), CAMK-II i el receptor NMDA [217].

Finalment, s'ha vist que també és possible millorar la funció cognitiva a través de l'enriquiment ambiental, és a dir, l'estimulació cerebral degut a l'entorn físic i social [218]. Implica la manipulació de les condicions d'establiment dels animals per afavorir la potenciació de les activitats sensorials, cognitives i físiques [219]. Aquest efecte té lloc, sobretot durant el neurodesenvolupament, però també durant l'edat adulta en menor mesura i pot induir canvis cerebrals substancials [220]. El cervell en ambients estimulants, presenta una taxa més alta de sinaptogènesi i arbres dendrítics més complexes, que condueixen a un augment en l'activitat cerebral [221]. La investigació en animals ha trobat que l'enriquiment ambiental podria ser d'ajut en el tractament i recuperació de nombroses disfuncions cerebrals, especialment en aquelles associades a l'edat o a la malaltia d'Alzheimer [222-225]. De fet, s'ha descrit que el nombre de receptors de glucocorticoides a l'hipocamp augmenten amb l'enriquiment, cosa que va acompanyada d'una disminució dels corticosteroides circulants. Aquest resultat podria explicar l'efecte beneficiós del tractament pel que fa a la prevenció de dèficits lligats a l'envelliment, ja que s'atenua l'efecte nociu d'una exposició perllongada a aquestes hormones [226]. Per contra, estudis en humans demostren que la manca d'estimulació podria retardar i tenir efectes negatius en el desenvolupament cognitiu [227]. La investigació també conclou que tenir un nivell educacional alt i moure's en entorns on les persones participen en activitats intel·lectuals estimulants fa que es disposi d'una major reserva cognitiva la qual cosa permet reduir el grau de deteriorament cognitiu després d'una lesió o dany cerebral [228].

3. KLOTHO

3.1- Klotho i envelliment

L'envelliment és un procés multifactorial, en el qual hi intervenen tan els antecedents genètics com l'estrès ambiental. A finals dels anys 90, un estudi en ratolins va revelar que la mutació d'un únic gen en el cromosoma 13, causa un procés d'envelliment accelerat [51, 229]. Al contrari, el ratolí transgènic que sobreexpressa aquest gen té una major esperança de vida, d'entre un 30% i un 40% [55]. Aquest gen, s'anomena klotho, i rep el seu nom en honor a la deessa grega *Clotho*, que feia girar el fil de la vida.

El model murí deficient en homozigosi per al gen klotho (*kl-/kl-*) presenta alguns símptomes típics del procés d'envelliment en humans entre els quals destaquen arteriosclerosi, osteoporosis/osteopènia, calcificacions ectòpiques en diferents teixits, emfisema pulmonar, problemes cognitius i infertilitat (*Taula 1.3*). Tot i que aquest ratolí no presenta un fenotip visible fins a les 3-4 setmanes d'edat, a partir de llavors comença a mostrar retard en el creixement, gradualment esdevé menys actiu i mor de manera prematura al voltant dels 2 mesos d'edat tot i que la causa exacta es desconeix [51]. Aquest model, no presenta altres patologies pròpies de l'edat com càncer, dipòsit amiloides o cataractes [230]. Tot i així, i donat que els fenotips descrits encaixen molt bé dins dels criteris patològics establerts per a l'envelliment humà [231], es considera que aquest ratolí és un bon model per a l'estudi del procés d'envelliment en humans.

De manera similar al que passa en ratolins, en humans polimorfismes en el gen klotho afecten la longevitat i estan relacionats amb l'aparició de patologies associades a l'edat [232]. Per exemple, s'han descrit fins a 7 SNPs diferents en el locus humà de klotho que podrien tenir relació amb el desenvolupament de osteoporosis senil, malalties coronaries, accidents cerebrovasculars i el síndrome metabòlic, que representen els trastorns més freqüents associats a l'envelliment humà [233-235]. També s'ha descrit que aquells individus que presenten en heterozigosi un al·lel específic d'aquest locus, anomenat KL-VS, tenen una major probabilitat de supervivència després dels 75 anys [236].

Taula 1.3- Característiques del ratolí deficient per al gen *klotho*

Retard en el creixement	Menor tamany corporal en comparació al ratolí <i>wild-type</i> .
Mort prematura	L'esperança de vida mitja és de 60.7 dies (cap sobrepassa els 100 dies).
Cifosi	La columna vertebral es torça provocant una inclinació de l'esquena.
Hipocinèsia	Pèrdua de la velocitat dels moviments voluntaris i limitació de la seva extensió.
Alteracions en la marxa	Patró anormal en el caminar (similar al parkinsonisme).
Emfisema pulmonar	Engrandiment dels espais per l'aire en bronquis i destrucció de l'arquitectura alveolar.
Arteriosclerosi	En aorta i altres arteries musculars més petites. S'inicia a les 4 setmanes i progressa gradualment amb l'edat.
Calcificacions ectòpiques	Dipòsit de sals de calci a l'estomac, mucosa bronquial, cèl·lules alveolars, plexe coroide, pell, testicles i múscul cardíac.
Osteoporosi	Baixa densitat òssia i reducció en el nombre de osteoblast i osteoclasts.
Atròfia de la pell	Reducció en el nombre de fol·lícles pilosos i en el gruix de la dermis i la epidermis.
Defectes d'audició	No hi ha canvis morfològics en l'orella interna però sí una pèrdua auditiva.
Atròfia dels òrgans genitals	En femelles, tancament de l'obertura vaginal i atròfia dels ovaris i l'úter. En mascles, tamany reduït de l'escrot i atròfia dels testicles.
Maduració alterada de les cèl·lules gonadals	En mascles, atròfia del tub seminífer i incapacitat de diferenciació dels espermatòcits. En femelles, a l'ovari els fol·lícles no poden madurar.
Anormalitats en la glàndula pituïtària	Les cèl·lules productores d'hormona de creixement (GH) són més petites.
Marcadors sèrics	Lleuger increment en els nivells de fòsfor i vitamina D. La ratio limfòcits/leucòcits es troba disminuïda.
Nivells glucosa/insulina	Hipoglucèmia i disminució d'insulina en pàncrees.
Problemes cognitius	Alteracions de les funcions cognitives en els tests de comportament.
Neurodegeneració en SNC	Depleció de cèl·lules de Purkinge en el cerebel i neurodegeneració en hipocamp.

3.2- Expressió del gen *Klotho*

Klotho no s'expressa de manera ubíqua sinó que es detecta principalment en òrgans que s'encarreguen de regular la homeòstasi del calci, incloent els túbuls contornejats distals del ronyó, les cèl·lules secretores d'hormona paratiroide i l'epiteli del plexe coroide del cervell [237] i en menor mesura també en cor, múscul esquelètic, bufeta urinària, placenta, pàncrees, testicles, ovaris, colon i orella interna [51, 238]. Però tenint en compte que la seva expressió no es manifesta en molts dels òrgans que es troben severament afectats en el model murí *kl-/kl-*, com ara pulmó, òssos, paret gàstrica i pell, es creu que gran part dels seus efectes vindrien donats per una forma proteica soluble que podria estar actuant com una hormona endocrina o paracrina. D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha pogut comprovar que l'expressió ectòpica de *klotho*, limitada a cervell i testicles, permet millorar molts dels trets patològics observats en aquest model [51]. Així doncs, totes aquestes dades

suggereixen que les funcions pleiotròpiques de klotho serien dutes a terme per un factor soluble circulant capaç d'arribar a diferents òrgans diana a través dels fluids corporals com la sang, la urina i el líquid cerebrospinal.

D'altra banda, l'expressió de klotho es veu influenciada per diversos factors fisiològics i també certes condicions patològiques (Taula 1.4). Per exemple, durant l'envelliment l'expressió de klotho disminueix en cor i fetge en ratolins [239], en cervell de primats, ratolins i rates [240] així com també en sèrum en humans [241]. També s'ha observat una disminució important de l'expressió de klotho en certes malalties com ara models espontanis i induïts de rates hipertenses, rates nefrectomitzades, rates diabètiques no dependents d'insulina i rates amb infart agut de miocardi [242, 243]. En humans, s'ha observat que en pacients de malalties renals cròniques els nivells de klotho es veuen reduïts [244]. Alguns altres factors exògens o endògens poden modificar-ne també els nivells, així, l'administració oral de troglitazone (un fàrmac antidiabètic i anti-inflamatori) augmenta l'expressió renal de klotho [245]. D'altra banda, el dany oxidatiu causat per peròxid d'hidrogen fa reduir els seus nivells [246].

Taula 1.4- Patologies en les que els nivells de klotho es veuen afectats.

Condició/ malaltia	Especies	Nivells de klotho	Referències
Envelliment	Ratolí/Rata/humans	Disminuïts	[247-249]
Hipertensió	Rata	Disminuïts	[242], [250]
Problemes cardíacs	Rata	Disminuïts	[251] [252]
Arteriosclerosi	Rata	Disminuïts	[57], [253]
Anèmia	Ratolí	Disminuïts	[254], [255]
Anorèxia nerviosa	Humans	Disminuïts	[256]
Diabetis	Ratolí / rata	Disminuïts	[257], [258]
Osteoporosi	Ratolí	Disminuïts	[259, 260]
Fibrosi renal	Ratolí	Disminuïts	[261]
Dany renal agut	Ratolí / humans	Disminuïts	[172], [262]
Dany renal crònic	Ratolí / humans	Disminuïts	[263]
Isquèmia renal	Ratolí / rata	Disminuïts	[261, 264]
Carcinoma renal	Humans	Disminuïts	[265]
Glomerulonefritis	Ratolí	Disminuïts	[266]
Càncer gàstric	Humans	Disminuïts	[267], [268]
Carcinoma hepatocel·lular	humans	Disminuïts	[269]
Fibrosi pulmonar	Humans	Disminuïts	[270]
Carcinoma de cèrvix	Humans	Disminuïts	[271],
Melanoma	Humans	Disminuïts	[272]
Estrés	Humans	Disminuïts	[273]

3.3- Estructura del gen *Klotho* i productes proteics

Tant en ratolí com en humans, el gen *klotho* s'estructura en 5 exons i 4 introns, i codifica un transcrit d'unes 5.2 kb [51]. El seu promotor no presenta la típica caixa TATA, però conté quatre possibles llocs d'unió a *Sp1*, un factor de transcripció implicat en la regulació de l'expressió gènica durant les primeres etapes del desenvolupament [274]. En el tercer exó hi ha un lloc donador per a un splicing alternatiu, per tant es poden generar dos transcrits diferents que codifiquen una forma transmembrana (transcrit sencer o *full-length*, 1014 aminoàcids) i una forma secretada de la proteïna (la meitat del transcrit transmembrana, 550 aminoàcids). En ratolins, la expressió de la forma transmembrana de la proteïna *klotho* predomina sobre la forma secretada en tots els teixits examinats. No obstant, en humans el major producte gènec de *klotho* correspon a la forma secretada de la proteïna [274, 275].

El primer transcrit (sencer o *full-length*) codifica una proteïna transmembrana de pas únic que conté una seqüència senyal (SS) en el seu extrem N-terminal amb un pes molecular aproximat de 130 kDa. La proteïna conté tres dominis: un domini intracel·lular molt curt de 10 aminoàcids, un domini transmembrana a l'extrem C-terminal i un domini extracel·lular format per dos seqüències internes repetides d'uns 550 aminoàcids anomenades KL1 i KL2 respectivament, que presenten homologia de seqüència amb les β -glucosidases [51]. El transcrit procedent de l'splicing alternatiu genera una forma truncada de la proteïna que està formada únicament pel domini KL1, amb un pes aproximat de 70kDa. En ratolins aquest transcrit conté 3 exons mentre que en humans en conté 5. Aquest mRNA alternatiu incorpora una cua de 14 aminoàcids que és específica i que no trobem en el transcrit transmembrana [275],[274]. El fet de que fos possible detectar aquest transcrit en ambdues espècies va fer sorgir la hipòtesis de que una forma soluble de *klotho* existia de manera extracel·lular. Tot i així, existeix una certa controvèrsia respecte aquesta proteïna ja que després de realitzar diversos estudis, no s'ha pogut detectar mai utilitzant anticossos [276]. Com que se sap que aquest transcrit és el majoritari en humans, una possible explicació és que sigui produït i secretat però aleshores eliminat ràpidament fins a nivells indetectables en sèrum.

Taula 1.5- Expressió de la proteïna *klotho* en ratolí, rata i humans

	Ratolí	Rata	Humans
Localització gènica	13q12	12q12	13q12
Isoforma de membrana (ORF)	3042 bp	3042 bp	3036 bp
Isoforma secretada (ORF)	1650 bp	desconeguda	1647 bp
Tamany isoforma membrana	1014 aminoàcids	1014 aminoàcids	1012 aminoàcids
Tamany isoforma secretada	550 aminoàcids	desconegut	549 aminoàcids

ORF: Open reading frame o marc de lectura

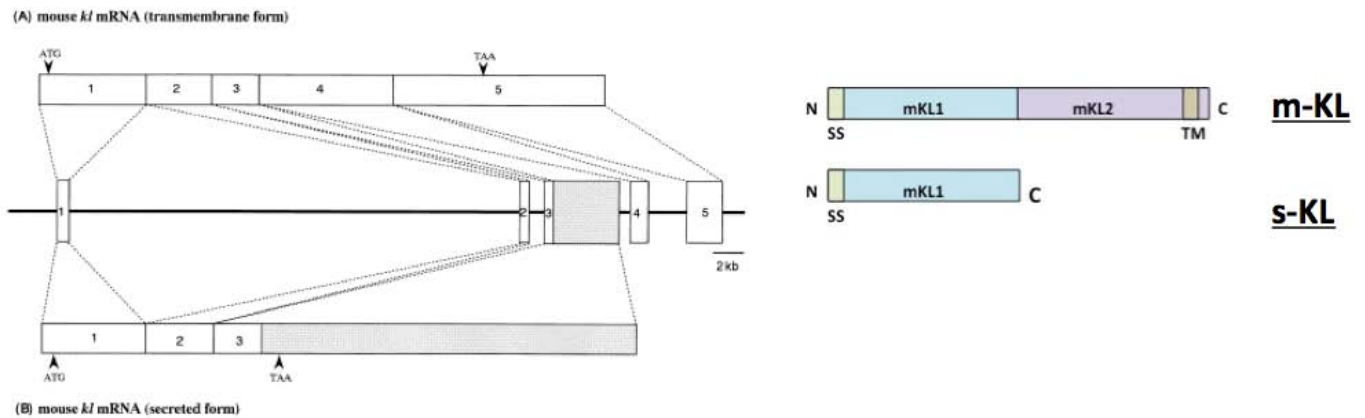


Figura 1.16- Esquema dels dos transcrits del gen *Klotho* i les proteïnes generades. 2 transcrits de *klotho*, el secretat i el transmembrana. El producte proteic més curt (s-KL) conté només el domini KL1 i és alliberat de la cèl·lula. L'altre producte, m-KL codifica una proteïna transmembrana. (Adaptat de Kuroo-o et al. 1997) [51].

En determinades circumstàncies, el domini extracel·lular de la forma transmembrana pot ser processat i alliberat de la superfície cel·lular per les metal·lo proteases ADAM10 i ADAM17 donant lloc a una altra forma soluble de *klotho* amb un tamany d'uns 130 kDa que sí que s'ha detectat en orina, sèrum i líquid cerebrospinal [276]. A més, s'ha demostrat que la insulina estimula aquest processament [277]. Així doncs, aquesta isoforma processada també soluble de *klotho*, formada pels dominis KL1 i KL2, podria jugar un paper important com a hormona, donant lloc a funcions pleiotròpiques en diferents òrgans ja que diversos treballs indiquen que presenta bioactivitat, essent capaç de regular diferents vies de senyalització cel·lular [252, 277, 278].

Un punt que fins ara, havia esdevingut força contradictori és si aquesta isoforma formada pel domini extracel·lular de *klotho* pateix un segon processament un cop alliberada de la superfície cel·lular. En alguns dels primers treballs sobre aquesta proteïna es va descriure que entre els dominis KL1 i KL2 existia una possible diana de proteòlisis formada per quatre aminoàcids bàsics seguits (*Lys-Lys-Arg-Lys*), la qual cosa feia pensar que la proteòlisis en aquest punt generava una isoforma soluble formada pel domini KL1 [51]. No obstant, com que estudis posteriors únicament detectaven el domini extracel·lular sencer (KL1+KL2) de 130kDa en compartiments extracel·lulars, durant un temps aquesta hipòtesis va romandre oblidada establint una relació directa entre forma secretada de *klotho* i el domini extracel·lular sencer. Però dos treballs recents, que es centren en identificar els llocs de tall que generen les formes solubles de *klotho* i els enzims responsables de fer-ho, indiquen que, tal i com apuntaven els primers treballs, existeix un segon lloc de reconeixement per a les proteases

ADAM 10 i 17 situat entre els dominis KL1 i KL2, que generaria dos isoformes noves també solubles i diferents entre elles. Una formada únicament pel domini KL1 (igual que la que es genera a partir de l'splicing alternatiu, però sense la cua d'aminoàcids específica), i l'altra formada pel domini KL2 amb funcions desconegudes. És més, s'ha vist que aquest segon tall seria dependent del primer (en el lloc de reconeixement pròxim a la regió transmembrana) i tindria lloc de manera simultània, ja que els dos fragments de 130 i 70 kDa apareixen en el mateix moment en el medi després d'uns experiments de *pulse-chase* [279],[277].

Així doncs, malgrat no es coneix amb certesa el mecanisme de processament de la proteïna klotho, és raonable suposar que en la majoria de funcions de klotho són dutes a terme per una o més isoformes solubles (a les quals els manca el domini transmembrana) que són alliberades als fluids corporals des d'on són capaces d'arribar i distribuir-se per tots el cos. Aquesta funció endocrina per tant, podria ser duta a terme per 4 isoformes diferents de la proteïna: el domini extracel·lular proteolitzat (KL1+KL2), el domini KL1 sol que pot generar-se a partir de l'splicing alternatiu (conté una cua d'aminoàcids extra) i que és secretat directament, o a partir d'un segon processament proteolític del domini KL1+KL2 (en aquest cas, sense cua d'aminoàcids), i per últim pel domini KL2, que tot i que no s'ha detectat mai, ni ha estat objecte d'estudi en cap treball, també hauria de produir-se en cas de que existeixi aquest segon processament proteolític.

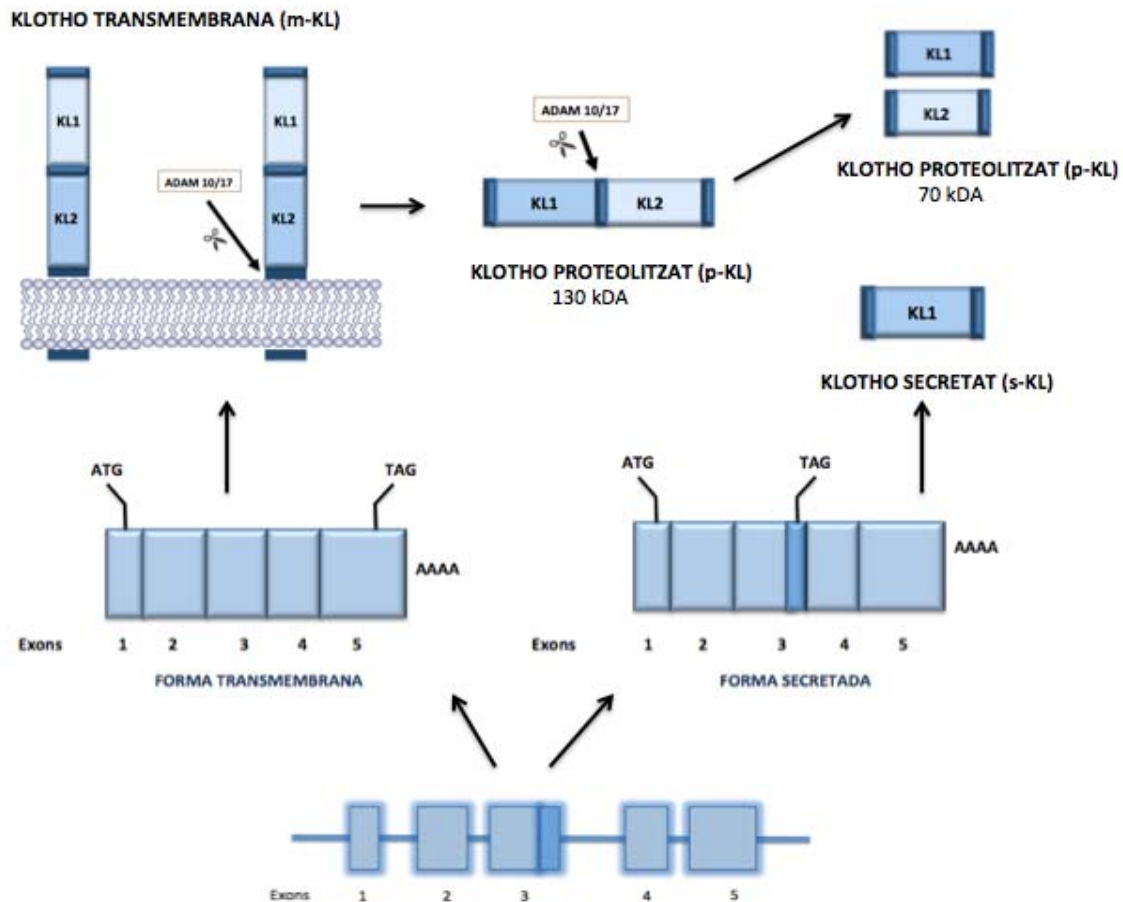


Figura 1.17- La forma transmembrana de klotho (m-KL) prové del gen klotho. La forma secretada prové de l'splicing alternatiu (s-KL). El lloc intern donador per a l'splicing es troba en l'exó 3 del gen klotho. El transcrit alternatiu resultant conté una inserció de 50 bp després de l'exó 3 amb la introducció en pauta d'un codó stop. D'altra banda, el domini extracel·lular de klotho que conté les repeticions internes KL1 i KL2 es talla i alliberat al torrent sanguini per secretasses. Per tant, en la circulació sanguínia hi ha dues formes de klotho, una derivada del tall de la forma transmembrana i l'altre que és directament secretat provinent de l'splicing alternatiu. (Adaptat de *Chang Hu et al.* 2013) [280].

3.4- Funcions de klotho en el metabolisme mineral

Diversos estudis han demostrat que la forma transmembrana i les possibles formes solubles de klotho tenen funcions diferents [277, 278, 281-283]. La forma transmembrana de klotho forma complexos binaris constitutius amb varis receptors FGF (*fibroblast-growth factor*) i actua com a co-receptor obligat del factor FGF-23, una hormona derivada de l'ós que té com a funció principal regular la concentració de fòsfor en plasma a través de la seva excreció a l'orina [284] i la producció de la forma activa de la vitamina D o calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) en ronyó, la qual té una funció destacada

en el metabolisme del calci [285]. D'aquesta manera klotho exerceix un rol important en la via de senyalització de FGF-23 ja que s'encarrega de regular la homeòstasi del metabolisme iònic.

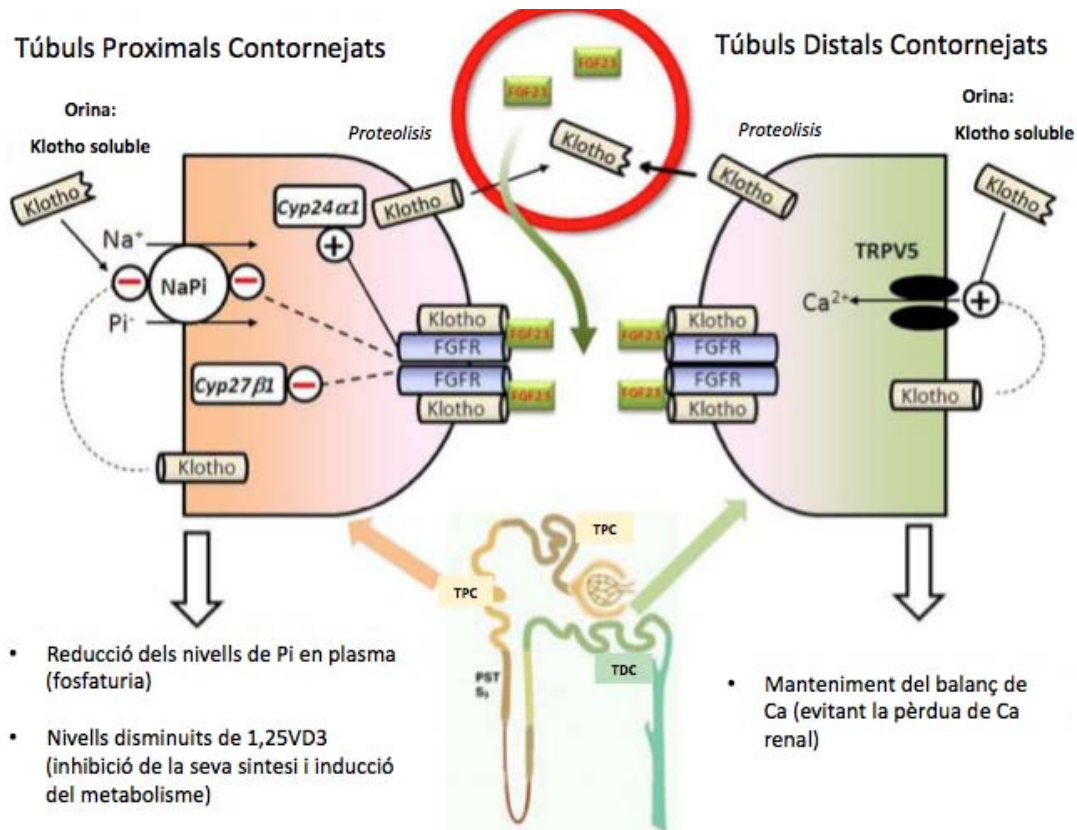


Figura 1.18- Paper fisiològic de klotho sobre els canals i transportadors i sobre el metabolisme de la vitamina D en ronyó. Klotho s'expressa principalment en els túbuls distals convolutats (DCT), i en menor mesura en els túbuls proximals convolutats (PCT). En PCT, m-KL actua com a coreceptor de FGFRs i transduïx la senyalització via FGF23 en la inhibició dels cotransportadors NaPi, la inhibició de CYP27B1 i l'estimulació de CYP24A1. En DCT, m-KL també actua com a coreceptor de FGFRs i induïx la transducció del senyal via FGF-23. Es desconeix si alguns dels intermediaris són alliberats des de DCT i els possibles efectes paracrins d'aquests sobre PCT. Un possible candidat a intermediari és klotho, que s'alliberaria de DCT per actuar en PCT. També es desconeix si m-KL al costat luminal és capaç de regular de manera autocrina i directament TRPV5 en DCT. [Ca: calci; DCT: túbuls distals contornejats; FGF-23: factor de creixement de fibroblasts 23; FGFR: receptor d'FGF; cotransportador NaPi: cotransportador dependent de sodi-fosfat; PCT: túbuls contornejats proximals; Pi: fosfat; TRPV5: receptor de potencial iònic transitori 5; 1,25 VD₃: 1,25-(OH)₂ vitamina D₃; línia discontinua: accions suposades] (Adaptat de Chang Hu et al. 2013) [280].

Tal i com es mostra en la *Figura 1.18*, el complex FGF-23-klotho-FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) exerceix el seu control sobre els nivells d'excreció de fosfat i producció de 1,25(OH)₂D₃ regulant l'expressió del cotransportador de sodi-potassi (*NaPi-IIa*) i els enzims encarregats de metabolitzar la vitamina D, *25-hidroxivitamin D 1α-hydroxylase* (CYP27B1) que participa en la

producció de vitamina D₃ i *24-hydroxylase* (CYP24A1), que s'encarrega de catalitzar la degradació de la vitamina D₃. [286-288]. Així doncs, es necessària la unió entre la forma de membrana de klotho i el factor FGF-23 perquè aquest últim pugui activar la senyalització a través de FGFR. D'acord amb aquesta hipòtesi s'ha pogut comprovar que el ratolí deficient per FGF-23 (*FGF-23*^{-/-}) desenvolupa un fenotip molt similar al del ratolí deficient per a klotho [59]. Ambdós models presenten una reabsorció de fosfat renal anormal i un increment en la biosíntesi de vitamina D₃, que dóna lloc a un increment en els nivells sèrics de fosfat, calcitrol i calci [289, 290]. Mentre que en animals *wild-type* l'administració de vitamina D₃ indueix canvis en l'expressió gènica, entre ells un increment de CYP24A1 i el receptor de vitamina D (VDR) i una disminució de CYP27B1, aquests canvis no s'observen en el model murí deficient per a klotho. És més, el fenotip d'aquest model és millorat gràcies a la restricció de fosfat i vitamina D₃, acció que també permet augmentar l'esperança de vida [291] ja que m-KL actua com a regulador negatiu en el *feedback* de producció de vitamina D₃ disminuint l'expressió de l'enzim CYP27B1 [285, 292].

D'altra banda, en el model deficient per a klotho, les concentracions en plasma o sèrum d'FGF-23 son entre 150-2000 vegades superiors a les observades en animals *wild-type*. Tot i així, sembla ser que FGF-23 no funciona correctament perquè malgrat aquesta hormona s'encarrega de promoure l'excreció de fòsfor, la seva concentració és significativament superior a la dels animals *wild-type* [293]. La reabsorció renal de fosfat està regulada pels co-transportadors de sodi dependents de fòsfor (Pi) tipus IIa i IIc (NaPi-IIa i NaPi-IIc). L'expressió de NaPi-IIa està regulada per la hormona paratiroide (PTH), 1,25(OH)₂D₃ i FGF-23, mentre que l'expressió de NaPi-IIc ho està només per 1,25(OH)₂D₃. La senyalització de FGF-23 a través de la proteïna klotho sembla ser la responsable de regular l'activitat dels cotransportadors NaPi ja que s'ha observat un increment en l'activitat d'aquests transportadors en els models deficients per a klotho i FGF-23 que provoquen una major reabsorció de fòsfor en ronyó, facilitant també la calcificació. La hiperfosfatèmia observada és causada per una hipervitaminosis D i una major expressió/activitat renal dels cotransportadors de sodi i fosfat [294, 295].

En conjunt, aquestes observacions indicarien que un metabolisme anormal de la vitamina D, el calci i el fòsfor podrien ser, en gran mesura, responsables dels fenotips d'envelliment prematur observats en el ratolí *kl-/kl-*. Donat que el manteniment d'un balanç iònic fisiològic en el cos té una importància biològica clau per controlar el procés d'envelliment en mamífers [296], la manipulació de la via de senyalització klotho-FGF-23 podria ser una bona diana terapèutica per tractar malalties associades a un metabolisme anormal dels ions minerals [297].

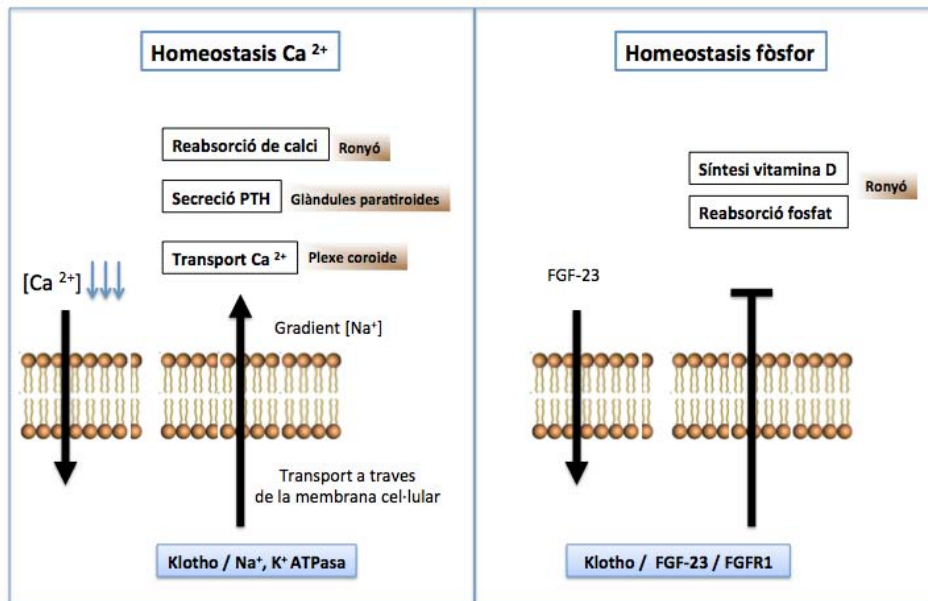


Figura 1.19- Paper de klotho en la regulació del metabolisme mineral.

3.5- Funcions de les formes solubles de klotho

Com ja s'ha descrit anteriorment, les formes solubles de la proteïna klotho semblen actuar com a factors endocrins. Aquesta afirmació se sustenta en els següents fets: **(i)** La parabiosis (connexió quirúrgica entre dos animals per permetre l'intercanvi de factors humorals) entre el ratolí klotho heterozigot i un ratolí *wild-type* dona lloc a una recuperació completa de la funció endotelial en el primer [298]; **(ii)** El domini extracel·lular de klotho es detecta en orina, sang i fluid cerebroespinal [276]; i **(iii)** En rates OLETF, un model animal de diabetis tipus II amb obesitat, l'expressió ectòpica del gen klotho en fetge, aminora el dany renal induït per angiotensina II [299].

Així, la proteïna klotho pot entrar en el sistema circulatori a través de dos mecanismes principals: **(a)** el gen klotho pot donar lloc a una forma secretada a partir d'un splicing alternatiu del seu mRNA [274, 275] i **(b)** escissió proteolítica de la forma transmembrana per part de les proteases ADAM 10 i 17 que poden escindir el domini extracel·lular de klotho per generar dos isoformes de klotho de 130 i 70 kDa respectivament [277]. No obstant, es desconeix en quin percentatge es dona cadascun d'aquests esdeveniments.

D'altra banda, les formes solubles de klotho generen els seus efectes sistèmics a través de **(i)** la unió amb el seu receptor, fins ara desconegut, en la superfície cel·lular o bé **(ii)** actuant com un enzim

capaç de regular l'activitat biològica de diverses glicoproteïnes en la superfície cel·lular o receptors en múltiples teixits [60, 300-304].

D'entre les seves funcions principals, fins ara descrites, en destaquen:

3.5.1- Inhibició de la senyalització mediada per insulina i IGF-1

El ratolí deficient per a klotho és hipoglicèmic i extremadament sensible a la insulina [305]. En canvi, el ratolí transgènic que sobreexpressa klotho és moderadament resistent a la insulina i a IGF-1, tot i que manté nivells normals de glucosa en sang en dejú i no és diabètic [54]. Aquestes observacions duen a pensar que klotho és capaç de disminuir la senyalització mediada per insulina i IGF-1. Així doncs, aquesta activitat inhibidora atribuïda a klotho esdevindria fonamental com a proteïna reguladora de l'aparició de patologies associades a l'edat, ja que se sap que la inhibició moderada d'aquesta via és un dels mecanismes evolutivament conservat per suprimir l'envelliment [22]. Tot i així, el mecanisme pel qual klotho soluble inhibeix la senyalització d'insulina/IGF-1 encara està per determinar. Estudis recents suggereixen que klotho podria tenir un efecte de retroalimentació negativa sobre l'acció de la insulina ja que aquesta hormona estimula l'alliberació del domini extracel·lular de klotho de la membrana plasmàtica, i alhora, aquest fragment alliberat és capaç de suprimir-ne la seva senyalització [277].

3.5.2- Supressió de l'estrès oxidatiu.

La capacitat de klotho per regular la via de senyalització mediada per insulina i IGF-1 pot implicar també un increment en la resistència a l'estrès oxidatiu a nivell cel·lular i de l'organisme en mamífers [253]. Així doncs, l'activació dels factors de transcripció FOXO (FOXO1, FOXO3a i FOXO4) juga un paper crític en la supressió de l'envelliment causada per la inhibició de la via d'insulina/IGF-1. L'activació d'aquesta via de senyalització implica la fosforilació i activació de la serina-treonina quinasa Akt, que a la vegada s'encarrega de fosforilar FOXOs. Els factors FOXO fosforilats són exclosos del nucli i esdevenen inactius [306]. Els gens diana la expressió dels quals es induïda per els factors FOXO inclouen enzims antioxidants com la catalasa i la superòxid dismutassa depenent de manganès (SOD2) [307]. L'increment en l'expressió d'aquests enzims facilita l'eliminació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) i disminueix l'estrès oxidatiu.

El ratolí transgènic que sobreexpressa klotho presenta una major expressió de SOD2 en múscul, baixos nivells de fosforilació dels factors FOXO i un menor estrès oxidatiu que s'evidencia per una menor quantitat de 8-OHdG en orina, un marcador biològic *in vivo* de dany oxidatiu a DNA [56]. A més, aquest ratolí és capaç de sobreviure després de la injecció de quantitats letals de paraquat, un herbicida amb activitat oxidant molt potent que genera grans quantitats de ROS, indicant que la sobreexpressió de klotho indueix resistència a l'estrès oxidatiu [56].

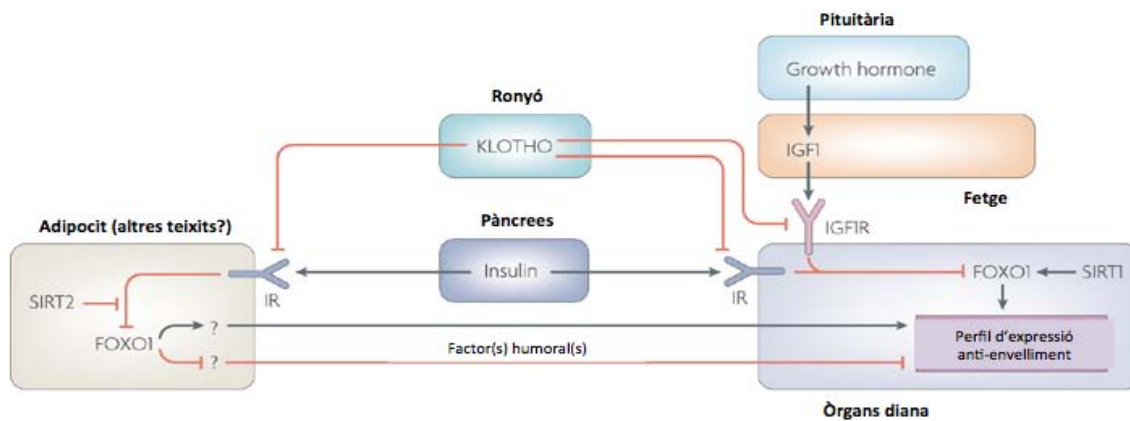


Figura 1.20- La inhibició de la senyalització mediada per insulina/IGF-1 promou la longevitat. S'especula que això té lloc a través de la fosforilació dels factors de transcripció FOXO1. La sobreexpressió de klotho inhibeix també aquestes vies i promou la longevitat. Es desconeix si klotho inhibeix l'envelliment directament en tots els teixits diana o si actua indirectament, per exemple, inhibint la senyalització mediada per insulina en teixit adipós. (Adaptat de Russell et al. 2007) [308].

3.5.3- Regulació de la producció d'òxid nítric i protecció contra la disfunció endotelial

L'òxid nítric (NO) juga un paper important en la regulació del to vascular. La vasodilatació dependent de l'endoteli de l'aorta i arterioles en resposta a l'acetilcolina es troba atenuada en el model deficient per a klotho, indicant que la deficiència de klotho causa una reducció en la síntesi de NO en les cèl·lules endotelials vasculares [298]. De manera consistent, el ratolí *kl-/kl-* presenta problemes d'angiogènesis i vasculogènesis, processos dependents del NO derivat de l'endoteli [309]. De fet, la síntesi sistèmica de NO, determinada a través de l'excreció en orina dels metabòlits de NO també es veu reduïda en aquest model [298]. Com que aquestes alteracions s'observen també en menor mesura en el ratolí klotho heterozigot malgrat presentar nivells normals de fosfat en sang i de vitamina D, es descarta que aquests defectes en la producció de NO siguin un efecte secundari de la hiperfosfatèmia o la hipervitaminosi D.

D'altra banda, s'ha demostrat que l'expressió *in vivo* del domini extracel·lular de klotho per transferència gènica utilitzant vectors adenovirals en el model de rata OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*), un model experimental de malaltia arterioscleròtica, permet millorar la disfunció endotelial, augmentar la producció de NO i reduir l'elevada pressió sanguínia [253]. El mecanisme pel qual klotho és capaç de regular la síntesi de NO encara no es coneix, tot i que sembla ser que hi estaria implicada la capacitat per inhibir la producció ROS.

3.5.4- Regulació de l'activitat dels canals iònics de calci

El domini extracel·lular de klotho actua com un potent activador dels canals iònics TRPV5 i TRPV6 [60]. TRPV5 i TRPV6 són canals de calci que s'expressen predominantment en els túbuls renals i les cèl·lules epitelials duodenals, respectivament, i s'encarreguen de regular l'entrada de calci en l'absorció transcel·lular en ronyó i intestí. Quan s'afegeix en el medi de cultiu de cèl·lules HEK293 (que expressen TRPV5) el domini extracel·lular de klotho es produeix un augment en l'entrada de Ca^{2+} i en la quantitat de canals TRPV5 en la superfície cel·lular. Aquesta retenció augmentada de TRPV5 en la membrana s'ha associat a la modificació de les cadenes de sucre de TRPV5 gracies a l'activitat β -glucuronidasa de klotho, capaç d'hidrolitzar els N-glicans presents en la superfície extracel·lular del receptor. Tot i així, donat que l'activitat β -glucuronidasa presentada per klotho és extremadament baixa [310] i que l'àcid glucurònic és absent en les glicoproteïnes de mamífers, sembla poc probable que aquest sigui el mecanisme d'acció. Alternativament, s'ha demostrat que el domini extracel·lular de klotho és capaç d'activar els canals TRPV5 a través de l'eliminació dels residus d'àcid siàlic terminals de les seves cadenes de glicans. L'eliminació d'àcid siàlic exposa el disacàrid galactosa-N-acetylglucosamina, un lligand per a galactina-1. Galactina-1 s'uneix a TRPV5 a través d'aquest nou disacàrid ara exposat i permet l'acumulació de TRPV5 en la membrana plasmàtica, evitant-ne l'endocitosi [300] (*Figura 1.21*). Aquesta activitat de klotho, representa un nou mecanisme de regulació de l'activitat de les glicoproteïnes de la superfície cel·lular, que podria tenir efectes també en l'activitat d'altres canals iònics i probablement contribueix al correcte manteniment del balanç de calci. Alteracions en l'homeòstasi del calci poden tenir conseqüències greus que no només s'observen en el ratolí *kl-/kl-* sinó també en ratolins normals d'edat avançada.

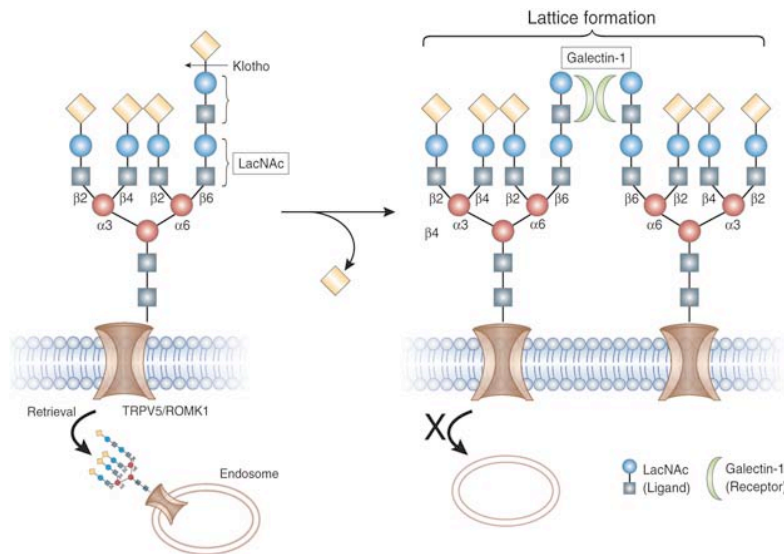


Figura 1.21- Mecanismes pels quals klotho soluble incrementa el nombre de canals iònics en la superfície cel·lular (veure text per detalls). LacNAc (N-acetilactosamina) és un lligand per a la galactina-1. L'eliminació dels àcids siàlics de l'N-glicà dels canals TRPV5 i ROMK per part de klotho permet a LacNAc unir-se a galactina-1, evitant l'endocitosis dels canals. (Huang *et al.* 2010) [301].

3.5.5- Supressió de la senyalització mediada per Wnt

El domini extracel·lular de klotho és capaç d'unir-se a múltiples lligands de Wnt i inhibeix la seva capacitat per activar la senyalització d'aquesta via [311]. Malgrat Wnt és un dels factors secretats essencial per la proliferació i el manteniment de les cèl·lules mare o *stem cells*, l'estimulació crònica d'aquesta via de senyalització pot donar lloc a una ràpida depleció d'aquesta població de cèl·lules mare [312]. Com que la disfunció de cèl·lules mare pot contribuir potencialment al procés d'envelliment, la capacitat de klotho per inhibir la senyalització mediada per Wnt podria explicar diversos fenotips d'envelliment accelerat en el ratolí *kl-/kl-*. Per exemple, en aquest model les alteracions en la pell van acompanyades d'una reducció de cèl·lules mare epidermals en els fol·licles pilosos les quals presenten un augment de l'activitat Wnt i una major expressió de marcadors de senescència endògens [311]. Aquest fet, suggereix que la continua activació de la via Wnt causada per la deficiència de klotho pot conduir a la senescència de les *stem cells*.

A més, recentment també s'ha pogut confirmar la correlació entre els nivells de klotho i càncer en humans. Noves evidències indicarien que klotho presenta una activitat supressora de tumors i un dels mecanismes responsables seria la capacitat d'actuar com antagonista de Wnt, una via de senyalització important en alguns càncers com la metastàsis de melanoma i en el carcinoma de cèrvix

[271, 272]. Donat que durant els processos carcinògens es produeix una reducció dràstica de l'expressió de klotho, degut al silenciament epigenètic, es perd la seva capacitat anti-tumoral [272].

3.6- Paper de klotho en SNC

3.6.1-Expressió de klotho en SNC

En SNC klotho s'expressa en plexe coroides i en neurones, especialment en hipocamp, glàndula pituïtària i les cèl·lules de Purkinge en cerebel així com també en oligodendròcits [313, 314]. Klotho exerceix una àmplia varietat de funcions en cervell que inclou funcions antioxidants i antiinflamatòries, entre elles és capaç de disminuir la parainflamació associada a l'envelliment i millorar l'eficiència de la resposta a l'estrès en reticle endoplasmàtic (ER) [248, 313]. També s'encarrega de modular el metabolisme del calci en SNC, en part, per mediació del transport de calci a través de la barrera hematoencefàlica [315] i per regulació dels receptors TRVP implicats en la formació de CSF [60]. A més, el domini extracel·lular de klotho (p-KL) és secretat directament a CSF [276], el qual esdevé la seva via de comunicació per dur a terme les seves funcions biològiques en cervell. De fet, la seva concentració s'ha trobat disminuïda en CSF en pacients d'Alzheimer [281].

A diferència d'altres òrgans però, s'ha estudiat molt poc els efectes de klotho i les vies i mecanismes de senyalització afectats en SNC. Tot i així, tenint en compte la distribució de la seva expressió, klotho es posiciona com una proteïna capaç d'influenciar una gran varietat de estructures i funcions en SNC durant el desenvolupament i l'envelliment. L'anàlisi estructural del cervell del ratolí deficient per a klotho indica que existeixen canvis importants en aquest model en el qual les neurones i cèl·lules del SNC presenten símptomes evidents de degeneració o envelliment. Entre aquestes alteracions destaquen una disminució del nombre de cèl·lules de Purkinge en cerebel i neurodegeneració hipocampal amb reducció de vesícules sinàptiques, així com pertorbacions en el transport axonal. A més, els orgànuls cel·lulars neuronals presenten una morfologia desordenada [313]. Així, es pot concloure que les alteracions neuronals en SNC en el ratolí deficient per a klotho són força similars a les observades en animals vells. No obstant, no s'observen altres manifestacions visibles associades a l'envelliment com ara plaques senils ni dipòsits amiloides.

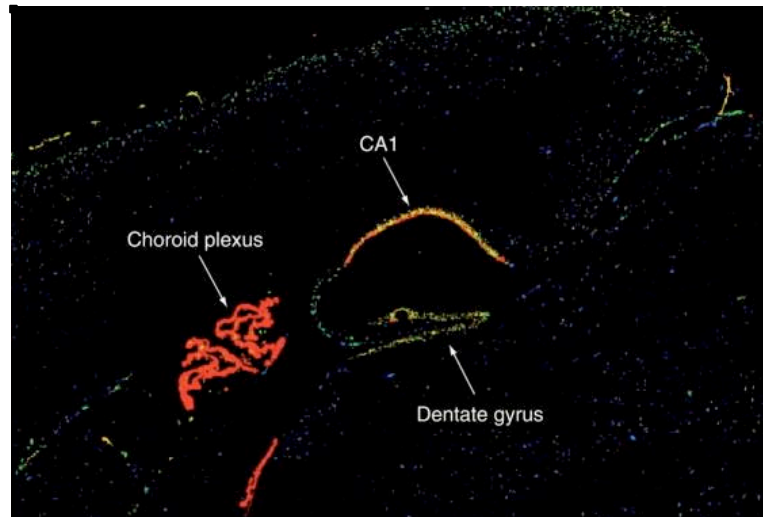


Figura 1.22- Visió sagital de la distribució de l'mRNA de klotho per hibridació *in situ*. Els nivells d'expressió més alts corresponen al plexe coroides, seguit de les neurones hipocampals, especialment les del camp CA1. (Allen Institute for Brain Science) [316].

3.6.2- Klotho : un factor neuroprotector contra l'estrès oxidatiu

Estudis de comportament fets en el ratolí deficient per a klotho indiquen que aquest model presenta dèficits de retenció de memòria a les 7 setmanes d'edat quan es compara amb ratolins *wild-type*, probablement degut a un augment en l'estrès oxidatiu en cervell que es detectable abans que es manifestin els problemes cognitius [313]. El balanç entre la producció de ROS i les defenses antioxidants determinen el grau d'estrès oxidatiu. En l'hipocamp i el còrtex cerebral del mutant de klotho, s'observa un increment dels marcadors de dany oxidatiu de DNA, lípids i proteïnes que correlaciona amb l'edat (des de les 5 a les 8 setmanes) així com també de l'activitat dels enzims antioxidants SOD1 i GPx, mentre que en ratolins *wild-type* els nivells es mantenen constants. D'altra banda, també es produeix un increment en l'expressió de proteïnes pro-apoptòtiques (*Bax*) i una disminució de les proteïnes que promouen la supervivència cel·lular (*Bcl-2*, *Bcl-xL*). L'administració de α -tocoferol, una potent droga amb propietats antioxidants, permet restaurar aquests dèficits en memòria, l'acumulació de productes lipídics oxidats i a l'hora disminuir el nombre de cèl·lules apoptòtiques en el model deficient per a klotho [317]. Així doncs, sembla ser que en gran mesura les alteracions cognitives d'aquest model poden respondre a un increment en la carrega total d'estrès oxidatiu en SNC [313].

Els efectes antioxidants de klotho en diferents tipus cel·lulars havien estat descrits anteriorment, però treballs recents suggereixen també un paper anti-inflamatori i anti-oxidant de klotho en cervell. Per exemple, l'expressió de klotho es veu disminuïda en cèl·lules PC12 exposades a glutamat [318] i

en mostres hipocampals de pacients amb epilèpsia [319]. Altres estudis indiquen la importància de klotho en la regulació de l'estrès en reticle endoplasmàtic [320] i en el paper neuroprotector del compost Ligustilide, en un model d'AD [321].

In vitro, s'ha pogut comprovar que klotho té un paper neuroprotector davant l'estrès oxidatiu induït per glutamat i la forma oligomèrica A β 1-42. L'adició exògena del domini extracel·lular de klotho en cultius primaris de neurones hipocampals protegeix aquestes cèl·lules inhibint l'acumulació de ROS i la mort cel·lular. El mateix efecte s'ha observat utilitzant neurones hipocampals del ratolí transgènic que sobreexpressa klotho. Aquest estudi revela que klotho promou la inducció de diferents membres del sistema *tioredoxina/peroxiredoxina* (Trx/Prx), un nou complex enzimàtic amb propietats antioxidants de gran importància en el context de la fisiologia i patologia neuronal [303].

En conjunt, aquestes dades suggereixen que klotho podria estar implicat en la regulació de les defenses antioxidants en cervell prevenint l'acumulació de ROS i per tant disminuint el dany neuronal causat per l'estrès oxidatiu, un dels mecanismes proposats per explicar la disfunció cognitiva associada a l'edat i a algunes malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer, Parkinson, Huntington i Esclerosi Lateral Amiotròfia (ALS).

3.6.3- Klotho : un neuromodulador en les sinapsis

El ratolí deficient per a klotho també presenta alteracions en el sistema colinèrgic neuronal en hipocamp, evidenciat per una disminució significativa en l'expressió del receptor muscarínic d'acetilcolina (mAChR) M1, en els nivells d'acetilcolina (ACh) i en l'activitat i expressió de l'enzim acetilcolina transferasa (ChAT) així com per un augment en l'expressió i activitat de l'enzim acetilcolina esterasa (AChE). A més, la deficiència de klotho condueix a una menor expressió de p-ERK, p-CREB i BDNF i de la potenciació a llarg termini (LTP) dependent de NMDAR. Es creu que una desregulació en la via de senyalització mediada per JAK2/STAT3 podria ser la causa subjacent de totes aquestes alteracions. Per tant, és possible que l'expressió de klotho sigui important per mantenir la funció neuronal colinèrgica durant l'envelliment [322] i per evitar l'aparició de malalties neurodegeneratives i desordres psiquiàtrics, ja que alteracions en els nivells d'ACh o en l'expressió i funció dels seus receptors, en determinades àrees del sistema nerviós, es troben associades a diferents patologies com l'Alzheimer, el Parkinson o l'esquizofrènia [323].

Paral·lelament, s'ha descrit que en aquest model el sistema dopaminèrgic mesoencefàlic presenta alteracions importants. En ratolins *kl-/kl-* el nombre de neurones TH-positives així com el contingut

en dopamina en l'estriat són significativament inferiors que en ratolins *wild-type* i aquest procés es veu afectat gradualment per l'edat [324]. Aquesta degeneració de neurones dopaminèrgiques és una de les principals característiques de la malaltia de Parkinson, i se sap que també té lloc durant el procés normal d'envelliment [325, 326]. Així doncs, aquesta característica, juntament amb la degeneració de les cèl·lules cerebelars de Purkinge, podria contribuir a les alteracions motores descrites en aquest model. Un punt a destacar és que en els estudis amb el model deficient per a *klotho*, aquest fenomen de degeneració selectiva de neurones dopaminèrgiques fou rescatat per una dieta deficient en vitamina D, indicant que un increment anormal en la biosíntesi de la forma activa de la vitamina D per la deficiència de *klotho* pot induir la degeneració de les neurones dopaminèrgiques [324]. Aquests resultats indicarien que una correcta regulació dels nivells de vitamina D és essencial per al manteniment de les neurones dopaminèrgiques i que és probable que aquesta població de neurones esdevinguin vulnerables als nivells excessius de vitamina D en el model deficient per a *klotho*.

A més, *klotho* també s'encarrega d'augmentar l'expressió dels transportadors d'aminoàcids excitatoris EAAT3 i EAAT4. En cervell, EAAT3 contribueix al transport d'aminoàcids excitatoris a través de la barrera hematoencefàlica [327] i de l'eliminació d'aquests últims de la fenedura sinàptica a través de la captació a l'interior de neurones i cèl·lules glials [328, 329]. De manera similar, EAAT4 s'encarrega del transport d'aminoàcids excitatoris a l'interior de les cèl·lules de Purkinge en cerebel [330]. S'ha descrit que alteracions en la funció d'aquests dos transportadors poden conduir al desenvolupament de determinades patologies com l'esquizofrènia, l'epilèpsia o la depressió [331-333].

Per tant, tenint en compte totes aquestes dades, *klotho* podria ser una nova diana terapèutica interessant pel tractament d'aquestes patologies.

3.6.4- Klotho: un factor mielinitzant

Malgrat la majoria d'estudis convencionals sobre els canvis que es produeixen en cervell durant l'envelliment s'han centrat en l'estudi de la substància gris, com a font principal de la disfunció cognitiva, existeix una certa evidència que els canvis en la substància blanca podrien ser fins i tot més rellevants en els dèficits cognitius. Dins de l'estudi dels dèficits cognitius associats a l'edat en micos *Rhesus* (*Rhesus monkey*), es va poder comprovar per microarrays que l'expressió del gen *klotho* es veia significativament reduïda en la substància blanca del SNC [240]. Donat que durant l'envelliment,

en substància blanca també s'han descrit dèficits estructurals i bioquímics en la mielina [334] és possible pensar en una connexió entre l'expressió de *klotho* i la mielinització. Estudis posteriors, centrats en l'efecte de *klotho* sobre els oligodendròcits, les cèl·lules mielinitzants en SNC, han permès establir que *klotho* exerceix un efecte important en la maduració d'aquestes cèl·lules, i per tant, en la mielinització. *Klotho* indueix l'expressió de MBP, MAG, PLP i OSP/caludin11, totes elles proteïnes principals de la mielina i indueix la maduració de les cèl·lules progenitores d'oligodendròcits (OPC) *in vitro*[335].

A més, *in vivo*, el ratolí deficient per a *klotho* presenta una severa hipomielinització del nervi òptic i el cos callós [335]. Els defectes en la mielina associats a la pèrdua d'expressió de *klotho* suggereixen que una baixa expressió de *klotho* podria donar lloc a una baixa velocitat de propagació dels potencials d'acció, de l'aturada de la conducció i una desestabilització de la comunicació neuronal coordinada tal i com s'observa en les malalties desmielinitzants com l'esclerosi múltiple o l'esquizofrènia [334].

3.6.5- *Klotho* : un potenciador cognitiu

En tres estudis independents realitzats en humans, es va poder descriure que els portadors de l'al·lel de *klotho* *KL-VS*, que incrementa la secreció de *klotho* *in vitro*, obtenien millors resultats en diversos tests cognitius on s'avaluava la funció executiva, el llenguatge, el processament visual-espacial i diferents tipus d'aprenentatge i memòria. De manera interessant, es va poder establir que aquest efecte era independent de l'edat del subjecte [336].

Paral·lelament, s'ha pogut demostrar que nivells elevats de *klotho* estan associats a una millor capacitat cognitiva en ratolins, independentment de l'edat i el sexe. Els ratolins que sobreexpressen *klotho*, tant joves (4-7 mesos) com més grans (10-12 mesos) obtenen millors resultats en el test de Morris Water Maze, on s'avalua l'aprenentatge i memòria espacial depenent d'hipocamp. A més, mostren una millor plasticitat sinàptica mesurada en forma d'LTP i un enriquiment sinàptic en hipocamp i còrtex prefrontal de GluN2B, una subunitat del receptor NMDA amb funcions clau en memòria i aprenentatge. La relació entre els nivells de GluN2B i la millora cognitiva en el ratolí que sobreexpressa *klotho* està d'acord amb resultats previs on s'havia demostrat que alteracions en els nivells d'aquesta proteïna donaven lloc a alteracions cognitives en ratolins. Així doncs, l'increment en els nivells de *klotho* fa que els ratolins responguin millor en les proves d'aprenentatge i memòria, possiblement degut a una major connexió sinàptica entre les cèl·lules nervioses del cervell [337].

Finalment, encara queden molts interrogants en relació al possible paper de klotho com a potenciador cognitiu. Tenint en compte que els processos cognitius són molt complexes, no es pot descartar que altres mecanismes d'acció inherents a una major expressió de klotho, incloent la regulació d'altres canals iònics, la via de la insulina, Wnt o FGF23 en cèl·lules neuronals o altres tipus cel·lulars en SNC puguin estar també implicats en aquest efecte pro-cognitiu. Un altre punt important que queda per determinar és quina o quines de les formes proteiques de klotho (transmembrana, secreta o proteolitzada) és responsable d'aquest increment dels nivells de GluN2B. Per últim, encara no se sap si un augment en els nivells de klotho en humans comportaria beneficis cognitius significatius. El que sembla evident és que els efectes pro-cognitius de klotho estarien clarament separats del seu paper en longevitat.

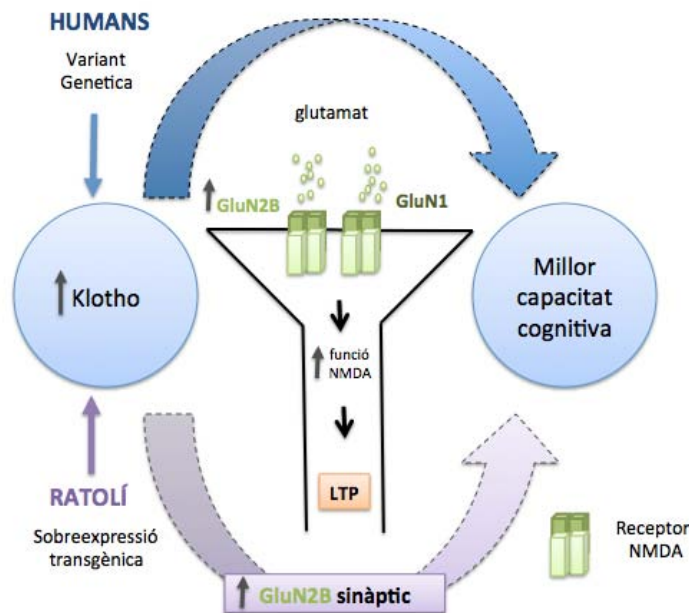


Figura 1.23- Un augment en els nivells de klotho (tant en humans com ratolins) permet augmentar els nivells de la subunitat Glu2NB en els receptors d'NMDA de les sinapsis i millorar la capacitat cognitiva dels individus. (Dubal et al. 2014) [337].

3.7- Klotho com a diana terapèutica en processos neurodegeneratius

L'edat és el factor de risc més important per al desenvolupament de malalties neurodegeneratives. No obstant, l'enllaç molecular entre l'envelliment i la neurodegeneració encara no es coneix del tot. De manera significativa, klotho s'ha demostrat capaç de mediar un increment en l'esperança de

vida en diferents espècies entre elles nemàtodes, ratolins i humans [55, 338-340]. Per tant, algunes de les propietats beneficioses de klotho en processos neurodegeneratius podrien estar lligades al seu paper clau en la regulació dels mecanismes anti-envelliment. D'aquesta manera, klotho emergeix com un potencial tractament capaç de modular els desordres neurodegeneratius associats a l'edat.

Tal i com s'ha comentat anteriorment klotho és capaç de suprimir l'estrès oxidatiu a través de diversos mecanismes entre els quals destaquen la inhibició de la via de senyalització d'insulina/IGF-1, la inducció de l'expressió d'enzims antioxidants així com la seva capacitat per induir els processos de mielinització i d'actuar sobre els sistema colinèrgic neuronal [341]. D'altra banda també s'ha descrit que klotho s'expressa àmpliament en diverses estructures de cervell i en diferents tipus cel·lulars com neurones i cèl·lules gials. Tenint en compte això i que a més, alts nivells d'estrès oxidatiu podrien ser una de les causes principals que propicien el desenvolupament de diverses malalties neurodegeneratives, klotho esdevé una possible diana terapèutica molt interessant pel tractament d'aquestes patologies, així com també d'alguns trastorns psiquiàtrics, com la depressió o l'esquizofrènia, en els quals els nivells de klotho es veuen alterats. Per exemple, estudis recents, han demostrat que la sobreexpressió de klotho podria tenir un efecte neuroprotector en models murins de malaltia de Parkinson ([341]. Sembla ser doncs, que la xarxa de senyalització en la qual participa klotho és un camp fèrtil pel desenvolupament de noves estratègies terapèutiques per lluitar contra les malalties neurodegeneratives.

3.7.1- Administració de klotho exògen

En estudis en animals l'administració de klotho de manera exògena pot donar-se de dos maneres diferents. D'una banda, és possible una expressió del gen, mitjançant l'ús de vectors de teràpia gènica amb tropisme per SNC. De l'altra, és possible administrar directament la proteïna recombinant a SNC. No obstant, quan es parla de possibles aplicacions terapèutiques en humans, aquests sistemes d'administració resulten molt invasius i per tant, seria útil realitzar estudis sobre la capacitat de les diferents isoformes de klotho per creuar la barrera hematoencefàlica, una dada que fins ara es desconeix i que permetria la seva administració per via sistèmica o oral.

3.7.2- Increment de l'expressió de klotho endògen

Un altra abordatge per aconseguir nivells d'expressió de klotho elevats és utilitzar compostos que tinguin com a efecte induir-ne la seva expressió. Per exemple, l'administració de ligustilide (LIG), un medicament pel tractament de l'Alzheimer, augmenta significativament l'expressió de klotho, a nivell d'mRNA i proteïna, en plexe coroides així com també en plasma [321].

En aquest apartat, és important anomenar la rapamicina, un medicament immunosupressor que s'utilitza per evitar el rebuig després dels transplantaments, que intervé en la homeòstasis del fòsfor, que indueix resistència a la insulina i que s'ha demostrat que allarga l'esperança de vida en models animals. En estudis *in vitro* s'ha comprovat que el tractament crònic amb rapamicina indueix l'expressió de klotho de forma dosi-dependent, degut a l'activació del complex mTORC2 [342], una via de senyalització de supervivència que contraresta la mort neuronal en models experimentals de neurodegeneració [343].

4. TERÀPIA GÈNICA I EINES DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA

La teràpia gènica és una estratègia que es basa en transferir material genètic (DNA o RNA) amb finalitats terapèutiques o preventives per tal d'aconseguir que les cèl·lules del pacient sintetitzin el producte codificat per aquest material genètic. Tot i que en la majoria de casos el producte serà una proteïna, també és possible que el producte sigui un RNA o un oligonucleòtid no codificant, amb la funció de regular l'expressió d'altres gens dins la cèl·lula.

Un fet comú en totes les estratègies de teràpia gènica és la necessitat de transferir el material genètic a les cèl·lules d'una manera eficient i segura. Els agents utilitzats per realitzar aquesta tasca són els anomenats vectors. Cal tenir en compte, que aquests vectors han de poder superar totes aquelles limitacions que s'oposen al procés de transgènesis. En primer lloc, el DNA o vector (vehicle) hauran d'interaccionar amb la membrana de la cèl·lula i haurà de ser capaç de penetrar en el seu interior. A continuació, aquest complex DNA-vector haurà de traspasar la membrana nuclear, evitar la degradació pels lisosomes i arribar al nucli de la cèl·lula on podrà expressar-se.

Tenint en compte la seva funció, el vector ideal hauria de reunir una sèrie de característiques. Per exemple, un bon vector de teràpia gènica ha de poder ser destinat amb el major grau d'especificitat cel·lular possible a un òrgan o teixit determinat. A més, ha de protegir el material genètic que transporta en el seu interior de les possibles agressions tant extracel·lulars com intracel·lulars, i facilitar el lliurament del gen terapèutic a la cèl·lula diana. L'expressió del gen ha de ser eficaç, i a ser possible, no ha de ser reconegut pel sistema immunitari ni generar una resposta inflamatòria. Finalment, i el més important, ha de ser segur pel pacient i per l'entorn.

En termes generals, els vectors de transferència gènica es poden classificar en dues grans categories: els vectors virals i els no virals (revisat a [344]). Entre els primers, els adenovirus (Ad), els lentivirus (LV) i els virus adenoassociats (AAV) han emergit en diferents estudis clínics i pre-clínic, com la opció més robusta i versàtil.

4.1. Vectors virals per transferència gènica

Actualment, els virus constitueixen la manera més eficaç de transferir gens terapèutics al interior de les cèl·lules diana, i són els vectors més utilitzats en teràpia gènica. Els virus estan formats per àcids nucleics (DNA o RNA) encapsidats en envoltures proteiques que els protegeixen i els hi permet entrar

a les cèl·lules. Un cop a l'interior de la cèl·lula, la informació continguda en l'àcid nucleic dirigeix la síntesi de proteïnes virals, aprofitant el sistema sintetitzador (ribosomes) i la producció energètica (mitocondris) de la cèl·lula hoste. D'aquesta manera es generen nous virus.

Els vectors virals s'obtenen per eliminació d'un o més gens indispensables per a la replicació de virus, i la seva substitució pel gen terapèutic. Així, el nou virus és defectiu perquè tot i que manté la seva capacitat per infectar les cèl·lules, és incapaç de multiplicar-se en elles. És a dir, un virus pot ser modificat estructuralment mitjançant diverses tècniques, donant lloc a un vector recombinant segur.

Alguns dels avantatges dels vectors virals són la seva gran eficàcia per transferir gens, ja que són capaços d'infectar una elevada proporció de les cèl·lules diana, que en alguns casos pot arribar a ser fins i tot del 100%. No obstant, el seu ús també presenta algunes limitacions importants, ja que inevitablement existeix un cert risc de que pugui produir-se l'activació d'algun virus patògen o oncogen degut a la possibilitat de recombinació gènica al introduir un gen forani en el genoma de l'hoste.

Un altre punt clau a considerar en la teràpia gènica *in vivo* és la reacció immunitària que l'organisme receptor posa en marxa, podent eliminar el material genètic a través de mort de les cèl·lules genèticament modificades. Per contrarestar aquesta reacció immune s'intenta eliminar el major nombre de gens vírics del vector i amb la finalitat d'obtenir una expressió més estable i duradora del gen terapèutic.

Sistema	Avantatges	Inconvenients
Retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> Integració estable. Fàcil maneig. No resposta immune. Transducció eficient. 	<ul style="list-style-type: none"> Títol baix. Possible mutació insercional. Durada curta d'expressió del transgèn <i>in vivo</i>. Només infecta cèl·lules en divisió.
Adenovirus	<ul style="list-style-type: none"> Infecta cèl·lules en repòs i en divisió. Episomals. Estables <i>in vivo</i>. Títols alts. 	<ul style="list-style-type: none"> Resposta immune e inflamatòria. Difícil direccionalitat.
Adenoassociats (AAV)	<ul style="list-style-type: none"> Infecta cèl·lules en repòs i en divisió. Poc immunogènics. Títols alts. No patògens en humans. 	<ul style="list-style-type: none"> Poc tamany del transgèn.
Herpes virus	<ul style="list-style-type: none"> Infecta cèl·lules en repòs. Episomal. 	<ul style="list-style-type: none"> Patogenicitat. Difícil maneig.

Taula 1.7- Sistemes de vectors virals de transferència gènica més utilitzats amb les seves principals característiques.

4.1.1- Vectors adenoassociats

Els virus adenoassociats (AAVs) són virus icosaèdrics i sense embolcall que pertanyen a la família dels *Parvovirus* i al gènere *Dependovirus*. Els membres d'aquest gènere requereixen d'un virus *helper*, com un adenovirus o un virus herpes, per facilitar una infecció i replicació productives. En absència del virus *helper*, els AAVs estableixen una infecció latent en la cèl·lula, ja sigui per integració específica en el genoma hoste o bé persistent en forma episomal. La càpsida original dels AAVs té un tamany aproximat de 22nm i encapsida una molècula de DNA lineal de cadena senzilla d'aproximadament 4.7 kb, de polaritat positiva o negativa [345]. Les regions de DNA terminal s'anomenen seqüències terminals invertides (ITR) palindròmiques, la qual cosa els permet plegar-se sobre elles mateixes per complementarietat de bases [346], formant una estructura secundària que proporciona un grup hidroxil 3' lliure per a l'inici de la replicació del DNA viral [347]. Aquest procés de replicació viral és dependent de l'activitat polimerasa de la cèl·lula hoste ja que els AAVs no codifiquen per la seva pròpia [348]. Aquestes ITRs són els únics elements actuant en *cis* requerits per a la replicació i l'encapsidament del genoma, i flanquegen els dos marcs de lectura oberts (ORFs) del genoma del virus. L'ORF 5', *Rep* (replication), codifica 4 proteïnes que participen en la replicació (Rep78, Rep68, Rep52 i Rep48). L'ORF 3', *Cap* (capsid) codifica, a través d'un splicing alternatiu les tres proteïnes estructurals víriques (VP1, VP2, VP3) que s'ensamblen a una ratio 1:1:10 respectivament, per formar una partícula AAV madura [349].

Els AAVs han guanyat popularitat ràpidament dins del camp de la teràpia gènica des de l'establiment del primer serotip utilitzat AAV2, l'any 1982 gràcies a algunes característiques que els fan únics com a vectors [350-352]. Aquests trets característics inclouen: **1)** la seva manca de patogenicitat i la seva baixa immunogenicitat, així com la seva estabilitat tèrmica, resistència a solvents i a canvis en la temperatura i el pH [353]; **2)** els vectors AAV només mantenen uns 300 nucleòtids de la seqüència viral en forma d'ITRs que no es transcriuen, fet que augmenta de manera important la seva seguretat per aplicacions clíniques en humans reduint el risc de recombinació amb el virus *wild-type*. És més, l'absència de seqüències virals codificants permet una major durada de l'expressió del gen ja que no hi ha productes gènics virals en la cèl·lula diana, el que disminueix el risc de provocar una resposta immune cel·lular; **3)** els vectors AAV presenten un ampli rang de tropisme d'hoste i de tipus cel·lular i són capaços de transduir tant cèl·lules quiescents com en divisió, *in vitro* i *in vivo*. A més el descobriment de nous serotips d'AAV expandeix encara més l'univers de potencials òrgans, teixits i cèl·lules diana i **4)** els vectors AAV mantenen (després de varis anys), nivells elevats d'expressió gènica *in vivo*, en absència d'una resposta immune notòria contra el producte del transgèn.

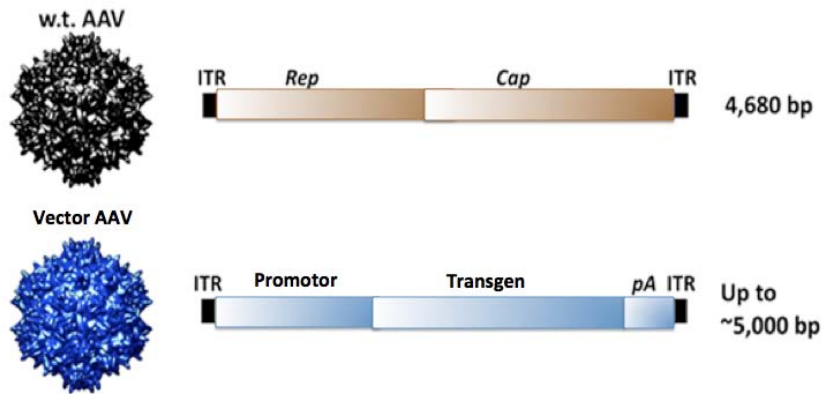


Figura 1.24- Esquema d'un virus AAV i vector AAV recombinant (rAAV), on s'observa la substitució dels gens rep i cap del virus per un casset d'expressió (promotor+transgen) en el vector. (Adaptat de Mingozzi et al. 2013) [354].

No obstant, també hi ha alguns inconvenients en l'ús de vectors AAV per aplicacions de teràpia gènica: **(i)** El seu tamany limita la inserció de casset d'expressió gènica; **(ii)** l'inici de l'expressió del transgèn és lent, degut al requeriment de conversió del DNA de cadena senzilla en DNA de doble cadena abans que es pugui iniciar l'expressió gènica. L'estratègia que s'ha desenvolupat per fer front a aquesta limitació inclou la construcció de vectors de DNA de doble cadena, però aquest fet resulta en una major disminució de tamany per a la inserció gènica, ja que s'ha d'incorporar el gen dues vegades en aquest vector (en orientació *sense* i *antisense*); i **(iii)** alguns autors han demostrat que els vectors recombinants AAV2 mostren una preferència integracional en regions de cromatina transcripcionalment actives [355]. Tot i així, la freqüència total d'integració de rAAV2 és molt baixa i no se sap si és un fenomen general o específic per fetge, el model usat o per AAV2.

- **Serotips d'AAVs i tropisme:**

Des de 2008 hi ha descrits 12 serotips humans d'AAV i més de 100 serotips de primats no humans. Els serotips es determinen en base a la reactivitat creuada de la càpsida AAV als serotips coneguts. Degut a les diferents característiques de la càpsida, diferents serotips ofereixen certs avantatges, tals com el tropisme per diferents tipus de teixit i la reducció de la prevalença d'anticossos neutralitzants existents en la població [356].

El serotip 2 (AAV2) ha estat de lluny el vector més examinat [357-360]. AAV2 presenta un tropisme natural per múscul esquelètic [361], neurones [357], cèl·lules de la musculatura llisa vascular [362] i hepatòcits [363]. Tot i així, diversos estudis han demostrat que també hi poden haver altres serotips que esdevinguin més efectius com a vectors de teràpia gènica. Per exemple, l'AAV6 sembla ser millor

infectant cèl·lules epitelials de les vies respiratòries [364]; AAV7 presenta una elevada taxa de transducció de cèl·lules musculars murines (similar a AAV1 i AAV5) [365]; AAV8 presenta una elevada taxa de transducció d'hepatòcits [366-368] i AAV1 i AAV5 s'ha vist que són molt eficients transduint cèl·lules endotelials vasculares [365]. En cervell, la majoria de serotips d'AAV presenten tropisme neuronal, mentre que AAV5 també transdueix astròcits ([369]).

Els diversos serotips d'AAV poden diferir en relació al receptor que s'uneixen. Per exemple, la transducció mediada per AAV4 o AAV5 pot ser inhibida per la presència d'àcids siàlics solubles [370] i s'ha demostrat que AAV5 entra a la cèl·lula a través del receptor del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFR) [371]. Per tant, els diferents serotips d'AAV transdueixen preferentment diferents tipus cel·lular. En general, el tropisme està associat a l'abundància dels receptors/co-receptors, malgrat hi ha excepcions. Això suggereix que probablement existeixin altres vies d'internalització que encara no es coneixen.

Recentment, s'ha estudiat el tropisme i la cinètica d'expressió per a 9 serotips diferents d'AAV, els quals han estat empaquetats, produïts, purificats i injectats per la mateixa ruta sistèmica. En aquest treball es va realitzar un seguiment seqüencial, en ratolins, de l'expressió del transgèn durant 100 dies, i també 9 mesos després de l'administració intravenosa dels serotips AAV 1-9 que expressaven el transgèn de la luciferasa controlat pel promotor de citomegalovirus (CMV) i flanquejat per seqüències ITR d'AAV2. Les imatges de bioluminescència van revelar tres nivells d'expressió: a) grup d'expressió baixa amb serotips AAV2, 3, 4 i 5; b) grup d'expressió moderada amb els serotips AAV1, 6 i 8, i c) grup d'expressió alta amb els serotips AAV9 i AAV7. A més hi va haver una gran variació en la cinètica d'expressió entre aquests serotips, essent AAV7 i AAV9 els que van tenir un inici més ràpid de l'expressió, i AAV3 i 4 els d'expressió més lents [372].

4.1.2- Vectors AAVs amb tropisme per SNC

L'expressió en cervell de gens administrats exògenament s'ha proposat com a teràpia alternativa per a una gran varietat de malalties hereditàries i adquirides que afecten el SNC, per a les quals els tractaments disponibles no proporcionen una recuperació plena o fins i tot poden generar efectes colaterals greus. En els darrers anys una part dels recursos en teràpia gènica s'han centrat en el desenvolupament de noves estratègies de transferència gènica al SNC, i en l'avaluació del seu potencial en el tractament de malalties neurològiques. Entre els diferents sistemes desenvolupats per aquest propòsit, els vectors adenoassociats són actualment el vehicle preferit per a la

transferència gènica a SNC, degut a les característiques comentades anteriorment com l'absència de patogenicitat, la capacitat per transduir cèl·lules post-mitòtiques (neurones, astròcits i oligodendròcits), i una expressió gènica a llarg termini en cervell i en medul·la espinal [373, 374], així com en sistema nerviós perifèric, sense cap resposta immune associada.

La major part de la informació de que es disposa avui en dia sobre l'efectivitat i especificitat dels vectors AAV, en el tractament dels desordres del SNC, prové d'estudis en models animals en els quals s'avaluen diferents vectors segons el seu potencial per aminorar els símptomes d'una malaltia. S'ha vist, que la transducció varia segons el serotip d'AAV i la regió de cervell injectada. En ratolí, AAV1 i AAV5 poden transduir cèl·lules neuronals i gials mentre que AAV2 només és capaç de transduir neurones [375, 376]. Tot i que AAV2 pot transduir cèl·lules del sistema nerviós, només resulten afectades les cèl·lules properes al punt d'injecció, això implica la necessitat de realitzar múltiples injeccions o emprar agents tals com el manitol o l'heparina per cobrir àrees mes extenses del SNC [377, 378]. A més, recentment, s'han descobert en primats quatre nous serotips: AAV7, 8, 9 i Rh10, dels quals s'han estudiat les característiques de transducció en cervell de ratolí adult. Els resultats semblen indicar que aquests vectors transdueixen específicament neurones, i no astròcits ni oligodendròcits [379].

PERFIS DE TRANSDUCCIÓ, INTERACCIONS CÀPSIDE-RECEPTOR I TRANSPORT AXONAL EN ALGUNS SEROTIPS D'AAVs EN SNC DE MAMÍFERS						
Serotip	Receptor primari	Administració intra-CSF o intra-parenquima		Administració intravascular		Transport axonal
		Transducció neuronal	Transducció glial	Transducció neuronal	Transducció glial	
AAV1	α2,3/α2,6 N-linked SA	++	+	+	+	A-, R+
AAV2	Heparán sulfat	+	-	-	-	A+, R-
AAV4	α2,3 O-linked SA	-	+	-	-	?
AAV5	α 2,3 N-linked SA	++	+	-	-	?
AAV6	α2,3/α2,6 N-linked SA/ Heparán sulfat	++	-	+	+	A-, R+
AAV8	?	++	++	++	++	A+, R+
AAV9	Galactosa	+++	++	+++	+++	A+, R+
AAV rh10	?	+++	+	+++	+++	?

? Receptor no conegut/ transport axonal no caracteritzat; + nivells baixos de transducció; ++ nivells moderats de transducció; +++ nivells elevats de transducció; - no transducció; A + o R+ el vector AAV té transport axonal en direcció anterògrada (A) o retrògrada (R) en la caracterització in vivo.

Taula 1.8- Característiques de tropisme d'alguns dels serotips d'AAV millor caracteritzats en el SNC de mamífers. (Adaptat de Murlidharan. et al 2014) [380].

Deixant de banda l'eficàcia de transducció del vector, la duració de l'expressió gènica depèn també de la regió cerebral diana i del promotor usat. Estudis realitzats amb AAV2 demostren que l'eficiència d'expressió és més alta en hipocamp, comparada amb el còrtex piriforme i el bulb olfactori, i més baixa en l'estriat [381]. D'altra banda, entre els promotors que han estat avaluats per a la transducció viral en el SNC trobem el de citomegalovirus (CMV), enolasa neuronal (NSE), CMV-actina de pollastre (CBA) [382]. El més popular, el CMV proporciona una expressió gènica duradora (fins a 1 any) tot i que la durada pot variar depenent de la regió cerebral [383, 384]. És important assenyalar que el promotor escollit no és només crucial per a la durada de l'expressió gènica sinó també per la especificitat cel·lular de la transferència gènica. Per exemple, s'han obtingut alguns resultats sorprenents amb promotors específics de tipus cel·lular com el de la proteïna fibril·lar àcida glial (GFAP), el qual semblava que induïa únicament una transducció neuronal en medul·la espinal, hipocamp i estriat, trobant-se solament una traducció del 5% en astròcits estriatal [385]. Per tant, cal anar en compte ja que l'especificitat cel·lular aconseguida amb promotors específics pot variar molt entre es diverses regions del SNC.

- **AAV rh10**

Com ja s'ha comentat anteriorment, cada serotip d'AAV presenta unes capacitats pròpies per infectar tipus cel·lulars específics de cervell. En els darrers anys, els serotips 8, 9 i rh10 són els que estan centrant més atenció com a vectors capaços de transduir el SNC. Tal i com s'ha demostrat en diversos estudis de tropisme neuronal, AAV8, AAV9 i AAVrh10 són vectors eficients de transferència gènica en l'hipocamp de ratolí adult [379, 386, 387] tot i que podem trobar diferències degut al serotip, el mètode de purificació, la via d'administració o el promotor. Per exemple, en els estudis de *Klein et al. (2007)* es pot observar com els vectors purificats per gradient de CsCl, en comparació als purificats amb gradients de iodixanol, presenten major probabilitat de proteïnes contaminants que poden afectar el patró de transducció neuronal, fent que aquest disminueixi i augmenti l'eficiència de transducció d'astroglia, fet que pot ser útil en el tractament de l'ELA o l'Alzheimer [386].

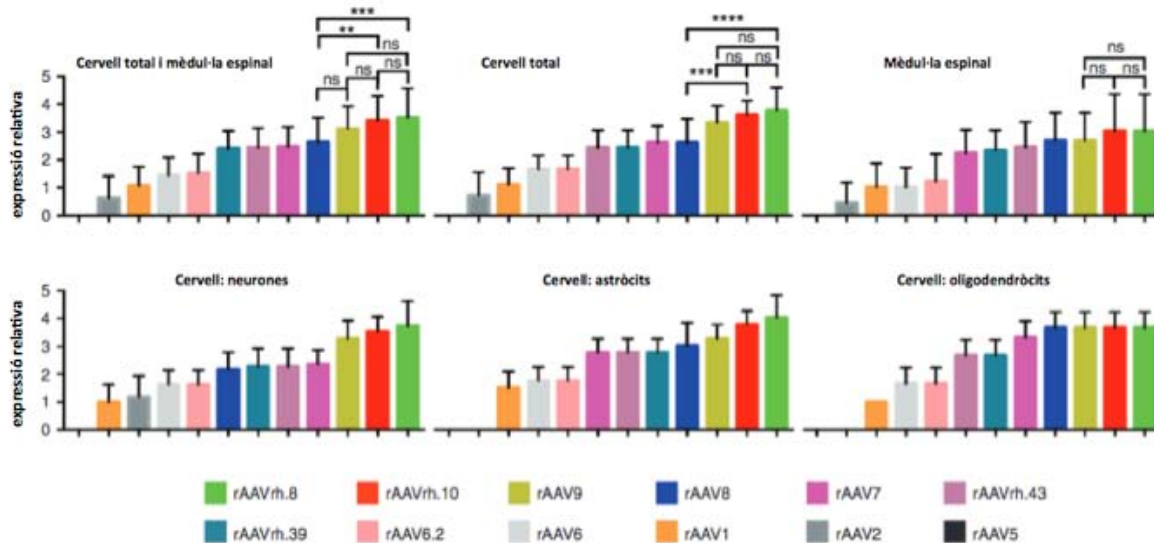


Figura 1.25- Quantificació de cèl·lules transfectades en el sistema nerviós central d'un ratolí adult. Resultats semiquantitatius de cèl·lules neuronals i glials transduïdes pels diferents vectors rAAV-EGFPs. (Adaptat de Yang B. et al 2014) [388].

Un avantatge potencial de l'ús de AAVrh10 és el fet de que no es tracta d'un serotip humà, sinó que aquest deriva de *rhesus macaque* i per tant, la seva aplicació en humans permetria vèncer un dels principals obstacles de l'ús clínic d'AAVs, la presència d'immunitat pre-existent contra el vector, es a dir, anticossos neutralitzants contra el virus (NAb). Així doncs, quan es compara la immunogenicitat del AAVrh10 i AAV9 en ratolí, mitjançant la quantificació de l'augment de anti-AAV IgG 3 setmanes després de la injecció intravenosa del virus, el nombre d'anticossos generats en resposta a AAVrh10 és molt menor que en AAV9 [389]. No obstant, tant en ratolins com en primats no humans, s'ha aconseguit una expressió persistent del transgèn després de l'administració intraperitoneal d'AAVrh10, malgrat la presència sostinguda de NAb en sèrum [390]. En humans, la situació respecte la pre-existència d'anticossos contra AAVs és molt més complexa, ja que l'exposició als virus *wild-type*, especialment AAV2, és comú. Als 3 anys d'edat, més del 20% dels nens ja disposen de NAb contra AAV2 [391].

D'altra banda, en assajos de neutralització del virus es va observar que el sèrum dels ratolins injectats amb AAVrh10 presentava un menor poder de neutralització que els injectats amb AAV9, i que no hi havia cross-reacció entre sèrums. Aquesta manca de cross-reactivitat en el sèrum entre serotips diferents d'AAV ja s'havia reportat en diversos models animals [392, 393]. No obstant, en l'anàlisi dels sèrums humans de persones sanes, es va veure que alguns d'ells eren també capaços de neutralitzar el AAVrh10. Per tant, malgrat els resultats prometedors, l'origen simià de l'AAVrh10 no

garanteix l'absència d'anticossos pre-existents en humans, ja que es poden donar fenòmens de cross-reactivitat amb anticossos contra els AAVs humans [389].

Finalment, comentar que actualment, als EUA es troba en marxa un assaig clínic en humans, en fase de reclutament de participants, pel tractament de la lipofusinosi ceroide neuronal (NCL) utilitzant com a vector l'AAVrh10 [394]. La NCL és una malaltia d'emmagatzematge lisosomal causada per mutacions en el gen *cln2* i la deficiència de la tripeptidil peptidasa I (TPP-1), un enzim lisosomal encarregat de la degradació de proteïnes de membrana [395]. Les neurones, són particularment sensibles a les acumulacions lisosomals, i els individus que pateixen NCL presenten una neurodegeneració extensiva i progressiva en totes les àrees del cervell, conduint a un estat vegetatiu i una mort prematura al voltant del 8-12 anys. En estudis previs, en ratolins deficients per al gen *cln2*, l'administració d'AAV 2 i 5 codificant pel gen terapèutic a SNC permetia eliminar els grànuls de lipofuscina però no permetia cap millora en el fenotip o la supervivència d'aquest model d'NCL [396]. Posteriorment, es va repetir l'estudi incorporant els serotips 8 i rh10. Comparat amb la resta de serotips d'AAV, l'AAVrh10 fou el que va permetre obtenir nivells superiors de proteïna terapèutica (similar als nivells en ratolins *wild-type*) i màxima difusió més enllà del lloc d'injecció. De manera important, els ratolins tractats amb AAVrh10-CLN2 mostraven una reducció significativa dels grànuls acumulats en SNC, i una millora demostrada de la marxa, les convulsions, l'equilibri i la força prènsil, així com també una supervivència lleugerament incrementada [392].

utilitzen CMV com a promotor i purificació per gradient de CsCl. Es mostren 2 cervells per grup. (Yang B. et al 2014 [388])

4.2. Estudis de silenciament gènic mitjançant l'ús de vectors AAVs codificants per RNAs interferència

En els darrers anys, nombrosos grups han estat treballant per unir dues de les tecnologies més exitoses i prometedores en biomedicina, la teràpia gènica i l'RNA interferència (RNAi)[397]. Els AAVs són virus de DNA de cadena senzilla amb un límit d'empaquetament d'aproximadament 5kb. No obstant, aquesta capacitat és suficient per acomodar com a mínim vuit cassets individuals d'expressió d' shRNAs [398].

D'altra banda, l'RNA interferència (RNAi) permet el silenciament gènic postranscripcional, induït per una seqüència curta d'RNA (~21bp) de doble cadena complementària a l'mRNA del gen a silenciar. L'eficiència i l'especificitat dels RNAi els ha donat una gran importància en els darrers anys [397]. És més, el descobriment que els RNAi poden ser induïts per seqüències sintètiques ha obert la possibilitat de desenvolupar mètodes simples per a la inactivació de gens en cèl·lules somàtiques de

mamífers. Les seqüències que indueixen RNAi poden ser proporcionades a les cèl·lules be com a oligonucleòtids curts de doble cadena d'RNA sintetitzats *in vitro* (siRNAs) o be com a short hairpin RNAs (shRNAs) i microRNAs (miRNAs) que es converteixen en molècules similars als siRNAs en la cèl·lula. La principal diferència entre shRNAs i miRNAs és que els shRNAs es sintetitzen des de promotors *Pol III* (com U6 i H1) i es coneixen millor, mentre que els miRNAs es sintetitzen des de promotors *Pol II* (permetent l'expressió induïble i específica de teixit), però es coneix menys el seu mecanisme d'actuació. Finalment, igual que els siRNAs, els shRNAs i els miRNAs exerceixen la seva acció sobre els mRNAs diana a través de la incorporació en el complex multisubunitat anomenat RISC (RNA-induced silencing complex) Quan es troba carregat amb els siRNA, RISC és capaç d'induir talls i suprimir la traducció dels mRNA diana [399].

Malgrat els siRNAs poden ser obtinguts comercialment i utilitzats directament, els oligonucleòtids que codifiquen pels shRNAs i els miRNAs han de ser primer clonats en un vector d'expressió. Però, els shRNA i els miRNA presenten un avantatge potencial sobre els siRNA ja que poden ser expressats de manera estable, permetent estudis a llarg termini tant en cultius cel·lulars com en models animals. És més, de cara al tractament de malalties cròniques, és preferible mantenir nivells de supressió constants de determinats gens expressant els shRNAs i iRNAs incorporats gràcies als vectors virals dins les cèl·lules, en lloc d'una administració continua, com seria el cas dels siRNAs.

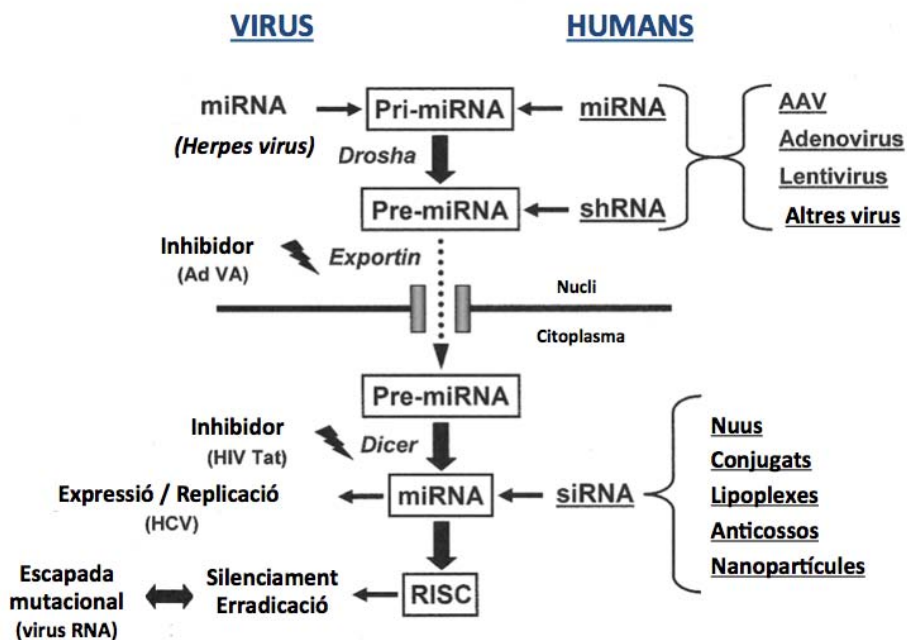


Figura 1.26- Vies d'actuació dels RNAi en humans/mamífers i possibles opcions terapèutiques que ofereixen. (Adaptat de Grimm et al. 2007) [397].

D'altra banda mitjançant l'expressió d'shRNA des de vectors virals se supera un altre obstacle important que presenta el sistema siRNA: l'eficiència d'entrada a la cèl·lula es molt baixa, i *in vivo* encara més, per això cal emprar concentracions molt saturants d'aquestes molècules. Fins ara, diversos estudis han demostrat que l'ús de vectors AAVs per a l'expressió d'shRNA en diferents cèl·lules diana, tant *in vivo* com *in vitro*, funciona molt bé [400-403]. A més, alguns serotips com els AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 i AAV9 tenen una elevada eficiència de transducció a neurones del sistema nerviós central, i per tant són una aproximació terapèutica de gran potencial [398].

Així doncs, els shRNA esdevenen una eina molt útil, que juntament amb els vectors virals de que es disposa per a teràpia gènica, permeten el silenciament de les proteïnes diana, en àrees o regions corporals específiques (ex: cervell, múscul, fetge, etc). D'aquesta manera, és possible estudiar el paper de determinats gens o la seva implicació en alguns processos *in vivo*, evitant els fenòmens de compensació gènica que es poden donar en models animals transgènics.

II. OBJECTIUS

L'envelliment de la població representa una de les grans transformacions socials del segle XXI. Per tant, preservar la funció cerebral durant l'etapa final de la vida s'ha convertit en un gran repte biomèdic. De fet, s'estima que sense noves intervencions, més de 80 milions de persones en tot el món patiran problemes de memòria com a conseqüència de l'envelliment o malalties relacionades amb l'edat

Per aquest motiu, en els darrers anys ha crescut l'interès en l'estudi dels mecanismes moleculars i cel·lulars així com dels possibles gens reguladors implicats en aquest procés. En aquest sentit, elucidar si els factors que prolonguen la vida també poden prevenir, retardar o contrarestar la disfunció neuronal associada a l'envelliment o a processos neurodegeneratius és una qüestió crucial amb importants implicacions terapèutiques.

Així, en el context d'aquesta tesi doctoral centrada en la búsqueda de factors neuroprotectors que permetin retardar l'aparició de problemes cognitius associats a l'edat o a processos neurodegeneratius vam voler estudiar la implicació de Klotho, un gen identificat a finals dels anys 90, en l'envelliment cerebral i el desenvolupament de alteracions conductuals associades a l'edat. Per fer-ho, es van plantejar els següents objectius:

- 1)** Analitzar i caracteritzar els nivells d'expressió del gen klotho en diferents regions cerebrals (còrtex prefrontal, còrtex cerebral, hipocamp i cerebel) tant: (a) durant l'envelliment en condicions fisiològiques; (b) en condicions patològiques (en un model murí de la malaltia d'Alzheimer); i (c) en condicions d'hàbits saludables, com la pràctica d'exercici físic moderat i continuat durant l'edat adulta.
- 2)** Aplicar estratègies de teràpia gènica amb vectors virals adenoassociats de tropisme neuronal portadors de cDNA o seqüències d'shRNA que permetin modificar (tant a nivell espacial com temporal) els nivells de klotho en SNC.
- 3)** Analitzar en ratolins wild-type adults i ancians, els efectes de l'administració dels vectors virals generats, tant sobre les capacitats cognitives dels animals tractats, com sobre els símptomes neuropsiquiàtrics i neurològics associats a la demència.

III. RESULTATS

1. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE L'EXPRESSIÓ DE KLOTHO EN SNC DURANT L'ENVELLIMENT

1.1. Definició de la nomenclatura de les diverses formes proteiques de klotho

El gen klotho codifica dos transcrits, un que genera una proteïna transmembrana (m-KL) de 130 kDa, i un altre generat per splicing alternatiu que dóna lloc a una proteïna secretada de 70kDa (s-KL). Aquest mRNA alternatiu inclou una senyal de secreció específica que consisteix en una cua de 15 aminoàcids que no es troba en el transcrit m-KL. El domini extracel·lular de la proteïna transmembrana pot ser escindit per les metal·lo proteïnases ADAM10 i ADAM17 generant una altra forma soluble de klotho, d'aproximadament 130 kDa, que ha estat detectada en sèrum, orina i fluid cerebroespinal (*Figura 3.1*). És més, dos estudis recents indicarien que existeix un segon lloc de reconeixement per aquestes proteases localitzat entre els dominis KL1 i KL2, que generaria dos noves isoformes solubles de 70 kDa aproximadament, una que conté únicament el domini KL1 (similar a la forma generada per splicing alternatiu però sense la cua específica d'aminoàcids), i l'altra que conté el domini KL2. Així doncs, la proteïna klotho pot entrar al sistema circulatori a través de dos mecanismes principals: **(a)** per splicing alternatiu, i **(b)** per escissió proteolítica mediada per ADAM 10 i 17. No obstant, es desconeix el percentatge en el qual es produeix cadascun d'aquests dos fenòmens.

Aquesta diversitat d' isoformes proteiques de klotho ha conduït a una nomenclatura bastant confosa i ha dificultat l'assignació de funcions fisiològiques a les diferents formes. Per adreçar aquest problema, en aquesta tesi s'ha decidit fer ús de la nomenclatura proposada per *Forster et al.*, on **m-KL** designa la forma transmembrana *full-length* de klotho (135kDa); **p-KL** designa la forma proteolitzada de klotho, que es genera per escissió del domini transmembrana (130kDa); i **s-KL** designa la forma secretada de klotho, generada per splicing alternatiu, i observada per primer cop com a proteïna en aquest treball (70kDa).

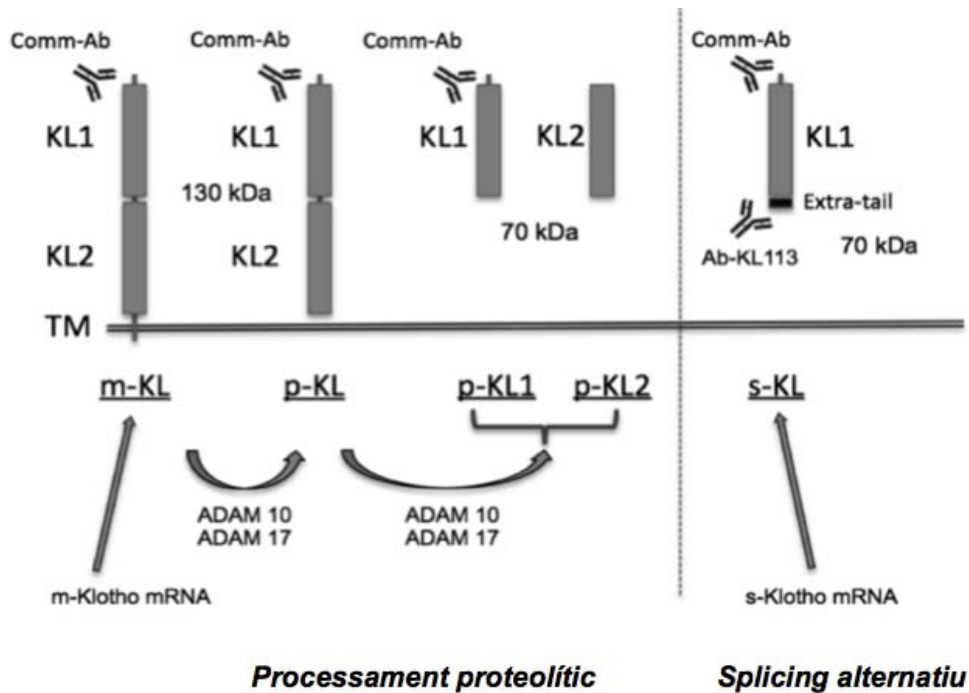


Figura 3.1- Esquema de les diverses possibles isoformes proteiques de klotho. Un dels transcrits codifica per la forma transmembrana (m-KL), la qual és processada per les secretases ADAM10/17 generant la forma proteolitzada de klotho (p-KL) que conté els dominis KL1+KL2, i en cas de produir-se un segon tall proteolític es generarien els dominis individuals proteolitzats (p-KL1 i p-KL2). Un segon transcrit de klotho produït per splicing alternatiu codifica per la forma secretada de klotho (s-KL), formada únicament pel domini KL1 més una cua extra d'aminoàcids a l'extrem C-terminal. Els anticossos comercials (Comm-Ab) han estat generats contra els dominis KL1 o KL2 (més freqüentment contra KL1) i, per tant, detecten diverses isoformes de klotho. Les diferents isoformes de la proteïna klotho han estat subratllades en la imatge.

1.2. Estudi del perfil d'expressió temporal-espacial diferent de les dos isoformes de klotho

En els darrers anys, la major part de l'atenció s'ha centrat en la forma transmembrana de klotho (m-KL), i poc es coneix de la forma secretada (s-KL). Per tal d'esbrinar si el perfil d'expressió de les dos isoformes de klotho és similar, en primer lloc es va analitzar la seva expressió en cervell i ronyó ja que aquests són els dos òrgans amb major expressió. Tenint en compte el nostre interès en les malalties neurodegeneratives associades a l'envelliment, es va decidir estudiar el seu patró d'expressió durant l'etapa adulta, en animals adults joves (6 mesos) a animals ancians (18 mesos). Tal i com s'observa en la *Figura 3.2*, els nivells d'expressió dels dos transcrits de klotho decauen amb l'edat. Aquesta disminució és especialment pronunciada en ronyó (38,6 i 7,3 vegades de diferència per m-KL i s-KL

respectivament), però també és estadísticament significatiu en cervell (5,1 vegades per m-KL i 3,2 per s-KL). És més, tal i com s'havia descrit anteriorment es va trobar que en ronyó l'expressió de m-KL és superior a la de s-KL (78 vegades en ratolins de 6 mesos, i 7 vegades en ratolins de 18 mesos; dades no mostrades). De manera similar, l'expressió de m-KL en cervell també és més alta que la de s-KL (9 vegades en ratolins de 6 mesos i 5 vegades en ratolins de 18 mesos).

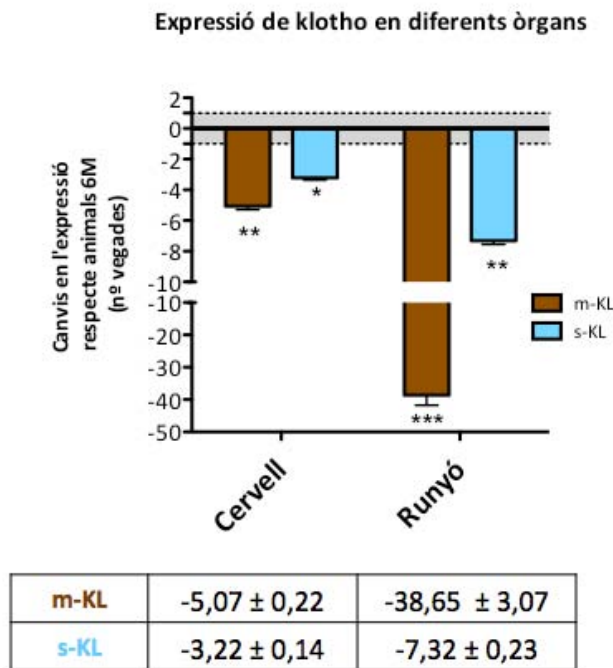


Figura 3.2- Anàlisi dels nivells d'expressió de klotho transmembrana (m-KL) i klotho secretat (s-KL) per qPCR durant l'envelliment en cervell i ronyó. Nivells d'expressió en homogenats de cervell sencer o ronyó de ratolins wild-type de 18 mesos d'edat respecte ratolins de 6 mesos d'edat. S'utilitza el gen m36B4 com a gen de referència. Mitjana ± SEM. [T-test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ vs. control; $n=8$ per a cada grup].

Tenint en compte la heterogeneïtat estructural i funcional d'un òrgan com el cervell, es va analitzar si la reducció en l'expressió de klotho en cervell associada a l'envelliment era uniforme o si era més pronunciada en algunes àrees que en altres. Per tant, es van estudiar els nivells d'expressió de klotho en còrtex prefrontal, còrtex i hipocamp, pel seu paper en l'aprenentatge i els processos cognitius, així com també en cerebel, degut als alts nivells d'expressió de klotho descrits en les cèl·lules de Purkinge [404]. Tal i com era d'esperar, en totes les àrees analitzades, l'expressió dels dos transcrits de klotho decauen amb l'envelliment (Figura 3.3). A destacar, que aquesta caiguda en els nivells d'expressió no esdevé uniforme en tot el cervell, i de fet, la caiguda de s-KL té un perfil diferent al de m-KL suggerint una possible regulació diferencial de la seva expressió, i/o un possible paper també diferent per ambdues isoformes de klotho. Per exemple, en còrtex prefrontal, ben d'hora, ja en animals de 9 mesos d'edat, els nivells de m-KL com de s-KL es veuen reduïts significativament en comparació amb els d'animals de 6 mesos d'edat (caiguda d'aproximadament 5 vegades per a m-KL i 2 vegades per a s-KL, $p < 0,001$ i $p < 0,05$ respectivament). Per contra, en hipocamp, els nivells de s-KL i m-KL no es

veuen disminuïts significativament fins als 12 mesos d'edat (entre 3-4 cops menys, $p < 0,01$), mentre que en còrtex, aquesta forta davallada en els nivells d'expressió no es detecta fins als 18 mesos i només en el cas de m-KL (6 vegades menys, $p < 0,05$). D'altra banda, en cerebel, l'expressió de m-KL es veu lleugerament incrementada en animals de 9 mesos, però decau ràpidament als 12 i 18 mesos d'edat (reducció de 10 vegades i 48 vegades respectivament, $p < 0,001$), mentre que els nivells de s-KL romanen força constants fins als 18 mesos d'edat, on són significativament inferiors comparat amb els animals de 6 mesos (4 vegades $p < 0,05$).

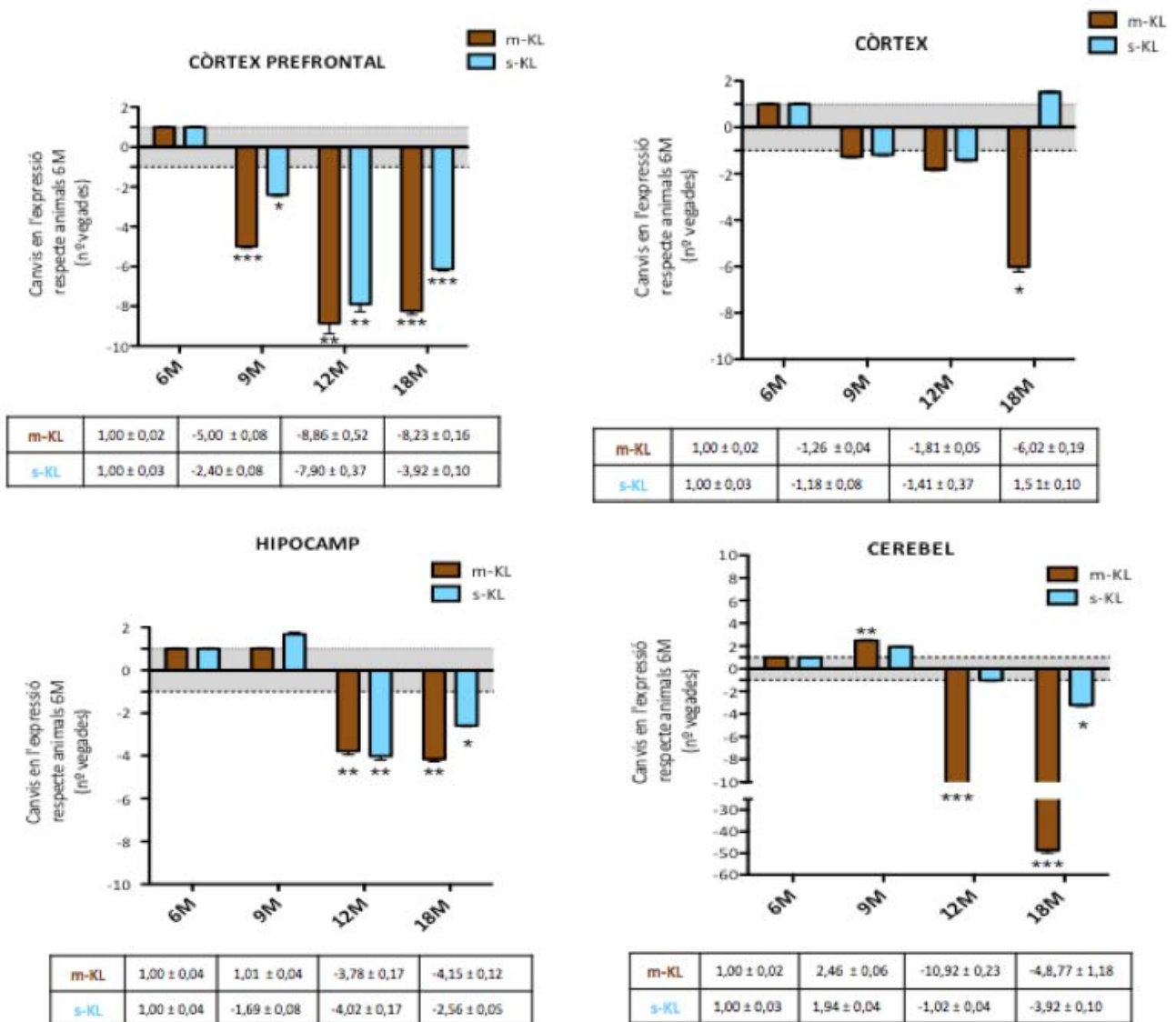


Figura 3.3- Anàlisi espacial i temporal dels transcrits m-KL i s-KL durant l'envelliment. Les següents àrees cerebrals van ser analitzades: còrtex prefrontal, còrtex, hipocamp i cerebel de ratolins wild-type de 6,9,12 i 18 mesos d'edat. El gen m36B4 es va utilitzar com a gen de referència. Mitjana ± SEM. [ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ vs. control; n=4-11 per a cada grup].

1.3. Generació d'un anticòs específic contra la proteïna klotho secretada (s-KL)

Actualment, els anticossos disponibles contra klotho reconeixen epítops que són comuns per totes dues isoformes de la proteïna klotho, tant la transmembrana com la secretada (incloent també la forma soluble proteolitzada) (*Figura 3.1*). Per analitzar de manera específica els nivells de la proteïna s-KL, en aquest treball es va dissenyar i generar un anticòs contra el pèptid exclusiu (15 aminoàcids) a l'extrem C-terminal de la proteïna s-KL (*Figura 3.4A*).

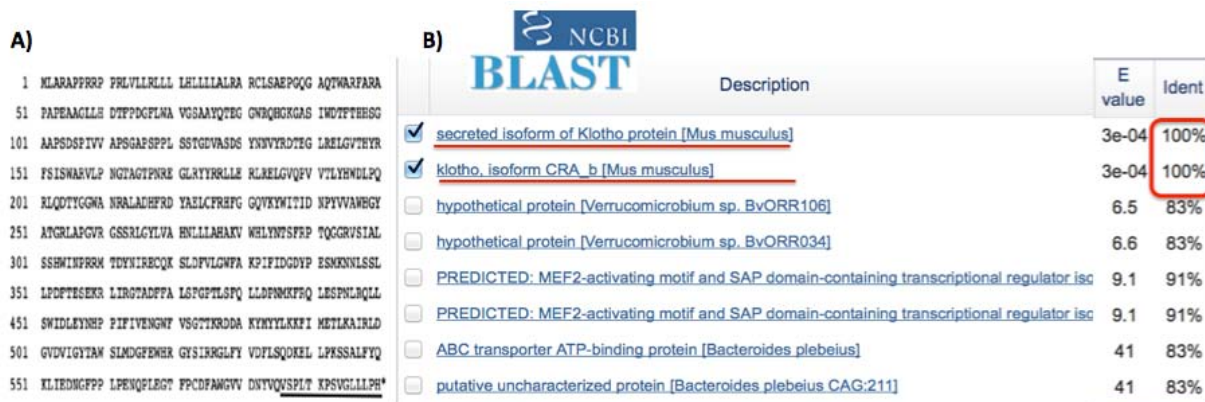


Figura 3.4- Estudi de s-KL. (A) Seqüència d'aminoàcids del transcrit s-KL. La cua específica de 15 aminoàcids està subratllada. (B) BLAST de la seqüència d'aminoàcids utilitzada com a pèptid immunogen per a la producció de l'anticòs K113. L'alineació de seqüències dona un 100% d'identitat amb la isoforma secretada de klotho en *Mus Musculus* corresponent als dos primers resultats (*Gene Bank BAA25307.1 i EDL05886.1*).

Utilitzant diferents programes d'anàlisi d'immunogenicitat de seqüència disponibles on-line (*Chon&Fasnan Beta-Turn Prediction, Kolaskar&Tongaonkar Prediction, Antigenicity Parker Hydrophilicity Prediction i Emini Surface Accessibility Prediction*) una elevada antigenicitat va ser predita per a l'epítop **SPLTKPSVGLLPH**. A continuació es va fer una cerca de similitud de seqüències en el buscador BLAST (NCBI) per buscar altres proteïnes amb aquest mateix epítop. Només la forma secretada de klotho (*Gene Bank: BAA25307.1*) va mostrar un 100% d'identitat, mentre que la resta de proteïnes amb un cert grau de similitud eren totes de bacteris (*Figura 3.4B*). Finalment, es va generar un anticòs específic, al qual es va donar el nom de Ab K113, capaç de reconèixer específicament la isoforma s-KL. Tal i com es mostra en la *Figura 3.5A*, l'anticòs K113 detecta una banda d'aproximadament 70 kDa en cèl·lules HEK293 transfectades amb el c-DNA de s-KL, però no en cèl·lules transfectades amb un plasmidi control codificant per GFP. El pes molecular esperat de s-KL és de 62,3 kDa.

A més, l'anticòs K113 va ser validat en un experiment de competició amb el pèptid immunogènic en cèl·lules HEK293 transduïdes amb s-KL així com també en mostres de cervell. Després d'incubar l'anticòs amb el pèptid immunogènic s'observa que les dues bandes d'uns 70 kDa desapareixen, indicant que es tracta de bandes específiques (Figura 3.5B). Sorprenents són els resultats obtinguts quan s'analitzen els nivells d's-KL en els dos òrgans productors majoritaris, cervell i ronyó. A diferència de la isoforma transmembrana de klotho, la isoforma secretada és detectada de manera dèbil en ronyó, però de manera abundant en cervell (9 vegades superior en cervell total que en ronyó) (Figura 3.5C) suggerint que la seva activitat podria ser duta a terme majoritàriament en cervell.

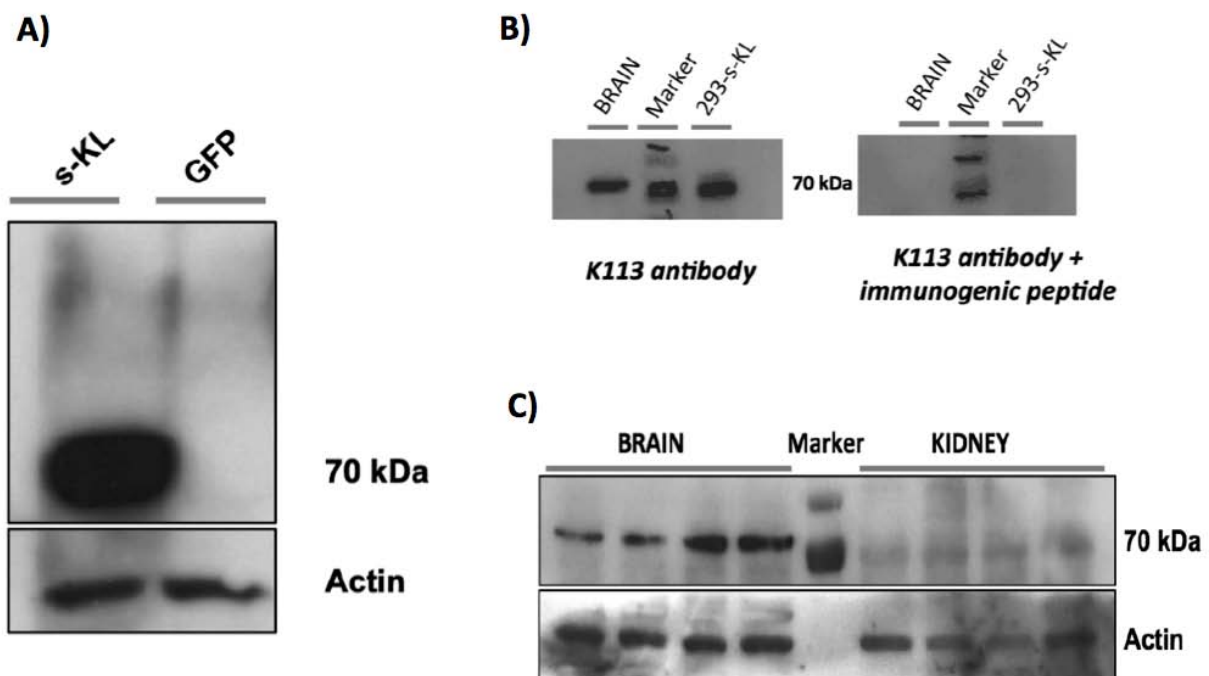


Figura 3.5- Validació de l'anticòs K113. **(A)** Immunoblot de cèl·lules HEK293 que sobreexpressen la proteïna s-KL. Com a control, s'utilitzen cèl·lules HEK293 que sobreexpressen GFP. **(B)** Experiment de validació de l'anticòs K113. Anàlisi per immunoblot de lisats de cervell sencer murí i cèl·lules transfectades amb s-KL (293-s-KL). El panell de la dreta mostra el mateix blot de la dreta però quan prèviament s'ha incubat l'anticòs amb el pèptid immunogènic. **(C)** Anàlisi dels nivells d'expressió de s-KL en cervell i ronyó de ratolins *wild-type* de 6 mesos d'edat utilitzant l'anticòs K113 (n=4). En tots els casos, l'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada en cada gel.

1.4. Detecció de la proteïna klotho secretada en diferents àrees cerebrals en ratolins adults joves i vells

Un cop validat l'anticòs K113 i veient per WB una elevada expressió de s-KL en homogenats proteics provinents de cervell, es va creure interessant estudiar de manera específica les mateixes àrees cerebrals que es van analitzar per quantificar els nivells d'expressió per mRNA. Tal i com s'observa en la *Figura 3.6*, en ratolins adults joves (6 mesos) mitjançant anàlisi per WB es va detectar l'expressió de la proteïna s-KL en totes les àrees analitzades, essent el cerebel la que presenta majors nivells, tres vegades superiors a la resta.

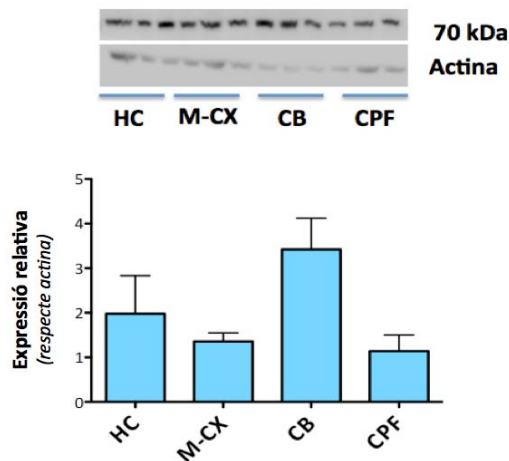


Figura 3.6- Anàlisi de la proteïna s-KL en diferents àrees cerebrals (CPF: còrtex prefrontal, CX: còrtex, HC: hipocamp i CB: cerebel) de ratolins C57Bl/6 de 6 mesos d'edat per immunoblot utilitzant l'anticòs K113. Els gels van ser quantificats per densitometria i les columnes representen la mitjana \pm SEM dels valors individuals obtinguts ($n=3$). L'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada.

A continuació, els nivells de la proteïna klotho secretada van ser analitzats en CPF, CX, HC i CB de ratolins de 6 mesos i 18 mesos d'edat utilitzant l'anticòs K113. D'acord amb els nivells d'mRNA de s-KL, els nivells proteics també disminueixen amb l'edat en còrtex prefrontal, còrtex i hipocamp (fins a un 41%, 49% i 63% respectivament) (*Figura 3.7*). No obstant, en cerebel, els nivells de proteïna s-KL es mantenen estables amb l'edat. A nivell estadístic, només esdevé significativa la reducció dels nivells d's-KL en còrtex ($p=0,026$) i còrtex prefrontal ($p=0,042$). De fet, la correlació entre nivells d'mRNA i nivells de proteïna en àrees cerebrals es complica ja que proteïnes produïdes en altres regions del cervell poden ser detectades degut a les projeccions axonals de neurones distants. Cal destacar, que aquesta es la primera vegada que els nivells de la proteïna klotho secretada generada

per splicing alternatiu són quantificats específicament, sense interferències de les isoformes p-KL i pKL1 produïdes per processament proteolític de la forma transmembrana.

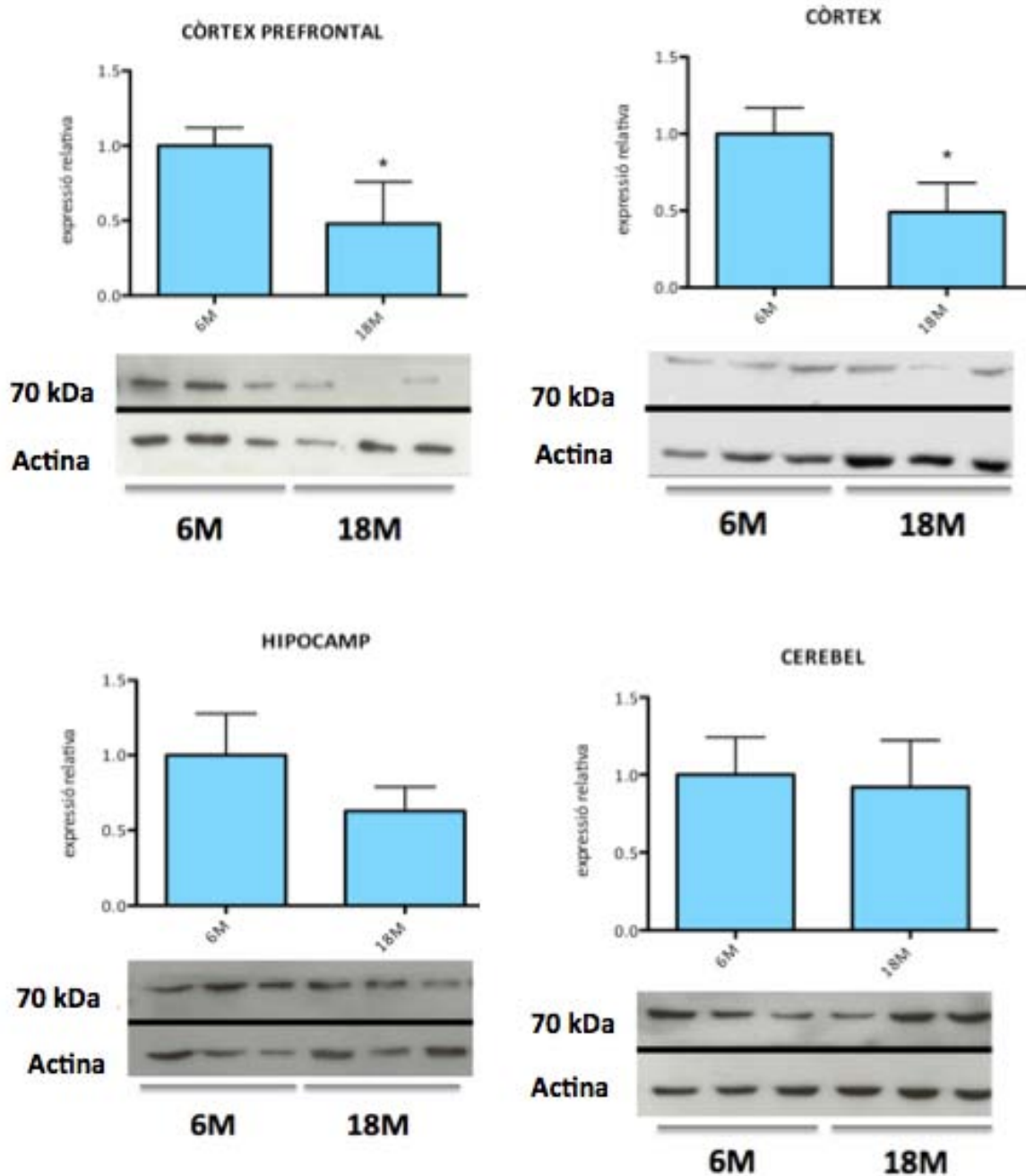


Figura 3.7- Anàlisi de la proteïna s-KL durant l'envelliment per immunoblot. Les mateixes àrees emprades per estudiar els nivells d'mRNA (còrtes prefrontal, còrtes, hipocamp i cerebel) de ratolins *wild-type* de 6 i 18 mesos van ser analitzades per immunoblot emprant l'anticòs K113. Els gels van ser quantificats per densitometria i les columnes representen la mitjana \pm SEM dels valors individuals obtinguts ($n=3$). L'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada.

1.5. L'expressió de klotho en cervell decau més ràpidament en el ratolí transgènic model d'Alzheimer (3xTg-AD) que en animals sans

A continuació, es va analitzar si aquesta reducció observada en l'expressió dels transcrits s-KL i m-KL en àrees de cervell durant l'envelliment no patològic, també tenia lloc en processos d'envelliment patològic com passa en malalties neurodegeneratives com ara l'AD. Amb aquesta finalitat, es va estudiar el patró d'expressió de m-KL i s-KL en les mateixes àrees escollides anteriorment, en ratolins 3xTg-AD de 6, 9 i 12 mesos respectivament. Tal i com s'observa en processos no patològics, també l'expressió d'ambdós mRNAs es veu reduïda ràpidament, esdevenint significativament diferents als 6 mesos d'edat en còrtex prefrontal, còrtex i hipocamp (*Figura 3.8*). Tot i així, durant l'envelliment, les diferències en el perfil d'expressió de s-KL i m-KL disminueixen i finalment, a l'edat de 12 mesos, els nivells de s-KL i m-KL són similars en els ratolins 3xTg-AD i ratolins control. Cal destacar, que en cerebel (on els efectes de l'Alzheimer són menys importants que en altres àrees) l'expressió d'ambdues isoformes de klotho a totes les edats estudiades decau de manera igual en animals transgènics i en animals control.

D'acord amb aquesta reducció observada a nivell d'mRNA, l'anàlisi per Western Blot amb l'anticòs K113, els nivells proteics de la isoforma s-KL detectats també eren inferiors en ratolins 3xTg-AD. Així, comparat amb ratolins control de la mateixa edat, els nivells de proteïna s-KL en hipocamp es veien reduïts fins al 63% ($p=0,2$) i un 53% ($p<0,001$) als 6 i 12 mesos d'edat respectivament (*Figura 3.9 i 3.10*), mentre que en d'altres àrees com en cerebel, els nivells de s-KL disminueixen fins a un 31% als 12 mesos d'edat ($p<0,05$), però en canvi, es mantenen similars als controls als 6 mesos. Per la seva banda, sembla ser que els nivells s-KL en còrtex prefrontal i còrtex cerebral podrien veure's augmentats en animals transgènics respecte els controls a les dues edats estudiades.

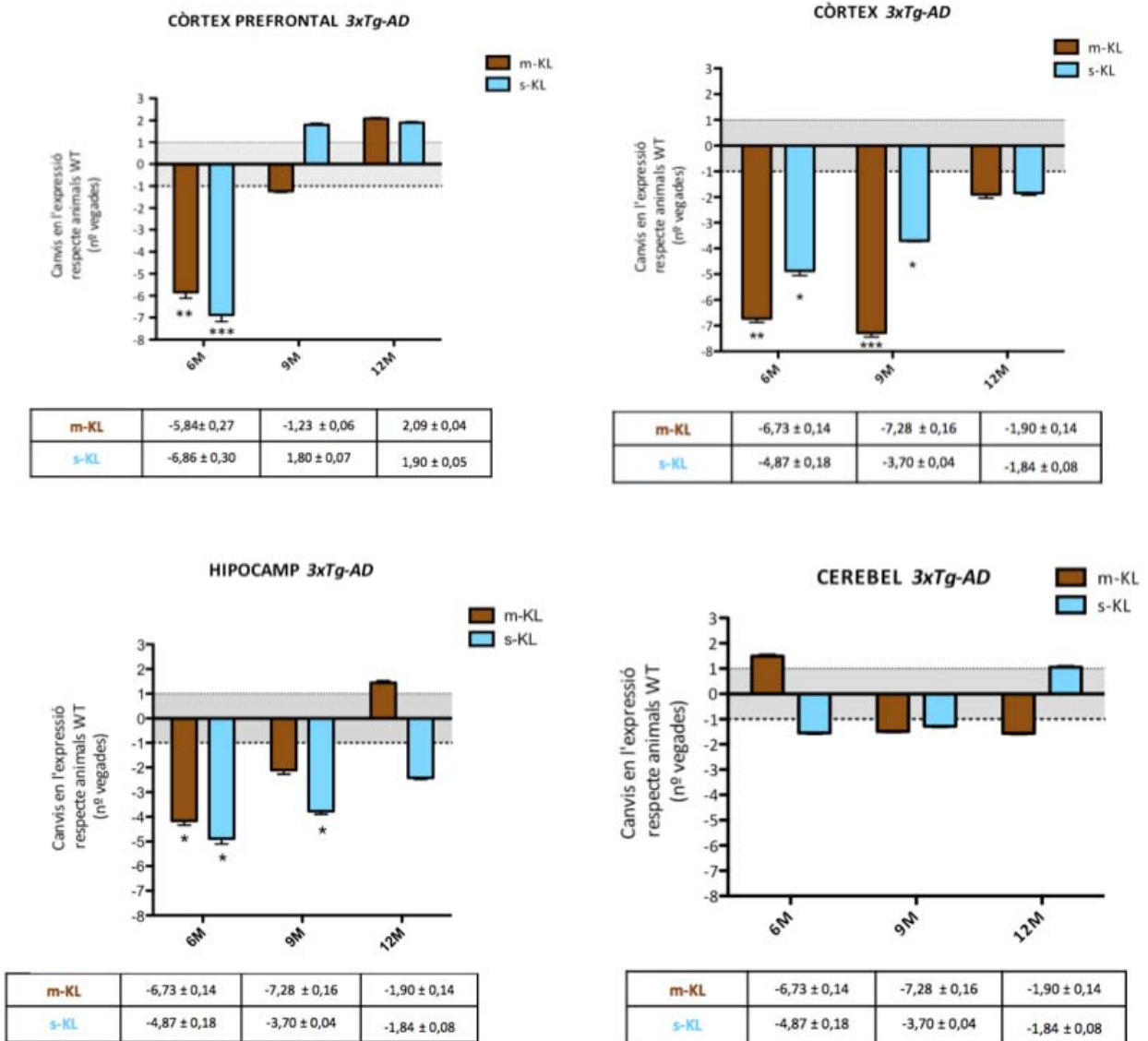


Figura 3.8- Anàlisi de l'expressió dels dos transcrits de klotho en ratlins 3xTg-AD. Perfil d'expressió de klotho transmembrana (m-KL) i klotho secretat (s-KL) en còrtex prefrontal, còrtex, hipocamp i cerebel de ratlins 3xTg-AD als 6, 9 i 12 mesos d'edat obtingut per qPCR (n=4-11 per grup).

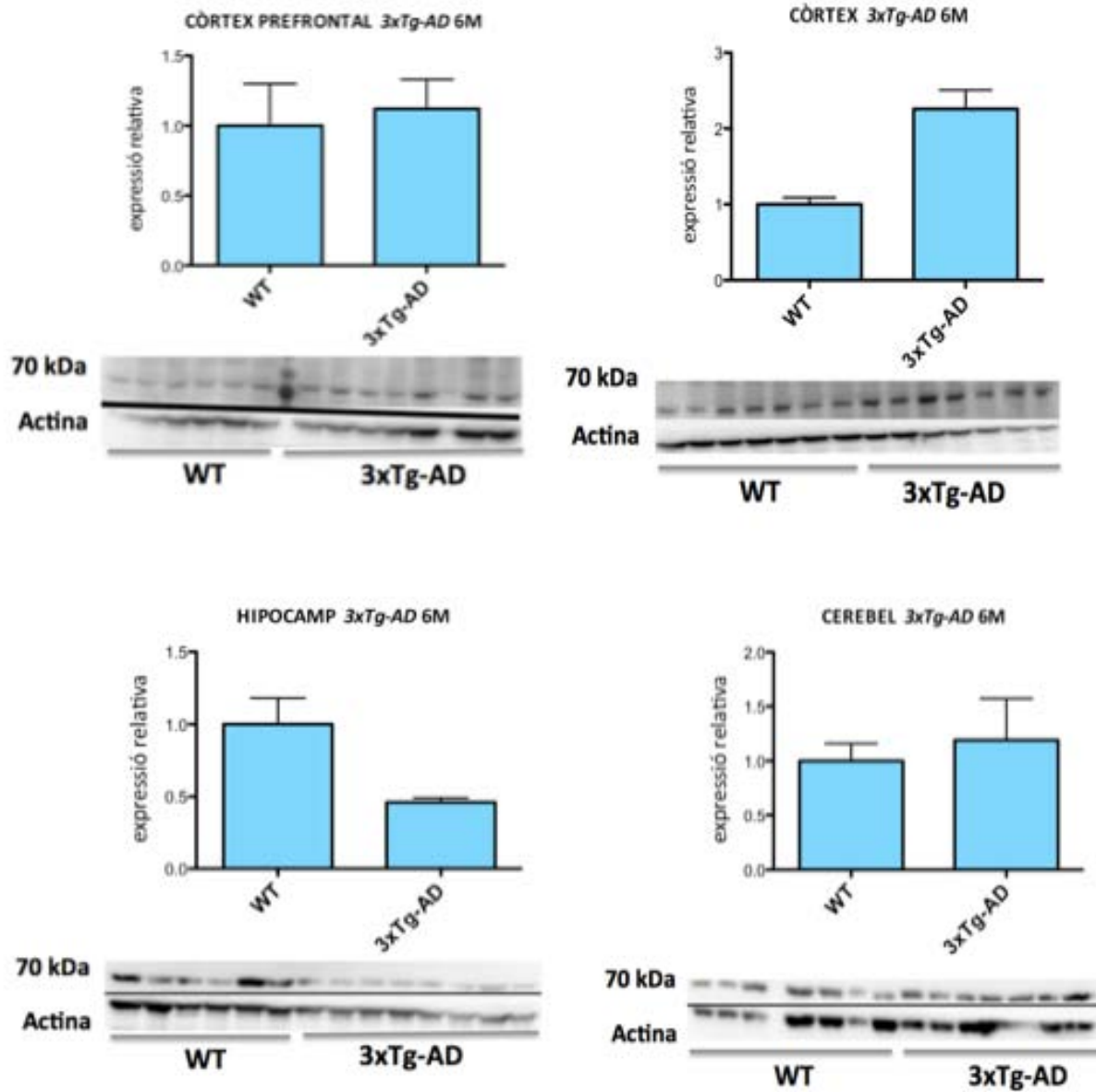


Figura 3.9- Anàlisi de l'expressió de la proteïna s-KL en ratolins 3xTg-AD als 6 mesos d'edat. Perfil d'expressió de klotho secretat (s-KL), amb l'anticòs K113, en còrtex prefrontal, còrtex, hipocamp i cerebel de ratolins 3xTg-AD als 6 mesos d'edat. Els gels van ser quantificats per densitometria i les columnes representen la mitjana \pm SEM dels valors individuals obtinguts (n=5-7). L'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada.

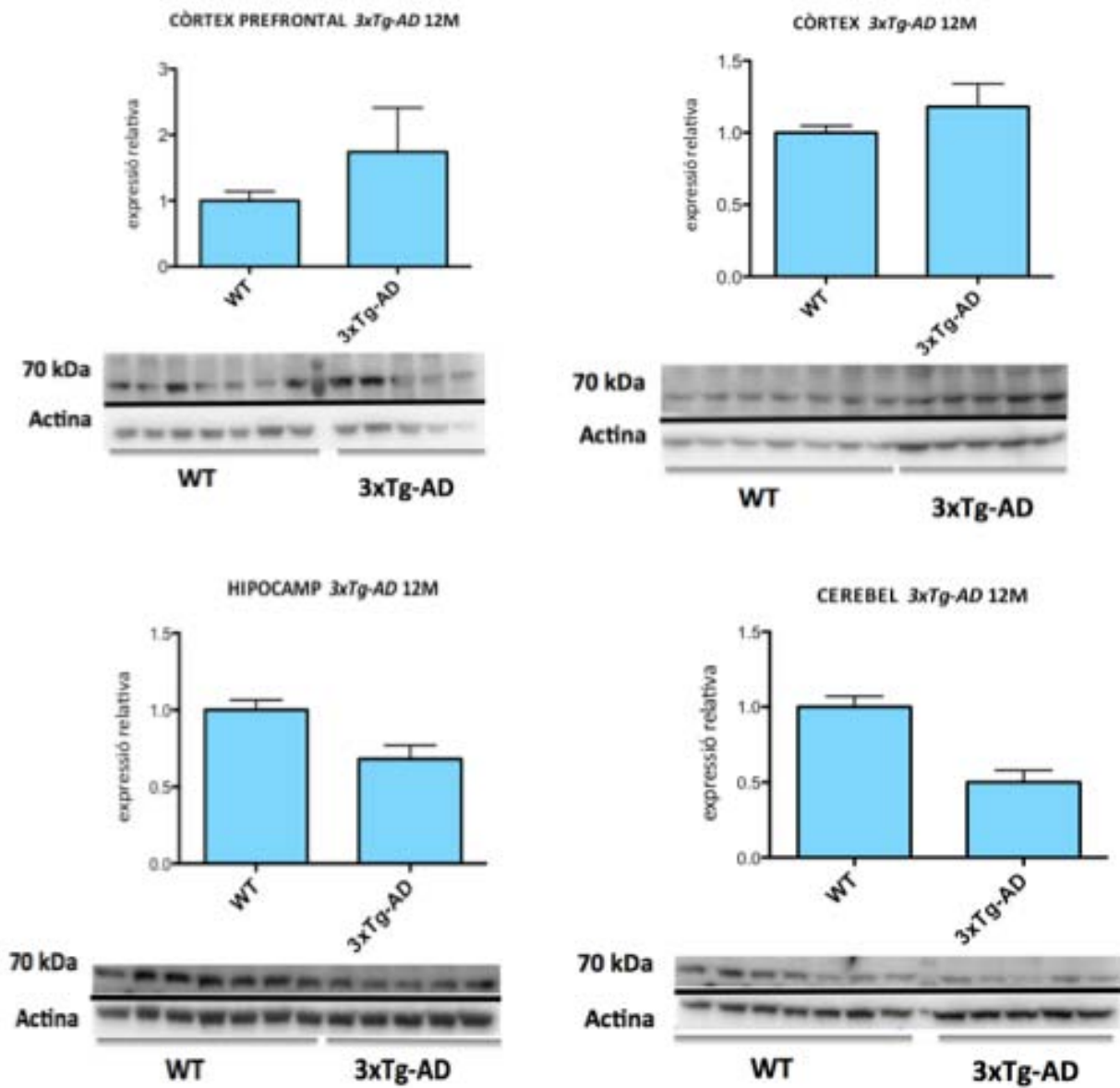


Figura 3.10- Anàlisi de l'expressió de la proteïna s-KL en ratolins 3xTg-AD als 12 mesos d'edat. Perfil d'expressió de klotho secretat (s-KL), amb l'anticòs K113, en còrtex prefrontal, còrtex, hipocamp i cerebel de ratolins 3xTg-AD als 6 mesos d'edat. Els gels van ser quantificats per densitometria i les columnes representen la mitjana \pm SEM dels valors individuals obtinguts (n=5-7). L'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada.

1.6. L'exercici voluntari constant i moderat durant l'etapa adulta és capaç de contrarestar la caiguda en l'expressió del transcrits s-KL i m-KL

L'exercici moderat constant es considera saludable per l'organisme, i especialment si es practica durant l'etapa adulta pot ser d'ajut en la prevenció, entre d'altres, de problemes musculars i cardiovasculars. De fet, alguns autors han hipotetitzat que la proteïna klotho podria respondre o es podria veure afectada per l'activitat física ja que es creu que els seus efectes vindrien mediat per factors de creixement com IGF-1. Donant suport a aquesta hipòtesi, un estudi recent suggereix un vincle entre la deficiència de klotho i el deteriorament muscular associat a l'edat [405] És més, s'ha pogut comprovar que l'exercici aeròbic augmenta els nivells de klotho en plasma [406]. Així, finalment i per completar el nostre estudi, es va voler analitzar si el fet de practicar exercici físic moderat i voluntari durant l'etapa adulta (a l'inici o un cop avançada) podia estar afectant d'alguna manera els nivells d'expressió de klotho en SNC. Per això, es va comparar el perfil d'expressió de dos grups de ratolins, de 6 i 12 mesos d'edat, els quals van estar exposats diàriament durant 3 mesos a un exercici voluntari gràcies a tenir disponible una "running wheel" en les gàbies, amb el de ratolins de la mateixa edat que no havien practicat exercici. De manera interessant, tal i com s'observa en la *Figura 3.11*, en aquells animals amb exercici, els nivells d'mRNA de s-KL i m-KL eren superiors que en els animals control, suggerint una possible correlació positiva entre un estat més saludable i nivells més elevats de s-KL i m-KL. És d'interès adonar-se que, tot i que aquesta correlació s'observa tant en animals joves com en animals d'edat avançada, l'efecte és més pronunciat en ratolins de 12 mesos d'edat, assolint uns nivells d'expressió de 8 i 17 vegades superiors d's-KL i m-KL respectivament en hipocamp comparat amb els controls sedentaris o sense exercici.

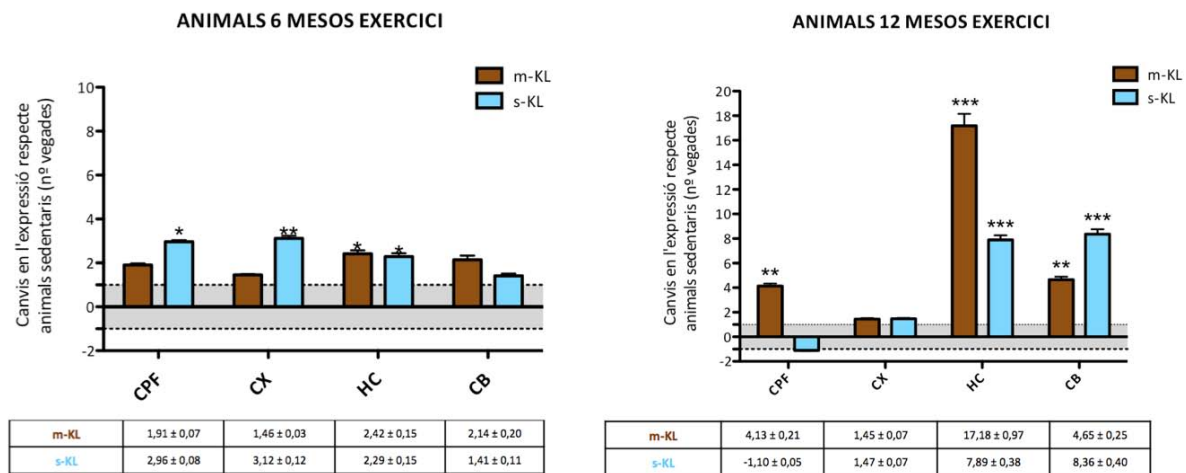


Figura 3.11- Anàlisi de l'expressió dels dos transcrits de klotho en ratolins que han practicat exercici voluntari moderat.

Perfil d'expressió de klotho en còrtex prefrontal, còrtex, hipocamp i cerebel de ratolins de 6 i 12 mesos que havien practicat durant 3 mesos exercici voluntari continu i moderat. Els animals adults joves van iniciar la pràctica d'exercici als 9 mesos i van ser sacrificats als 12 mesos d'edat. Els animals adults d'edat avançada van iniciar la pràctica d'exercici als 15mesos i van ser sacrificats als 18 mesos d'edat. L'exercici voluntari i moderat va consistir en 3 mesos d'accessibilitat a una "running wheel". Els animals control eren de la mateixa edat però sense cap tipus d'exercici.

No obstant, el patró d'expressió trobat per a s-KL i m-KL no és uniforme en les diferents regions analitzades, la qual cosa indica, de nou, no només una regulació temporal diferent, sinó també espacial, en cervell dels dos transcrits de klotho. Curiosament, tot i que els ratolins de 12 mesos van practicar menys exercici que els ratolins de 6 mesos, aproximadament un 50% menys (dades no mostrades), l'efecte, excepte en còrtex, va ser més significatiu en els ratolins d'edat avançada. D'altra banda però, quan es van analitzar els nivells de proteïna d's-KL, no es va poder detectar cap efecte de l'exercici, a cap de les edats estudiades, excepte en còrtex prefrontal, on en els animals de 6 mesos els nivells d's-KL es veuen augmentats 9 vegades respecte els controls ($p < 0,01$) (Figura 3.12).

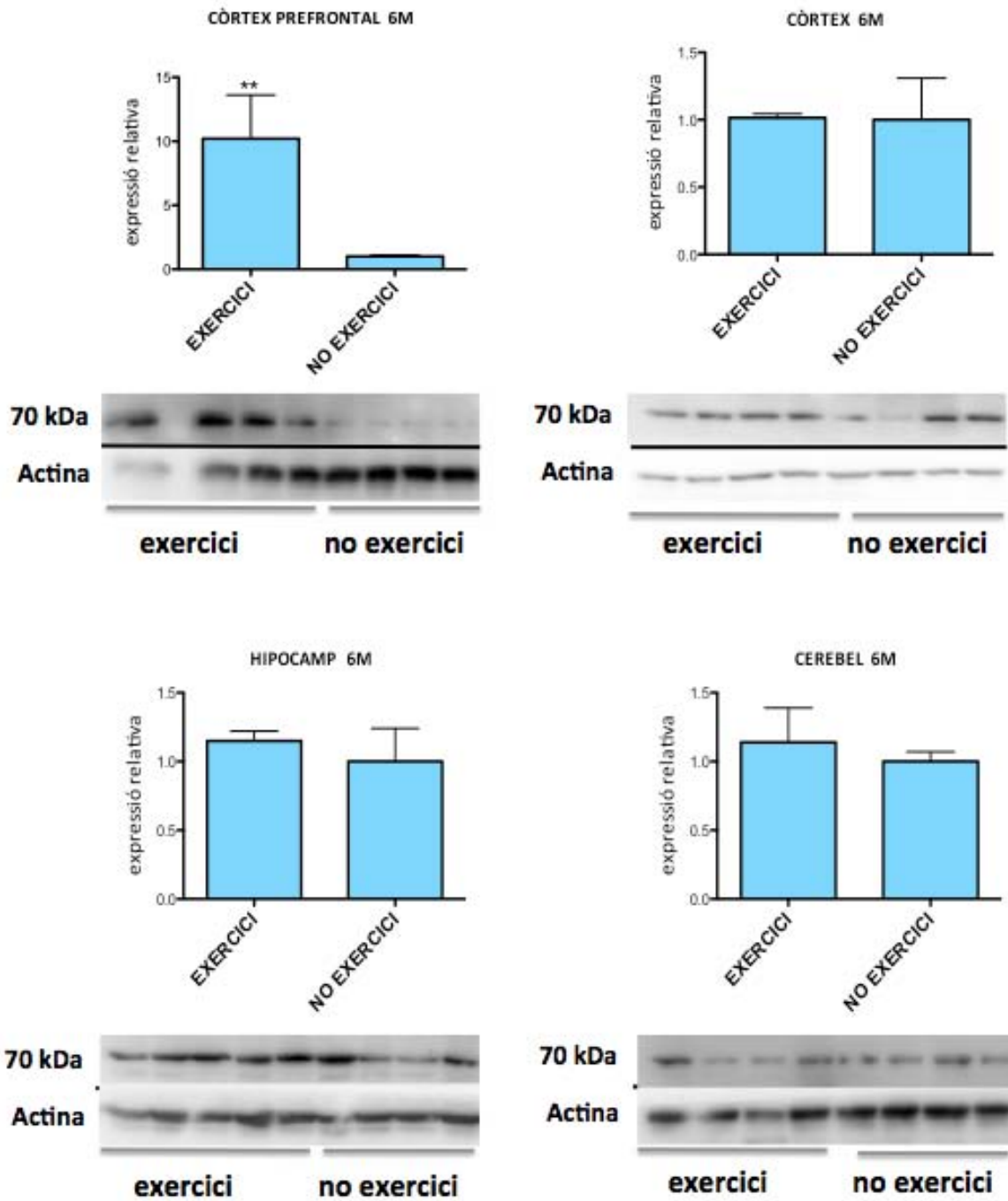


Figura 3.12- Anàlisi de l'expressió de la proteïna s-KL en ratolins C57Bl/6 de 6 mesos d'edat que han practicat exercici físic o no. Perfil d'expressió de klotho secretat (s-KL) en còrtex prefrontal, còrtex, hipocamp i cerebel de ratolins C57Bl/6 de 6 mesos d'edat que han practicat exercici físic durant tres mesos, respecte ratolins de la mateixa edat sedentaris. L'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada (n=4-5).

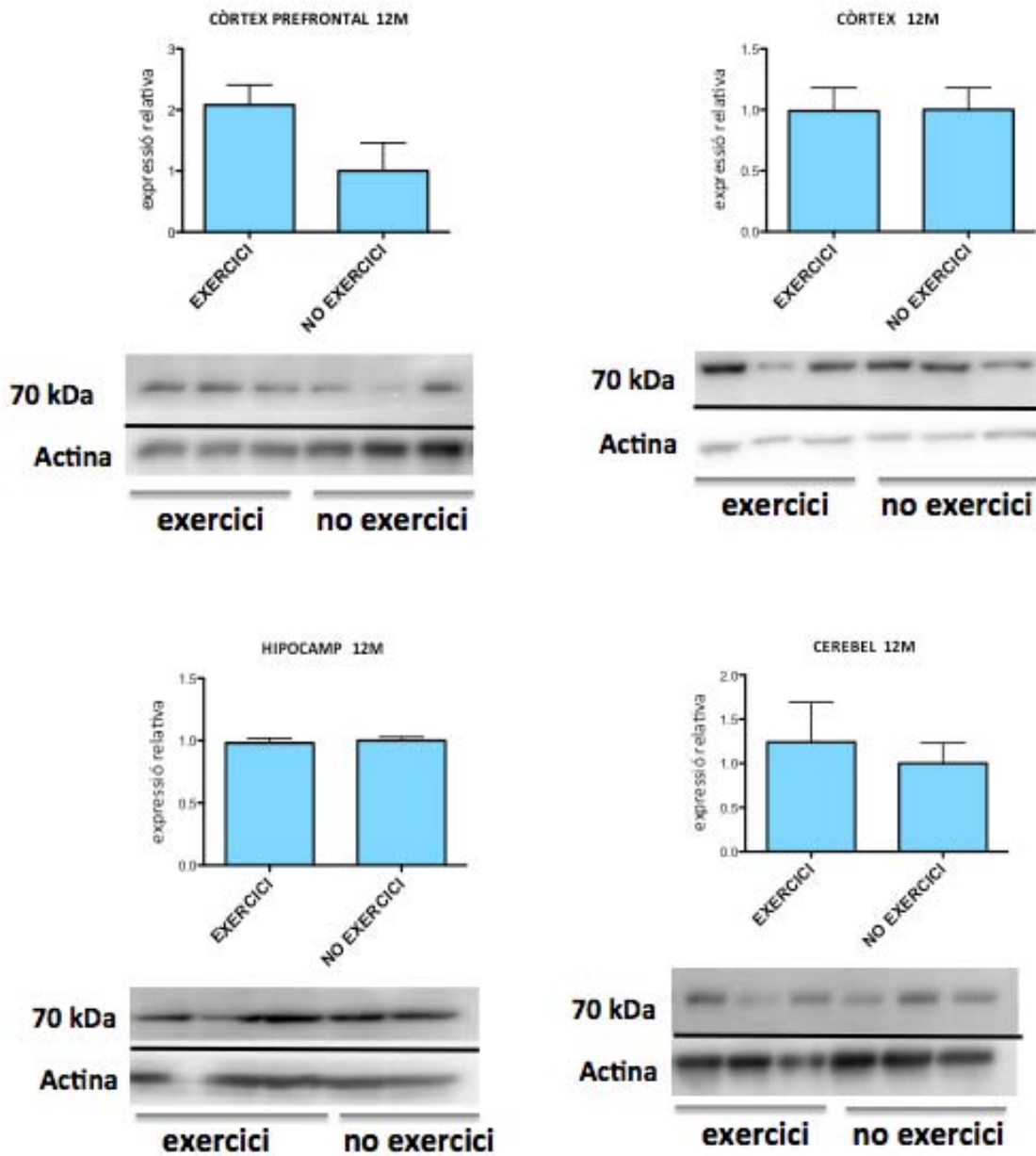


Figura 3.13- Anàlisi de l'expressió de la proteïna s-KL en ratolins C57Bl/6 de 12 mesos d'edat que han practicat exercici físic o no. Perfil d'expressió de klotho secretat (s-KL) en còrtex prefrontal, còrtex, hipocamp i cerebel de ratolins C57Bl/6 de 12 mesos d'edat que han practicat exercici físic durant tres mesos, respecte ratolins de la mateixa edat sedentaris. L'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada (n=4-5).

2. GENERACIÓ DELS VECTORS VIRALS PER MODIFICAR ELS NIVELLS DE KLOTHO EN SNC

2.1. Disseny i generació de vectors plasmídics codificants pels cDNAs de klotho

Tenint en compte resultats anteriors, en els quals s'observa, d'una banda una disminució en els nivells de la proteïna klotho durant l'envelliment, tant normal com patològic, i de l'altre, una expressió elevada en hipocamp, estructura implicada en processos d'aprenentatge i memòria, es va creure que klotho era un bon gen candidat pel tractament dels desordres cognitius associats a l'edat i a la malaltia d'AD, així en aquesta tesi doctoral es va decidir estudiar els efectes de sobreexpressar o inhibir klotho en SNC utilitzant vectors adenoassoociats.

Tot i així, quan ens vam posar a dissenyar el constructe codificant pel cDNA de klotho, ens va sorgir una qüestió important a tenir en compte: el fet de que existien dues isoformes d'aquest gen codificants per m-KL i s-KL, respectivament. Tal i com ja s'ha comentat, la forma transmembrana de klotho actua com a coreceptor d'FGF23, mentre que les formes solubles actuarien com a hormones circulants. Tot i així, els llocs de tall precisos en el processament de klotho es desconeixen. Actualment, se sap que klotho conté dos llocs de tall, un proper a la regió transmembrana i l'altre entre els dominis KL1 i KL2, però en el moment d'aquest disseny, existia un desconeixement del processament de la proteïna m-KL, molt poca bibliografia disponible sobre la forma s-KL generada per *splicing* alternatiu, així com també una certa paradoxa en relació a la nomenclatura utilitzada per designar les isoformes proteiques, p-KL (formada pels dominis KL1+KL2) i s-KL (formada únicament pel domini KL1 + cua d'aminoàcids específics). Per tot això, es va decidir incloure en el nostre treball l'estudi d'altres possibles isoformes proteiques de klotho, totes elles solubles, obtingudes per *splicing* alternatiu o per processament proteolític de la forma m-KL, algunes descrites i d'altres no (*Figura 3.14*). Per intentar simplificar el procés ens vam plantejar dissenyar un únic constructe de DNA (encarregat i generat per una companyia especialitzada) a partir del qual, mitjançant tècniques de clonatge molecular, es poguessin obtenir els cDNAs codificants per diverses isoformes de klotho. Davant la impossibilitat d'incloure en el nostre estudi les 8 isoformes diferents de klotho que ens van sorgir (*A, B, C, D, E, F, G i H Figura 3.13*), es va decidir, tenint en compte criteris de temps i de limitació en el nombre d'animals per als estudis de comportament, escollir 4 d'aquestes isoformes corresponents a m-KL, s-KL, p-KL i p-KL2 per a la producció de vectors virals i estudis *in vivo*. Tot i així, en futurs experiments seria interessant poder incloure també les 3 isoformes restants.

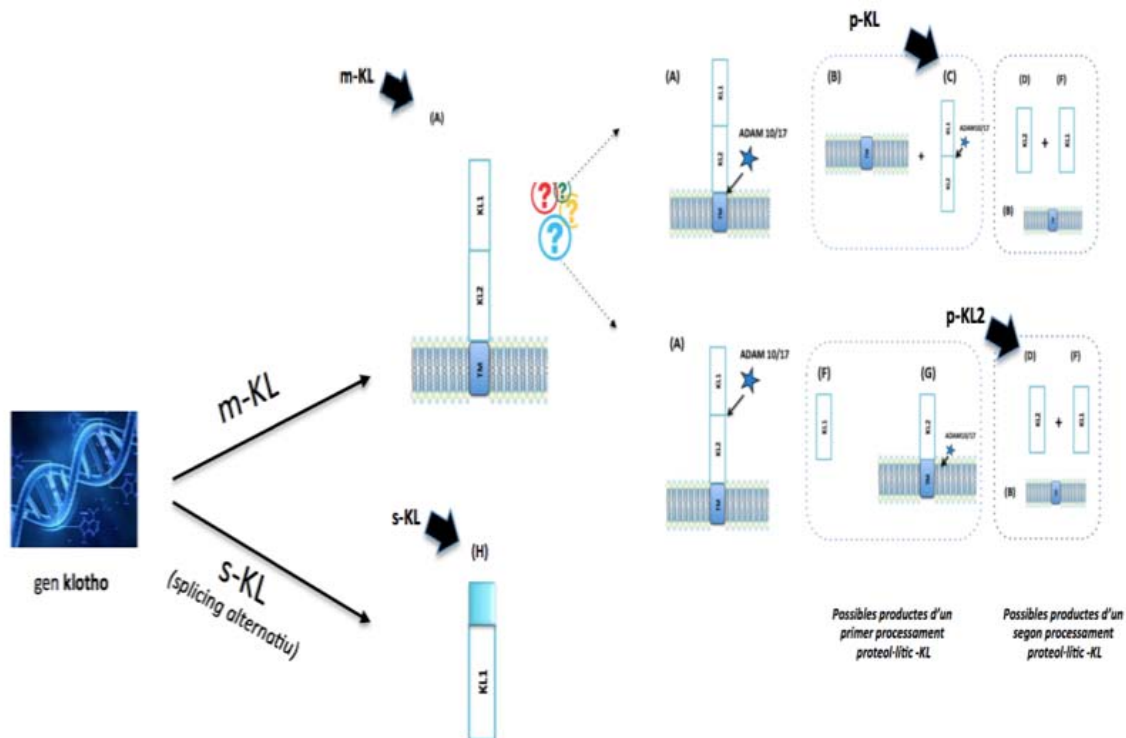


Figura 3.14- Esquema generat en aquest treball sobre les possibles formes proteiques de klotho obtingudes a partir d'un únic gen ja bé sigui per splicing alternatiu (H) klotho secretat, s-KL, o per processament proteolític de (A) klotho transmembrana, m-KL. En funció del primer lloc de tall de ADAM10/17, existeixen dos possibles processaments de m-KL que generen formes solubles intermèdies de klotho diferents. Si el primer tall es produeix entre el domini transmembrana i KL2, es genera una forma soluble p-KL (C) que s'ha trobat en CSF, orina i sang i el domini transmembrana (TM) encara ancorat a la membrana plasmàtica (B). En cas d'un segon processament de p-KL, es generarien els dominis solubles KL1 (p-KL1) i KL2 (p-KL2), (F) i (D), respectivament així com també (B). Per contra, si el primer tall té lloc entre els dominis KL1 i KL2, es genera (F) una forma soluble formada per el domini KL1 però sense la cua d'aminoàcids de la forma s-KL (p-KL1) i els dominis KL2+TM encara units a la membrana (G). En cas que G, sigui processada de nou, s'acabarien generant els mateixos productes finals: B, F i D.

Per tant, per a la generació dels vectors virals de teràpia gènica es va partir de dos constructes sintètics. El primer constructe *pCR-XL-TOPO-KL* (ImaGenesTM, Germany) codificava per la seqüència murina del cDNA (*full-length*) de la forma transmembrana de klotho (m-KL). Les seqüències gèniques de klotho van ser clonades per lligació amb enzims de restricció en el plasmidi *pGG2*, portador del genoma de l'AAV2 i un cassat d'expressió amb un lloc de clonació múltiple (MCS de l'anglès *multicloning site*) en el qual es clona el gen a expressar sota control de promotor CMV. Com es mostra en la *Figura 3.15*, la clonació no va ser directa i va caldre passar pel plasmidi intermedi *p123T* per orientar correctament el gen. El cDNA de m-KL va ser extret del vector *pCR-XL-TOPO-KL* utilitzant les dianes de restricció *XbaI/EcoRI* i fou clonat en el vector *p123T* utilitzant aquests mateixos enzims. Posteriorment, fent ús de les dianes *HindIII/NotI* el cDNA va ser extret del plasmidi

p123T i es va clonar en el cassat d'expressió gènica flanquejat per seqüències ITR del plasmidi *pGG2* sota control del promotor citomegalovirus (CMV) generant el plasmidi *pGG2-KL*.

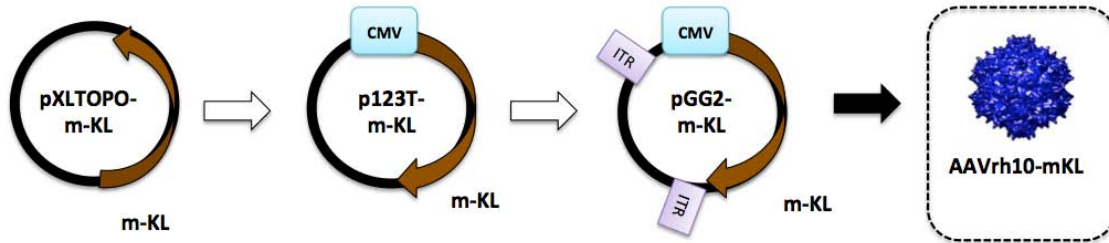


Figura 3.15- Estratègia de clonatge del cDNA de m-KL en el plasmidi per a producció d'AAVs pGG2.

D'altra banda, per a generar les isoformes restants, es va encarregar un segon constructe anomenat *pUC-KL.sintètic* (*GenScript, USA*), dissenyat per nosaltres, per a poder derivar-ne les seqüències codificants per s-KL, p-KL i p-KL2 (també p-KL1 tot i que no es va incloure en aquest treball) i estudiar-ne el seu paper i/o funció. Els principals motius pels quals es van escollir aquestes isoformes són entre d'altres: **(a)** s-KL: donada la seva importància en l'envelliment del SNC, i també perquè es tractava d'una proteïna fins ara no caracteritzada però amb potencial terapèutic; **(b)** p-KL: el processament de proteïnes de membrana és un pas crític en molts processos normals i patològics i la proteïna klotho és alliberada a sèrum i líquid cefaloraquídi per ADAM10 i ADAM17, les mateixes α -secretases encarregades d'alliberar el precursor amiloide APP. La seqüència de la forma proteolitzada de klotho codificant pels dominis KL1 + KL2 units (amb la diana de proteases *KKRKP* mutada per evitar un segon tall proteolític) ha de permetre estudiar la diferència entre s-KL i p-KL, sovint referenciades indistintament com a formes solubles de klotho. Perquè això fos així, es van haver d'introduir algunes petites modificacions en la seqüència original del gen (*MGI:1101771*) tal i com s'observa en la *Figura 3.16A*. Aquests canvis, inclouen la introducció de dianes (via substitució conservativa d'aminoàcids) per als enzims de restricció *PvuII* (just a l'inici de la cua d'aminoàcids de la forma s-KL) *Bsp120I* i *Nhe*, entre els dominis KL1 i KL2, que permetia clonar-los per separat i alhora interrompre la possible diana proteolítica descrita (*KKRKP*) per a ADAM10/17 per si es volien clonar junts; **(c)** p-KL2: conèixer si existeix un segon processament proteolític de la forma p-KL i estudiar similituds i diferències de funció amb s-KL (format pel domini KL1). Per tant, a partir d'aquest únic constructe i utilitzant enzims de restricció diferents va ser possible clonar en el plasmidi per generar AAVs (*pGG2*) els cDNAs de s-KL, p-KL i p-KL2.

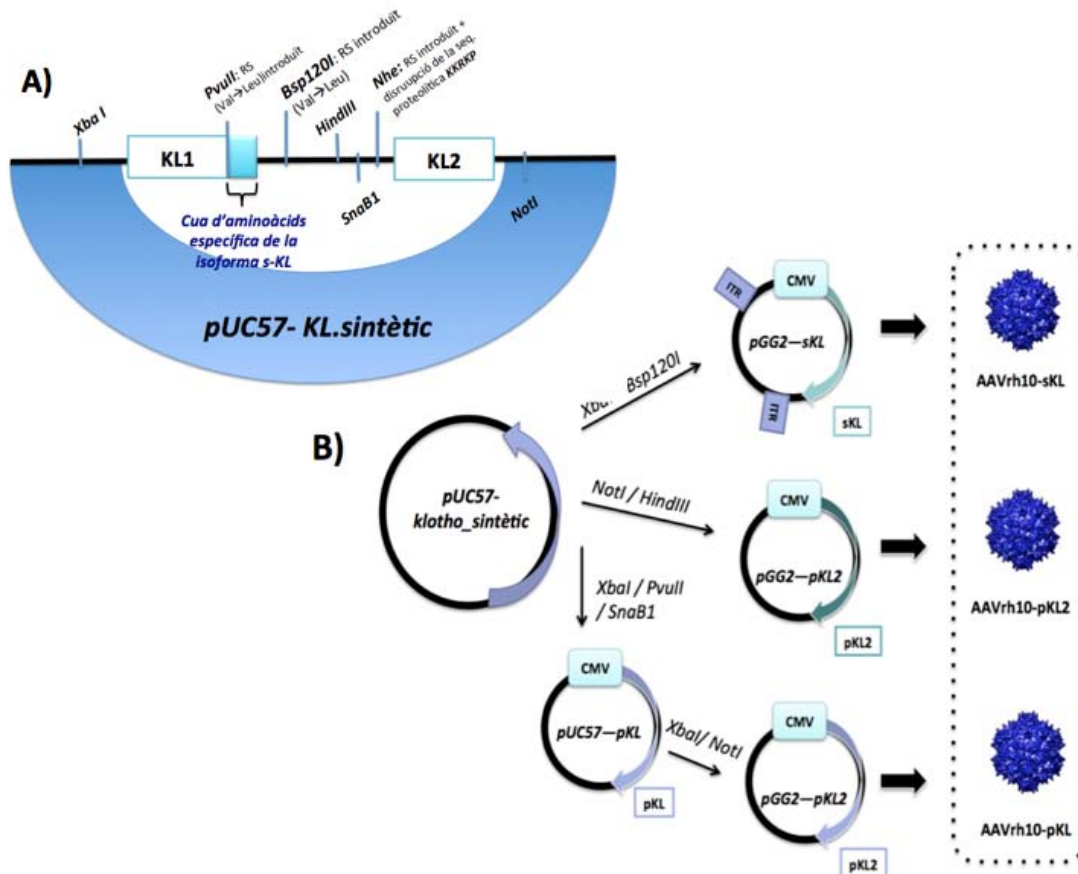


Figura 3.16- (A) Constructe *pUC57-KL.sintètic* codificant per la forma transmembrana de klotho (m-KL) dissenyat en aquest treball [RS:diana de restricció]. **(B)** Estratègia de clonatge dels cDNAs de s-KL, p-KL2 i p-KL en el plasmidi de producció d'AAVs pGG2.

Partint del plasmidi *pUC57-KL.sintètic* es van derivar els següents plasmidis per a la producció d'AAVs (Figura 3.16B):

- ***pGG2-s-KL***: L'insert s'obté utilitzant les dianes *XbaI/Bsp120I* compatibles amb les dianes *NotI/XbaI* que s'utilitzen per obrir el vector pGG2.
- ***pGG2-KL2***: Tant per treure l'insert com per obrir el vector s'utilitzen les dianes *NotI/HindIII*.
- ***pGG2-pKL***: Aquesta estratègia va ser la més complicada, requerint un pas intermedi de clonació. En primer lloc es va obtenir l'insert corresponent al domini KL1, sense la cua d'aminoàcids de la forma s-KL, mitjançant els enzims de restricció *XbaI/PvuII* i el mateix vector *pUC57-KL.sintètic* es va obrir amb els enzims *XbaI/SnaBI* de manera que els extrems generats eren compatibles. La lligació d'aquets dos fragments de DNA permet obtenir un plasmidi intermedi *pUC57-pKL* que codifica pels dominis KL1+KL2. En el següent pas, s'obté

específics per cadascun dels gens. Tal i com s'observa en la *Figura 3.18A* i en la *Figura 3.18B*, en el carril corresponent a les cèl·lules transfectades amb el constructe d'interès, és possible detectar una banda del tamany esperat, 130 bp i 118 bp per a m-KL i s-KL, respectivament. Per tant, els vectors plasmídics generats són capaços d'entrar a les cèl·lules i expressar correctament el gen d'interès. Finalment, els productes d'aquesta PCR van ser seqüenciats per assegurar la identitat de la seqüència dels gens clonats. El resultat van demostrar que els gens havien estat correctament clonats en els genomes virals, en absència de mutacions puntuals (*Figura 3.18C*).

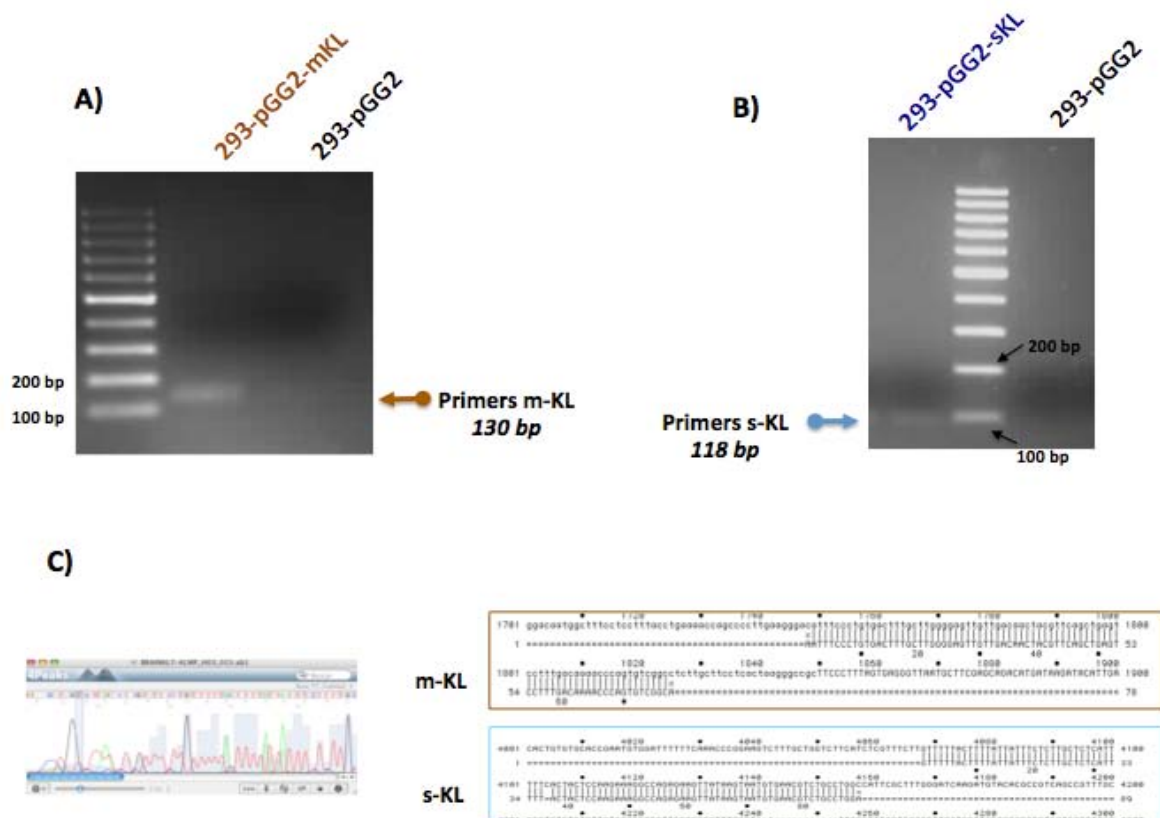


Figura 3.18- Comprovació dels vectors plasmídics generats portadors del cDNA de m-KL i s-KL per PCR i seqüenciació. (A) Gel d'agarosa al 2% on s'observa el producte de PCR (130bp) utilitzant primers específics per amplificar m-KL. **(B)** Gel d'agarosa al 2% on s'observa el producte de PCR (118bp) utilitzant primers específics per amplificar s-KL. **(C)** Seqüenciació d'ambdós productes de PCR on s'observa una identitat del 100% amb la seqüència gènica original.

2.2. Disseny i generació de vectors plasmídics codificants pels shRNAs de klotho

Per tal de investigar amb més detall el paper de klotho en SNC, es va decidir utilitzar molècules d' shRNAs per inhibir l'expressió de klotho (totes les isoformes o únicament la secretada, s-KL) amb la

finalitat d'obtenir un bon model que reproduís els efectes en la caiguda dels nivells de klotho a partir d'una certa edat.

2.2.1- Disseny i generació d'un vector AAV d'expressió d' shRNAs

En principi, clonar les seqüències codificants pels shRNAs en un vector plasmídic AAV és un procés simple i eficient. Tanmateix, donat que en el nostre laboratori no es disposava de cap plasmídic adequat per a la clonació i expressió de shRNAs, el primer que va caldre va ser dissenyar i generar-ne un, al qual se li va donar el nom de *pSMD2-TRLacZ-GFP*. Aquest constructe ofereix una gran versatilitat i comoditat permetent la clonació ràpida dels shRNAs en el genoma dels AAV. El constructe conté el promotor *H1 Pol-III* per a l'expressió dels shRNAs, que són introduïts gràcies a les dianes pels enzims *AgeI* i *BamHI*. Aquestes mateixes dianes, també permeten introduir el casset *TRLacZ* provinent del plasmídic *pSL1180-TRLacZ* dissenyat en el nostre laboratori (*Figura 3.19A*). Aquest sistema de selecció basat en *lacZ* permet identificar quins clons han incorporat el shRNA, ja que al perdre el gen *lacZ*, les colònies positives són blanques en plaques LB-Agar suplementades amb IPTG i X-gal. Així doncs, el clonatge esdevé més fàcil, sobretot tenint en compte el petit tamany dels shRNAs que fa que sigui molt difícil poder seleccionar els clons positius per diferència de tamany. A continuació es va inserir una seqüència *spacer* amb un stop per al promotor H1, més les dianes *XhoI* i *BglII* per incorporar el casset d'expressió del gen GFP (*Figura 3.19B*) provinent del plasmídic *pKSRSV-GFP*, el qual s'utilitzarà com a gen reporter. Finalment, a ambdós extrems d'aquest casset d'expressió, es van incloure les seqüències ITR d'AAV2, necessàries per a poder produir els virus.

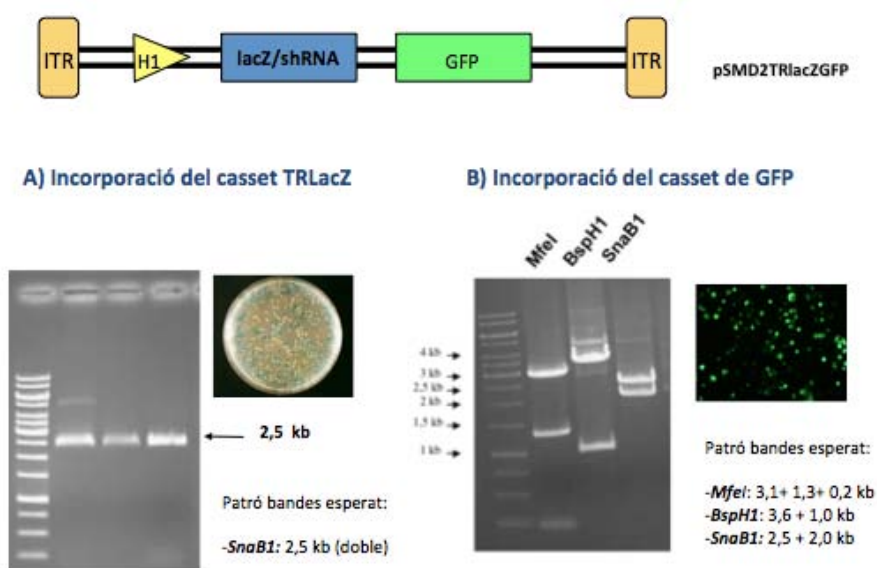


Figura 3.19- Generació d'un sistema plasmídic d'expressió d' shRNAs amb un gen reporter (GFP) i un sistema de selecció de clons positius per facilitar el seu clonatge.

2.2.2- Disseny i clonatge de les seqüències shRNA contra KL1 i s-KL en un vector AAV.

Per aprofundir en l'estudi de les isoformes m-KL i s-KL en SNC i la seva implicació en processos cognitius, es van obtenir seqüències d'shRNA diferents contra els diferents mRNAs de klotho. D'una banda, varis shRNAs contra la seqüència *full-length*, amb l'objectiu de silenciar m-KL. En paral·lel, també es va dissenyar un shRNA contra la cua d'aminoàcids específica de la forma s-KL. D'aquesta manera, es volia silenciar únicament la forma secretada però no la resta (m-KL o p-KL).

En el nostre cas, la selecció de les seqüències dels shRNAs es va dur a terme utilitzant el software disponible en xarxa per al disseny de RNAi. El funcionament d'aquests programes es basa en diferents algorismes que avaluen la seqüència del gen diana en búsqueda de seqüències susceptibles de ser processades pel complex RISC. Així doncs, es van obtenir 3 shRNAs per a silenciar l'expressió de klotho transmembrana. Per a s-KL, la seqüència diana del shRNA havia de trobar-se dins la cua extra d'aminoàcids que només inclou aquesta isoforma, perquè fos un silenciament específic. Donada aquesta limitació, només va ser possible derivar una seqüència d'shRNA (*Figura 3.20*).

- **shRNAs contra m-KL**

Seqüència <i>sense</i>	Posició en el gen (bp)
AACAACGTCTACCGCGACACA	504
AAGAATGACTGACTATAAAT	1034
CCTTACTTCGAGAAATGCGGG	1864

- **shRNA contra s-KL**

Seqüència *sense*: AACCCAGTGTCGGCCTCTTGC

- **shRNA Scrambled**

Seqüència *sense*: ATGCTAGGTACGCACATATGC

Figura 3.20- Seqüències sentit dels shRNAs obtingudes utilitzant les eines disponibles en xarxa.

Un cop es va disposar de les seqüències, el següent pas va consistir en dissenyar el constructe d'aquests shRNAs per permetre la seva clonació en un vector d'expressió. Els shRNAs són transcrits en la cèl·lula a partir d'un motlle de DNA com una molècula d'RNA de cadena senzilla (50-100 bases). Les regions complementaries estan separades per un petit '*loop*' que fa que el transcrit es plegui sobre si mateix formant una petita forquilla de manera anàloga a un microRNA. El reconeixement i processament per part de la maquinaria RNAi converteix el shRNA en el corresponent siRNA. Tal i com s'observa en la *Figura 3.21*, la seqüència general es basa sempre en una mateixa estructura

bàsica, composta per una diana *BamH1* a l'extrem 5', seguida d'una Guanina i dos nucleòtids aleatoris més; a continuació la seqüència diana d'uns 20 nucleòtids, complementaria a una zona del gen *klotho*, susceptible de ser processada pel complex RISC (antisentit); seguidament, l'estructura en forma de llaç o *loop*, una seqüència igual a la del gen *klotho* (sentit) que hibridarà amb l'antisentit, per formar la forquilla; i finalment l'estructura acaba amb l'addició de una seqüència de cinc Timidines i dos Guanines, i una diana *AgeI*.

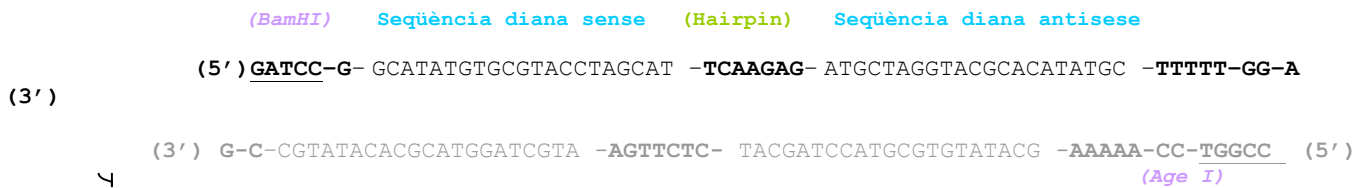


Figura 3.21- Oligonucleòtids complementaris *up* and *down* codificants per un shRNA *scrambled* en la orientació relativa en la que han de ser lligats en el vector *pSMD2-TRlacZ-GFP* digerit amb els enzims *BamH1* i *AgeI*.

Les seqüències sentit i antisentit dels diferents oligonucleòtids escollits van ser demanades amb grau de purificació dessalat al proveïdor (*Invitrogen*TM). Per facilitar el clonatge, les dianes dels extrems es van dissenyar amb l'estructura cohesiva pròpia de l'enzim de restricció amb el que es tallarà el vector (*BamH1* i *AgeI* en aquest cas). Les parelles complementaries es van hibridar i continuació es van lligar en el vector d'expressió *pSMD2-TRlacZ-GFP*. Després de transformar els constructes en *E.coli* quimiocompetents i fer créixer en plaques LB-Agar suplementades amb X-Gal i IPTG, es van picar les colònies blanques i es va comprovar si eren positives utilitzant l'enzim *FspI*, ja que permetia diferenciar entre clons positius i parentals (*Figura 3.22*). D'aquesta manera, es van generar els següents plasmidis finals: *pSMD2-shmKL1-GFP*, *pSMD2-shmKL2-GFP*, *pSMD2-shmKL3-GFP* i *pSMD2-shsKL-GFP*.

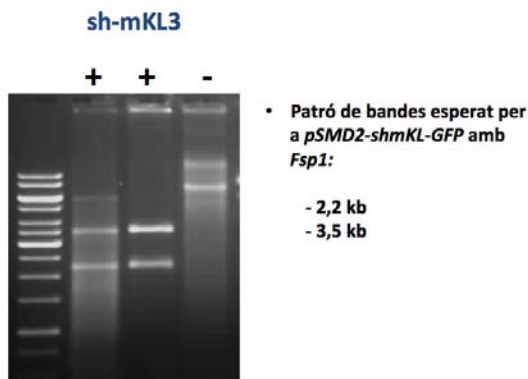


Figura 3.22- Digestions de comprovació amb l'enzim *Fsp1* del plasmidi generat *pSMD2-shmKL3-GFP* portador d'un shRNA contra m-KL..

A més, que també es va dissenyar un shRNA *scrambled*, de seqüència random, com a control en aquests estudis per examinar l'efecte de la transducció/transfecció dels shRNAs en l'expressió gènica. Aquesta seqüència d'shRNA és capaç d'activar el complex RISC i activar la via de RNAi, però no té com a diana cap gen humà o de ratolí.

2.2.3- Estudi de l'eficiència dels shRNAs *in vitro*

Després del clonatge de les tres parelles d'shRNAs contra m-KL, l'shRNA contra s-KL i l'shRNA *scrambled*, es va fer un petit estudi *in vitro* per valorar l'eficiència de silenciament de cadascun d'ells. Així, es van transfectar cèl·lules 293QB amb cadascun dels constructes generats juntament amb un vector que expressa el cDNA del gen diana en una proporció 1:100 (cDNA: shRNA). Passades 72 hores, es van recollir les cèl·lules i es va dur a terme una extracció d'RNA, el qual va ser retrotranscrit per realitzar una PCR quantitativa. D'aquesta manera, es va poder comprovar que tots els shRNAs dissenyats contra m-KL presentaven una certa eficiència de silenciament, essent l'shRNA-3 el que tenia més poder d'inhibició. Així, en les condicions experimentals utilitzades la caiguda en l'expressió m-KL quan s'utilitzen les seqüències dels shRNA-1 i l'shRNA-2 és d'aproximadament el 50% mentre que amb l'shRNA-3 s'arriba a una eficiència de silenciament *in vitro* de més del 80%, i per tant, va ser l'escollit per a la producció del vector viral. Al tractar-se d'un shRNA amb seqüència diana en el domini KL2, únicament afectarà l'expressió de m-KL i no pas s-KL. D'altra banda, també es va poder comprovar que l'shRNA dissenyat per silenciar de manera específica s-KL, mostrava una eficiència de silenciament elevada, que arribava al 80% (Figura 3.23).

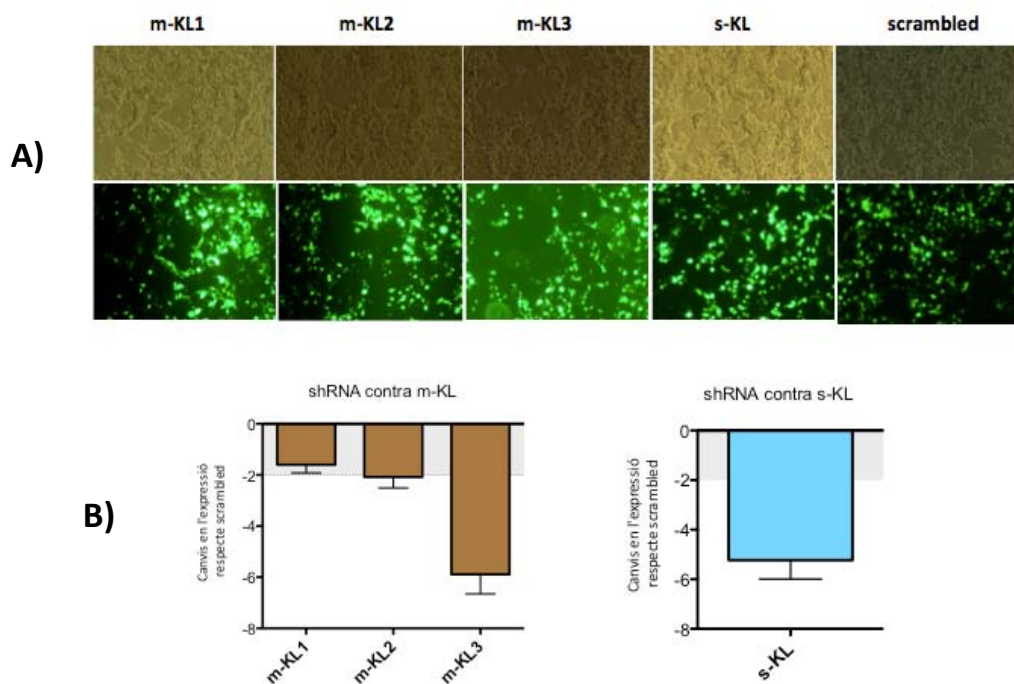


Figura 3.23- Comprovació de l'eficiència de silenciament dels shRNAs contra m-KL i s-KL. Les cèl·lules 293QB van ser transfectades amb els plasmidis codificants pels diferents shRNAs: pSMD2-mKL1-GFP, pSMD2-mKL2-GFP, pSMD2-mKL3-GFP, pSMD2-sKL-GFP i pSMD2-scrambled-GFP. **(A)** Fotografies de les cèl·lules 293QB transfectades en camp clar i amb fluorescència. El grau de transfecció és del 50% aproximadament. **(B)** Resultat de la qPCR de les cèl·lules transfectades expressada com la ratio entre els nivells d'expressió de m-KL o s-KL de les cèl·lules transfectades amb els plasmidis shRNAs contra klotho i les cèl·lules transfectades amb el plasmidi scrambled, normalitzant respecte el gen *housekeeping* 36B4.

2.3. Producció dels vectors virals AAVs codificants pels cDNAs/shRNAs de klotho

Un cop es va disposar dels vectors plasmídics *pGG2-mKL*, *pGG2-sKL*, *pGG2-pKL* i *pGG2-pKL2*, així com també dels plasmidis codificants pels shRNAs, *pSMD2-shmKL3-GFP*, *pSMD2-shsKL-GFP* i *pSMD2-shscrambled-GFP* es va dur a terme la producció dels corresponents vectors adenoassociats. Per fer-ho, es va utilitzar el sistema de la triple transfecció amb el plasmidi portador del transgèn en el genoma AAV, el plasmidi portador dels gens adenovirals necessaris per a l'amplificació de l'AAV (*pXX6*), i el plasmidi portador de les seqüències *Cap* i *Rep* de l'AAVrh10 (*pRep2Cap10*). Els virus van ser purificats per ultracentrifugació en gradient de iodixanol, varen ser titulats mitjançant el mètode *picogreen*, i es van emmagatzemar a -80°C fins el moment de ser utilitzats *in vivo*.

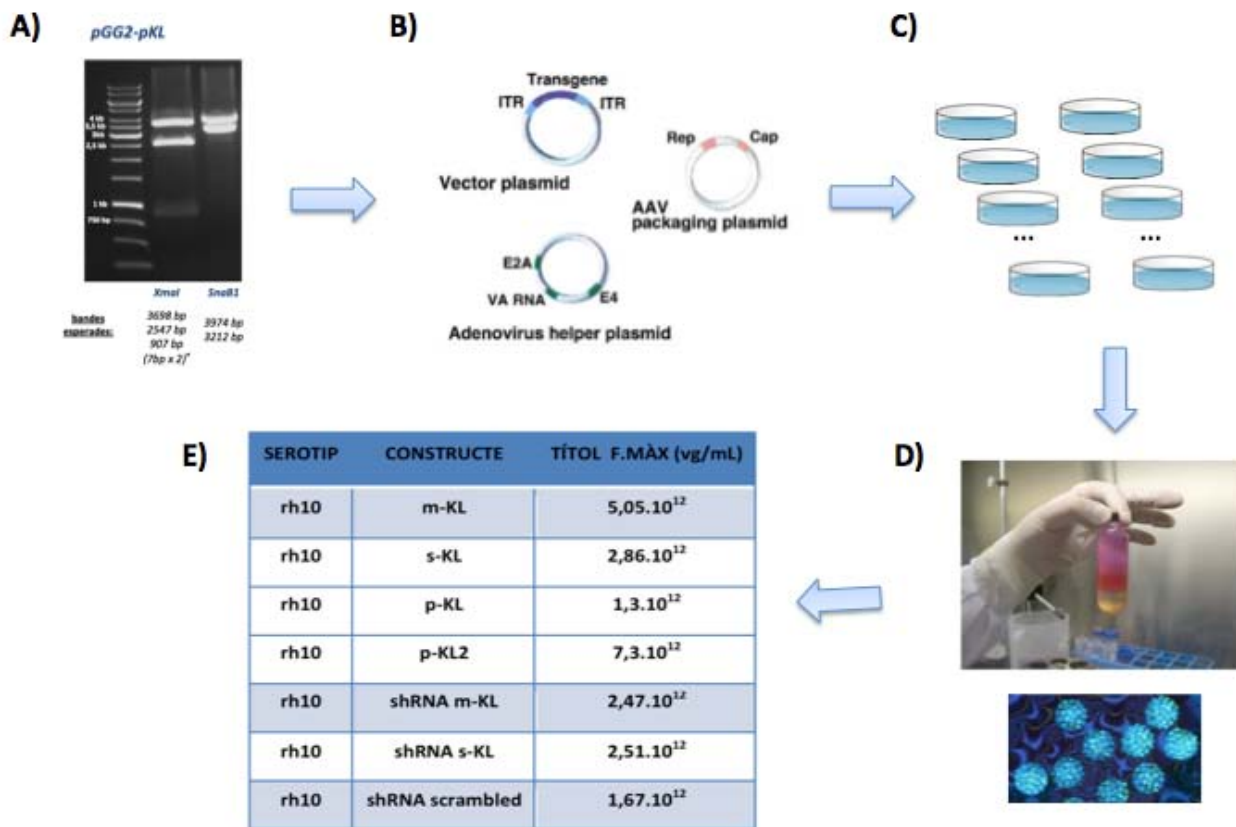


Figura 3.24- Producció dels virus adenoassociats (AAV) portadors dels cDNAs/shRNAs de klotho. (A) Comprovació de l'absència de recombinació de les seqüències ITRs dels plasmidis portadors del genoma AAV amb el constructe d'interès clonat amb els enzims *XmaI* i *SnaBI*. (B)(C) Triple transfecció en cèl·lules 293AAV. (D) Purificació del virus per gradient de densitat en iodixanol. (E) Titulacions dels AAVrh10 generats en aquest treball portadors dels diferents constructes d'interès.

2.4- Caracterització *in vitro* dels AAVs portadors dels cDNAs/shRNAs de klotho

Per assegurar que les produccions virals són efectives en la transducció gènica, es va dur a terme una prova *in vitro* per valorar la capacitat infectiva dels vectors virals generats. Per els virus portadors del cDNAs (m-KL i s-KL) es van infectar cèl·lules 293QB a dues concentracions de virus diferents: 5000 vg/cèl o 10000 vg/cèl. Com a control, es va utilitzar un virus AAVrh10-GFP. Passades 48 hores, es va extreure l'mRNA de les cèl·lules infectades i es va fer una PCR quantitativa per analitzar els nivells d'expressió dels gens d'interès. Tal i com s'observa en la *Figura 3.25A*, existeix un efecte dosi-resposta a la quantitat de virus i s'eleva els nivells d'expressió del gen diana entre 3-15 vegades en funció de la condició analitzada. En el cas dels virus portadors dels shRNAs, com que ja s'havia comprovat *in vitro* la seva eficiència de silenciament, es va testar la seva infectivitat aprofitant el fet

de que expressen GFP. Així doncs, es van infectar cèl·lules i 48 hores post-injecció es va comprovar per fluorescència que les cèl·lules expressaven GFP (Figura 3.25B).

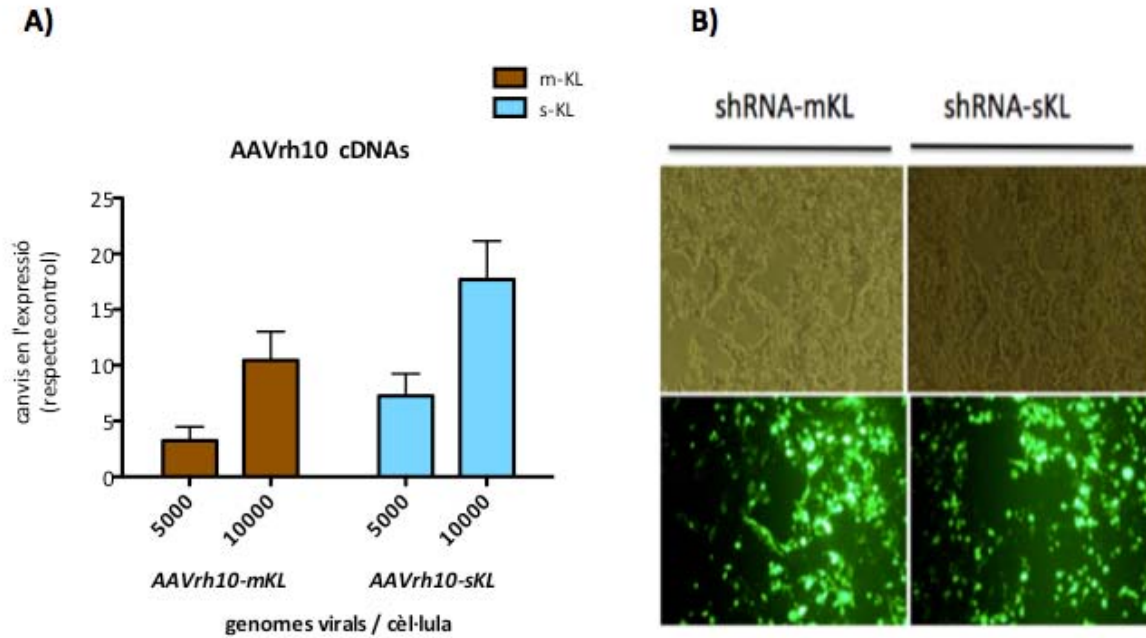


Figura 3.25- Caracterització dels virus adenoassociats generats. (A) qPCR de cèl·lules 293QB infectades amb virus portadors dels cDNAs de m-KL i s-KL a dos dosis diferents. (B) Fotos en camp clar i fluorescència (10X) de cèl·lules 293QB infectades amb els virus portadors dels shRNAs.

3. ESTUDIS *IN VIVO*: ANÀLISI DEL PAPER NEUROPROTECTOR DE KLOTHO MITJANÇANT TRANSFERÈNCIA GÈNICA EN SNC

Tenint en compte l'envelliment continu de la població i que l'edat és el principal factor de risc per al dèficit cognitiu i el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer (AD), la búsqueda de factors neuroprotectors que puguin contrarestar les alteracions cognitives associades a l'edat, esdevé una repte cada cop més urgent.

Basant-nos en les següents hipòtesis prèvies:

- a) Klotho és un modulador clau del procés d'envelliment;
- b) La sobreexpressió de klotho (ratolí transgènic per a klotho) incrementa l'esperança de vida, augmenta la plasticitat sinàptica i millora les capacitats cognitives;
- c) En humans la variant al·lèlica del gen klotho KL-VS en heterozigosi està associada a unes millors capacitats cognitives;
- d) Els nivells de klotho en CSF d'AD es veuen disminuïts;
- e) L'increment dels nivells de klotho en un model murí d'AD (hAPP/KL) millora les funcions sinàptiques i cognitives;

així com també els nostres propis resultats obtinguts en aquest estudi on s'observa una disminució de l'expressió de klotho en diferents regions cerebrals durant l'envelliment (normal i patològic), vam creure interessant caracteritzar els efectes conductuals de l'increment i/o inhibició dels nivells de klotho en SNC en ratolins *wild-type*, mitjançant els vectors virals de teràpia gènica anteriorment generats, per valorar el seu possible efecte neuroprotector.

3.1- Estudi en ratolins d'edat avançada (12 mesos)

En primer lloc, es va dur a terme un experiment amb el qual es pretenia estudiar si l'increment dels nivells endògens de klotho en ratolins *wild-type* de 12 mesos, era capaç de revertir alguna de les alteracions conductuals associades a l'edat i per tant, tenir un potencial benefici terapèutic en AD i altres desordres cognitius.

3.1.1- Disseny experimental

Per valorar els efectes conductuals de la sobreexpressió de diverses isoformes de klotho en SNC es van fer servir ratolins C57Bl/6 adults, que van ser injectats als 12 mesos d'edat i testats en una bateria de proves de comportament als 18 mesos d'edat. En quant al sexe dels animals, es va decidir treballar amb mascles, per tal d'evitar possibles interferències dels cicles hormonals (sobretot estrògens) sobre els processos cognitius.

Així, es va dissenyar un protocol *in vivo* amb 5 grups experimentals, amb una n=10 per a cadascun dels grups, adient per a estudis de comportament. El grup control o *Null* va ser injectat amb un vector codificant per una seqüència de DNA irrellevant, de manera que els animals d'aquest grup passen com la resta per el procés d'anestèsia i operació (administració del virus), però no sobreexpressen cap gen. A més, en l'experiment es van incloure 4 grups tractats amb diverses isoformes de klotho: la forma transmembrana de klotho (m-KL), la forma secretada (s-KL), la forma proteolitzada KL1+KL2 (p-KL) i la forma p-KL2 respectivament (*Figura 3.26*). Cal comentar que alguna d'aquestes isoformes de klotho no es troben descrites en bibliografia com a tals, però ens va semblar interessant incloure-les també en aquest estudi. Per exemple, en el cas de s-KL, en aquest treball s'ha pogut demostrar per primera vegada que existeix com a proteïna estable, és més, que els seus nivells d'expressió en SNC són elevats, però fins ara és desconegut per complet la seva funció. La isoforma p-KL2 tampoc se sap si s'arriba a generar després del processament de m-KL encara que treballs recents així ho indiquen [277].

Els vectors virals van ser injectats intraventricularment per mimetitzar el sistema de producció endògen, ja que el plexe coroides és el principal òrgan productor de klotho en SNC, des d'on s'allibera al CSF i es distribueix per tot el cervell. També es va valorar el fet que un dels cDNAs, s-KL, codifica per una proteïna secretada de manera que la producció en CSF permet assegurar una bona distribució per tot el parènquima cerebral. La ruta intraventricular és una de les més utilitzades i consisteix en l'administració directa en CSF, en el tercer ventricle lateral del cervell. La dosi administrada fou de $1 \cdot 10^{10}$ vg/ratolí en un volum final de 3 μ L i una única injecció emprant un aparell esterotàxic (veure *Materials i Mètodes*).

La resposta conductual es va analitzar mitjançant una àmplia bateria de proves de comportament amb la que es van valorar els efectes del tractament sobre les funcions sensiomotors, l'activitat exploratòria, l'ansietat, neofòbia i l'aprenentatge i la memòria. L'ordre de les proves va ser el

següent: proves sensoriomotors (Dia 1), test de les cantonades seguit del camp obert (Dia 2), el test en laberint en T (Dia 3-5), i el laberint aquàtic de Morris (Dia 6-12).

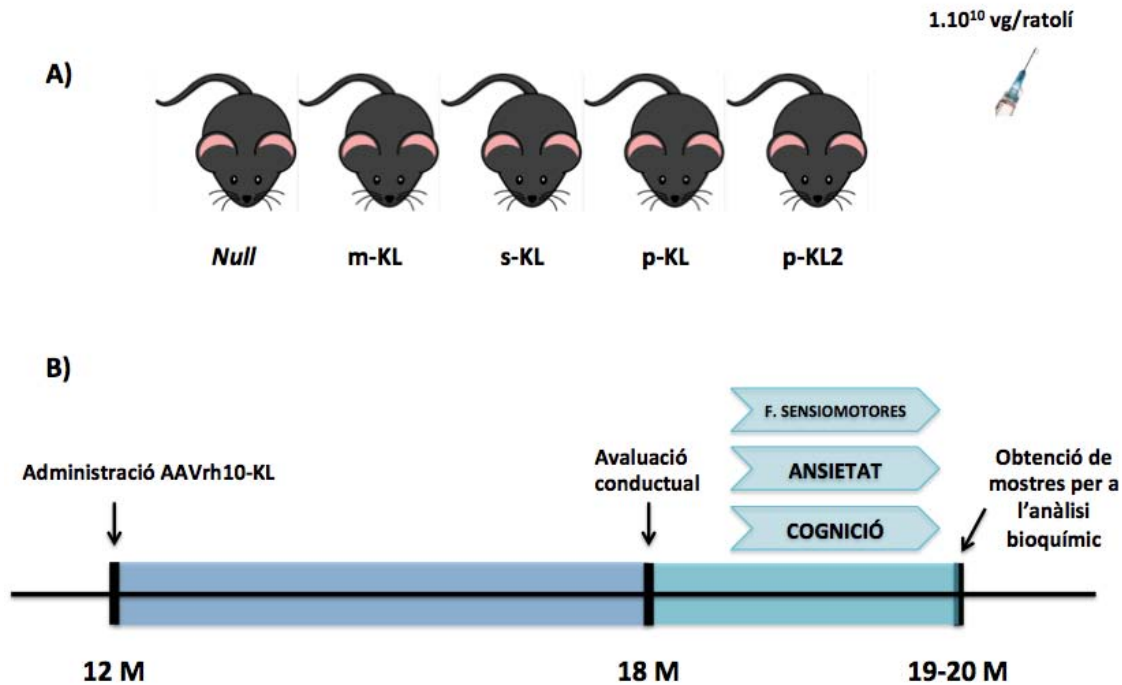


Figura 3.26- Disseny experimental de l'estudi *in vivo* en ratolins de 12 mesos d'edat. **(A)** Grups experimentals (n=10): Null (control), m-KL, s-KL, p-KL, p-KL2. **(B)** Esquema temporal de l'estudi. Els animals són injectats als 12 mesos d'edat amb els diferents vectors adeno-associats i als 18 mesos se sotmeten a una bateria de tests de comportament.

3.1.2.- Dades de supervivència i pes corporal.

Degut a problemes amb l'anestèsia i/o complicacions derivades de la injecció dels vectors virals alguns animals van morir. A més, durant els sis mesos en que els animals es van mantenir injectats, es van produir algunes morts, naturals o bé forçades quan els animals presentaven problemes de salut greus. En termes generals, es creu que aquesta baixa supervivència en la franja que compren els 15-18 mesos d'edat és un fenomen intrínsec l'envelliment i que no és conseqüència directa dels efectes que pugui tenir l'expressió dels vectors virals injectats. Donat que als 18-19 mesos va ser l'edat escollida per realitzar els estudis de conducta, el nº d'animals disponibles va quedar notablement reduït.

Mortalitat dels animals			
Grup	12 mesos	18 mesos	20 mesos
	Administració vectors	Inici tests comportament	Final experiment
Null	0	1	1
m-KL	2	1	1
s-KL	1	3	0
p-KL	3	1	2
p-KL2	0	5	1

Taula 3.1- Dades de mortalitat en l'experiment amb animals injectats als 12 mesos i testats en la bateria de proves de conducta als 18 mesos.

Les dades obtingudes pels grups p-KL i p-KL2 no seran mostrades, ja que s'entén que no se'n poden extreure conclusions solides degut a la gran variabilitat en els resultats i a una $n < 5$. No obstant, en el disseny de futurs experiments es considera important tenir en compte aquestes dues isoformes de la proteïna klotho per poder-ne estudiar la funció, especialment en SNC. Per tant, en aquest treball únicament es mostraran i discutiran els resultats o corresponents al grup control o *Null*, al grup m-KL i al grup s-KL amb unes "n" finals de 8, 6 i 6 ratolins respectivament.

D'altra banda, durant els 6 mesos que va durar l'experiment, es va fer un seguiment mensual del pes corporal, obtenint una gràfica amb el perfil de pesos corresponent a la franja que va entre els 12 i els 19 mesos d'edat. Tal i com mostra la *Figura 3.27*, no es detecten diferències entre grups i de fet el perfil és molt similar: té lloc un increment moderat del pes corporal fins als 15 mesos d'edat, moment corresponent al pes màxim. Ja a edats avançades, el pes corporal tendeix a disminuir.

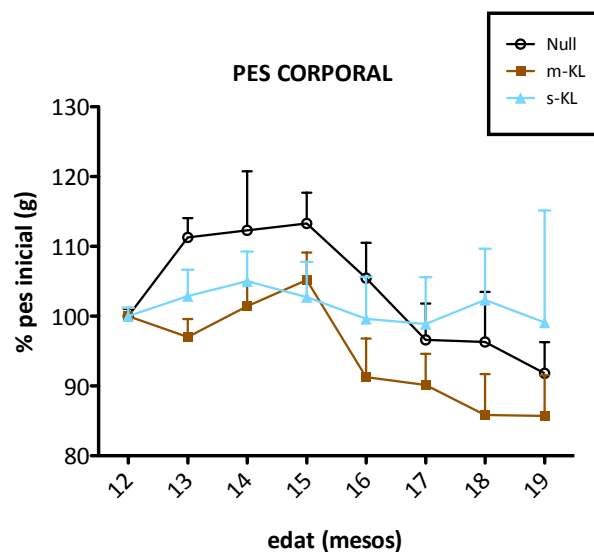


Figura 3.27- Evolució del pes corporal. Representat com a % del pes inicial dels diferents grups experimentals durant els 6 mesos injectats amb els corresponents virus (null, m-KL, s-KL) [T-Student].

3.1.3- Funcions sensoriomotores.

En primer lloc, es van realitzar una sèrie de proves per examinar la condició física dels animals als 18 mesos d'edat i detectar possibles diferències entre grups que poguessin afectar els test de memòria posteriors. Aquestes proven inclouen la barra de fusta, la barra metàl·lica i la prova del penja-robes per mesurar la força física i l'equilibri dels animals. També es va valorar el reflex visual dels animals, apropant-los lentament a una superfície negra i comprovant l'extensió de les extremitats davanteres per no topar amb el morro. En la prova del reflex visual (tres assajos consecutius) es va observar que el 100% dels animals mostraven resultats positius identificant correctament la proximitat de la planxa, i van ser puntuats amb el valor "1". En les proves d'equilibri (dos assajos de 20 segons) els animals van ser situats en el centre d'una barra horitzontal cilíndrica de fusta suspesa uns 40 cm i es va mesurar la latència de caiguda. El mateix experiment es va repetir utilitzant una barra horitzontal cilíndrica, però en aquest cas metàl·lica. Per últim, es va avaluar la coordinació motora en la prova de la perxa metàl·lica (*coat hanger test*). Es van realitzar dos assajos de 5 segons i un de 60 segons i es va mesurar la latència de caiguda. En cadascun dels tests i per a cada animal, es va agafar la millor marca dels diversos assajos.

Els resultats obtinguts (*Taula 3.2*) no mostren diferències significatives entre els grups tractats i el grup control, així doncs, tots els animals es troben en igualtat de condicions físiques i que per tant, no existeixen diferències entre grups experimentals que puguin estar influïent en els resultats de la resta de proves de conducta.

Funcions sensiomotores dels animals injectats			
	Null	m-KL	s-KL
Reflex visual	3 /3	3/3	3/3
Barra de fusta (s)	19 ± 1	16 ± 1,89	17,86 ± 1,25
Barra metàl·lica (s)	3,5 ± 0,67	2,42 ± 0,57	3,21 ± 1,19
Perxa (s)	12,71 ± 7,39	18,14 ± 8,16	6,25 ± 1,91

Taula 3.2- Taula resum dels valors obtinguts en l'avaluació de les funcions sensoriomotores: reflex visual, equilibri i coordinació motora (latències de caiguda). Mitjana ± SEM. [T-student].

3.1.4- Ansietat i neofòbia.

Canvis en l'ansietat, i en l'activitat locomotora o exploratòria, podrien estar influenciant la conducta dels animals en altres tests, per exemple proves d'aprenentatge, com el laberint aquàtic de Morris. Així doncs, es va creure important incloure aquestes mesures com a part de la bateria de tests de comportament, per tal de facilitar la interpretació global dels resultats de comportament.

3.1.4.1. Test de les cantonades (*Corner Test*).

En la *Figura 3.28*, es representa tant el nombre total de cantonades explorades com l'activitat vertical que realitzen els animals durant els 30 segons que dura el test. Pel que fa al nombre de cantonades explorades (*corners*, en anglès), s'observa que en el grup m-KL els ratolins presenten una major conducta exploratòria ($p=0,046$) respecte al grup control, i tot i que aquesta mateixa tendència a l'alça es pot veure també en el grup s-KL, la diferència no esdevé significativa estadísticament ($p=0,13$). D'altra banda, quan s'analitza l'activitat vertical, és a dir, el nombre total d'aixecaments o exploracions verticals (*rearings*, en anglès) no s'observen diferències significatives. Per tant, els resultats suggereixen que la sobreexpressió de m-KL, però no la de s-KL, en SNC incrementa l'activitat exploratòria i locomotora (horitzontal i vertical).

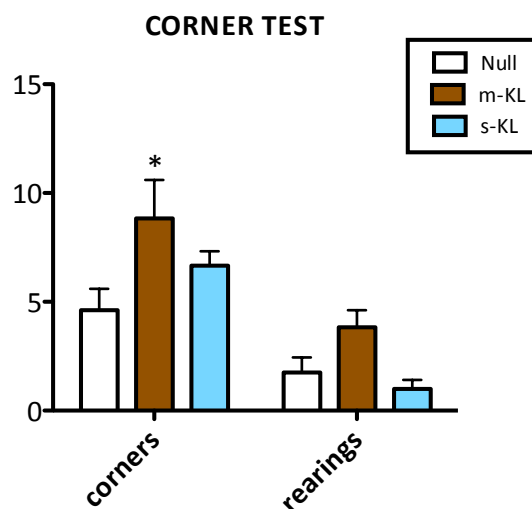


Figura 3.28- Avaluació conductual en el test de neofòbia (*Corner test*). Nombre total de cantonades explorades i d'aixecaments verticals durant la sessió. [T-Student: * $p < 0,05$ vs. control].

3.1.4.2. Avaluació de l'activitat en un ambient nou: camp obert

La prova de camp obert va ser desenvolupada per estudiar la neòfobia i ansietat i és la més utilitzada per mesurar qualitativa i quantitativament l'activitat locomotora general i la voluntat d'explorar en rosegadors [407]. El nombre d'aixecaments verticals (*rearings*), així com la distància horitzontal recorreguda són els paràmetres usats per avaluar l'activitat dels ratolins. Alhora, aquest test també pot ser usat per avaluar l'ansietat, si s'inclouen mesures addicionals com la latència a moure's, el nombre de *groomings*, el temps passat en el centre del camp o els primers minuts d'activitat.

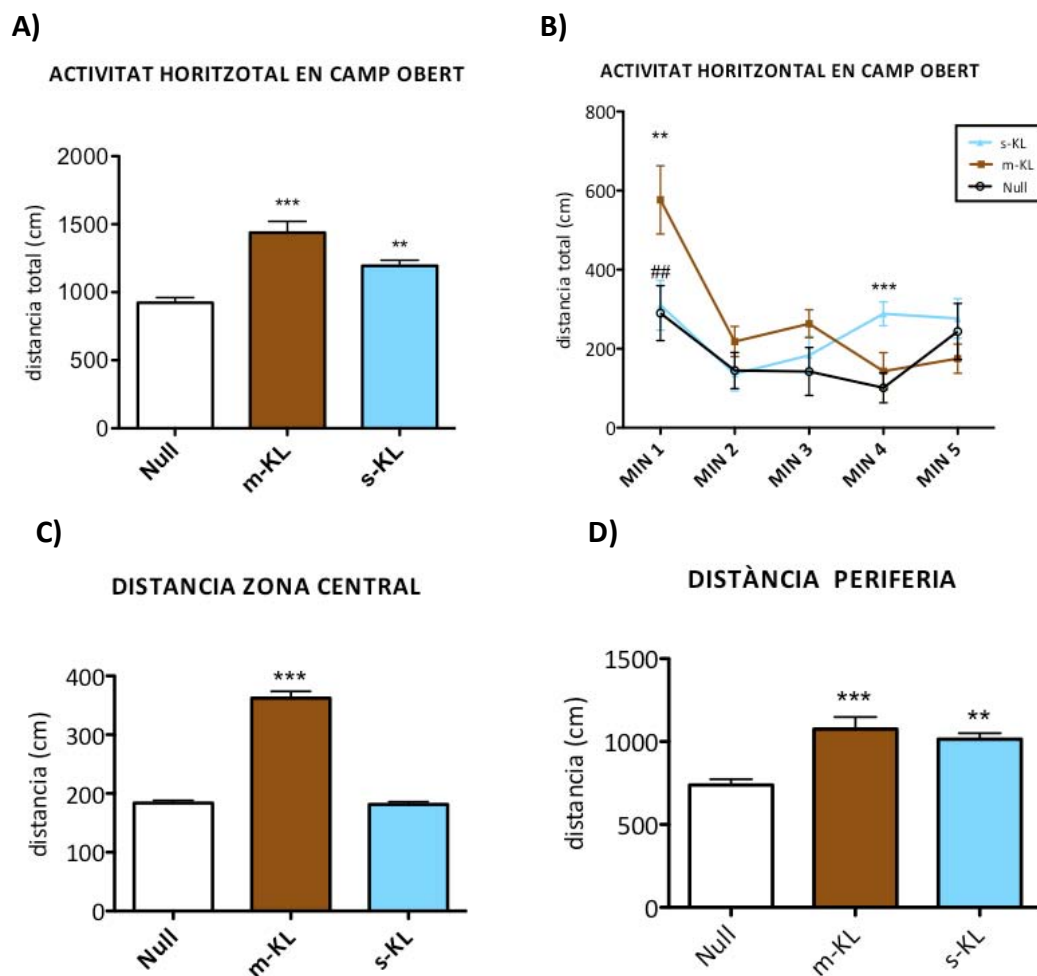


Figura 3.29- Activitat horitzontal en la prova de camp obert. (A) Nombre de vegades que l'animal travessa un espai al centre o a la perifèria del camp distància total recorreguda. (B) distància total recorreguda minut a minut. (C) distància recorreguda en el centre del camp. (D) distància recorreguda en la perifèria del camp. [T-student; *** $p < 0,0001$ i ** $p < 0,0,01$ vs. control].

Els resultats presentats en la *Figura 3.29* mostren que l'administració intraventricular de les dues isoformes de klotho (m-KL i s-KL) indueix canvis en l'activitat espontània dels ratolins quan són testats a l'edat de 18-19 mesos en la prova del camp obert. En ambdós casos, té lloc un increment de l'activitat exploratòria horitzontal dels ratolins la qual cosa es tradueix en un augment significatiu de la distància total recorreguda al finalitzar el test quan es compara amb els ratolins *wild-type* de la mateixa edat ($p < 0,0001$ per m-KL, $p = 0,0004$ per s-KL). En el grup m-KL, la diferència més significativa es produeix durant el primer minut del test, on la distància mitjana recorreguda esdevé molt superior a la resta de grups, gairebé el doble que el grup control. Per contra, la diferència principal del grup s-KL respecte el control, té lloc en el min 4 del test, cap al final de la prova. De fet, els dos grups tractats amb klotho recorren una major distància que el grup control en les zones properes a les parets del camp obert, és a dir, la perifèria ($p = 0,0006$ per m-KL, $p = 0,0001$ per s-KL). Aquests resultats confirmen l'observat anteriorment en la prova de les cantonades. En canvi, quan ens fixem en la distància recorreguda en la zona central del camp, la més desprotegida, únicament el grup d'animals injectats amb la forma transmembrana de klotho, recorren una major distància en la zona central de l'aparell en comparació al grup control ($p < 0,0001$) i també respecte el grup s-KL ($p < 0,0001$). Això podria indicar que els ratolins m-KL presenten un menor grau d'ansietat que els permet explorar lliurement la zona central desprotegida del camp obert.

Altres paràmetres mesurables en aquest test i que es relacionen amb conductes d'ansietat i neofòbia, són l'activitat vertical (*rearings* o aixecaments), el nombre de *groomings* o llepades, el nombre de defecacions i la latència per sortir de la zona central del camp obert. Tal i com s'observa en la *Taula 3.3*, la majoria dels paràmetres estudiats no es veuen afectats pel tractament, excepte el nombre de llepades o *groomings*, que en els dos grups que sobreexpressen klotho es veuen disminuïts significativament ($p < 0,0001$ per m-KL i $p = 0,0032$ per s-KL).

Paràmetres d'activitat exploratòria en el camp obert			
	Null	m-KL	s-KL
Latència moviment (s)	2,25 ± 0,72	1,5 ± 0,71	2,66 ± 0,76
Latència sortida del centre (s)	6,75 ± 1,79	2,4 ± 1,09	3,98 ± 1,11
Latència arribada a la perifèria (s)	9,14 ± 1,36	6,33 ± 2,31	7,17 ± 1,09
Activitat vertical (n ^o rearings)	26,87 ± 6,23	33,66 ± 5,65	24,16 ± 5,88
Latència 1r rearing (s)	18,42 ± 2,91	22,5 ± 5,03	24,33 ± 3,92
Empolainament (n ^o groomings)	2,86 ± 0,1	2 ± 0,07 ***	2,29 ± 0,12 **
Latència 1r grooming (s)	84,17 ± 11,63	77,5 ± 4,99	90,33 ± 24,06
Defecacions (n)	2,13 ± 0,49	2,09 ± 0,27	1,94 ± 0,32

Taula 3.3- Paràmetres d'activitat espontània i exploratòria en la prova de camp obert. Mitjana ± SEM [T-student. *** p<0,005, ** p<0,01 vs. control].

En conjunt, els resultats obtinguts en aquesta prova, juntament amb els del test de cantonades, suggereixen que la sobreexpressió de m-KL i s-KL en SNC modifica l'activitat exploratòria dels ratolins i presenta un cert efecte ansiolític. D'acord amb el treball de de *Fahlström.A et al. (2011)*, el comportament exploratori en la prova de camp obert disminueix amb l'edat i que el nombre de *rearings* esdevé infreqüent ja en ratolins de 15 mesos d'edat, un canvi que es veu accentuat a edats més avançades [408]. Així doncs, respecte els animals control de la mateixa edat, la sobreexpressió de *klotho* permet recuperar un cert grau d'activitat exploratòria, més pròpia d'animals joves. A més, els grups tractats amb *klotho* mostren un menor grau d'ansietat, tal i com queda reflectit en el percentatge de distància recorreguda en el centre del camp obert i una tendència a moure's més ràpid al inici del test (latència de moviment, latència de sortida del centre i latència d'arribada a la perifèria).

3.1.5- Funcions cognitives: aprenentatge i memòria

Una de les manifestacions principals de les malalties neurodegeneratives és la disminució progressiva de les habilitats cognitives. Així doncs per estudiar el possible efecte neuroprotector de *klotho* en SNC es van avaluar els animals en dues tasques d'aprenentatge: el laberint en forma de T i el laberint aquàtic de Morris.

3.1.5.1. Laberint en T

L'objectiu d'aquest test es estudiar els possibles efectes sobre els processos cognitius implicats en memòria de treball, o *working memory*, quan se sobreexpressa en SNC de ratolins una de les dos isoformes de klotho, m-KL o s-KL. En el nostre cas, la prova es realitza durant 3 dies consecutius, i per a cadascun dels paràmetres analitzats, es mostra el valor promig dels 3 assajos. Aquesta prova, inclou l'assaig d'elecció forçada (en que un dels braços de la T es troba tancat) i el de memòria o evocació. Tal i com s'observa en la *Taula 3.4* en l'elecció forçada tots els grups van assolir el criteri d'exploració de manera similar ($p=0,18$) tot i que no tots els animals van ser capaços de completar la tasca. Seguidament, només aquells animals que van complir el criteri d'exploració en la tasca anterior van poder realitzar el segon assaig, la tasca de memòria. Els resultats suggereixen que l'augment en l'expressió d'ambdues isoformes de klotho en SNC permet millorar significativament la puntuació obtinguda pel grup control (menys errors).

PROVA DE MEMÒRIA DE TREBALL:			
- ASSAIG D'ELECCIÓ FORÇADA			
	<i>Null</i>	<i>m-KL</i>	<i>s-KL</i>
Intersecció de la T (latència, s)	15,14 ± 1,33	11,28 ± 1,08	12,04 ± 1,11
Assoliment del criteri (freqüència/n total)	6,66/8	6/6	5/6
Criteri d'exploració (latència, s)	76,19 ± 3,13	83,76 ± 6,57	102 ± 14,56
- ASSAIG DE MEMÒRIA			
Assoliment del criteri (freqüència/n total)	5/6	6/6	5/5
Error (freqüència/n total)	2,94/6	1/6 ***	0,65/5 ***

Taula 3.4- Paràmetres analitzats en la prova de memòria de treball en el laberint en T. Mitjana ± SEM [T-test i Kruskal-Wallis. *** $p<0,005$ vs. control].

3.1.5.2. Laberint aquàtic de Morris

Per finalitzar la caracterització conductual i l'anàlisi de les capacitats cognitives, es va realitzar la prova de *Morris Water Maze* per avaluar l'aprenentatge espacial i la memòria de referència en els animals injectats. El protocol que es va utilitzar en aquest estudi va ser el següent: primer dia amb la plataforma visible i marcada amb una bandera (*Cue*), seguit de 4 dies d'entrenament amb la plataforma oculta (*Place Task, PT*), en els quals es van realitzar 4 assajos per dia de 90 segons cadascun. Dues hores després de l'últim assaig de la darrera sessió d'entrenament, es va treure la

plataforma (*Removal o Probe Trial*) per mesurar la memòria a curt termini. Aquesta prova, es va repetir de nou 24 hores després de l'últim assaig del darrer dia, com a mesura de la capacitat de memòria a llarg termini. Les diferents sessions van ser enregistrades en vídeo i posteriorment analitzades amb el software *Smart 3.0 Panlab* (PanLab SL, Barcelona) que ens va permetre obtenir, per a cada assaig, els temps que l'animal triga a trobar la plataforma, la distància recorreguda per fer-ho així com la velocitat natatòria amb que ho fa.

a) Tasques d'aprenentatge guiat i de localització

Durant la tasca d'aprenentatge guiat, la variable latència d'escapament fins a la plataforma (temps necessari per arribar-hi, en segons) va revelar un efecte significatiu tant del tractament rebut (**t**), com de l'assaig (**a**), $p < 0,0001$ en ambdós casos (*Figura 3.30B*). En el mateix sentit, la variable distància també va revelar un efecte significatiu del tractament ($p=0,0012$) i de l'assaig ($p < 0,0001$) (*Figura 3.30E*). De fet, els dos grups tractats (m-KL i s-KL) presenten una millora en l'aprenentatge guiat respecte el grup control, aconseguint arribar a la bandera de manera més ràpid i amb menor distància que el grup control. Per tant, en el primer dia d'entrenament, amb bandera (*Cue*), els animals són capaços d'aprendre a detectar la bandera i associar-la amb la localització de la plataforma, i per tant, a cada assaig ho fan més ràpid i recorrent menor distància. Aquest fet, reflexa que hi ha una corba d'aprenentatge dins d'un mateix dia. No obstant, un anàlisi més detallat, assaig per assaig, va permetre detectar que sobretot en el primer assaig (*Cue 1*), que implica la primera experiència dels animals en contacte amb l'aigua, els grups tractats amb klotho presentaven velocitats de natació superiors que el grup control. Aquestes diferències en la velocitat podrien tenir relació amb un cert efecte ansiolític de klotho (observat anteriorment en la prova de camp obert), ja que en els grups tractats cap dels animals va mostrar comportaments de flotació passiva durant els primers segons després del contacte amb l'aigua, fenomen que si que es va observar en el grup control. És per aquest motiu, que quan s'analitza la latència mitjana dels animals per trobar la plataforma, es detecten canvis significatius ($p=0,0004$), però no del tot reals, ja que al corregir per la velocitat, en la variable distància, les diferències queden reduïdes i deixen de ser significatives. Per tant, es va decidir analitzar les dades de distància nadada fins a la plataforma, com a mesura més real de la capacitat d'aprenentatge i memòria dels animals.

En la tasca de localització (*Place Task, PT*), es pot observar, com tots els grups mostren una corba d'aprenentatge a mesura que passen els dies d'entrenament, com reflexa la disminució progressiva de la distància recorreguda al llarg dels dies ($p < 0,0001$). Respecte el grup control, els resultats

indiquen que m-KL assoleix la capacitat d'aprenentatge màxim de manera més ràpida, ja que en *PT3* és capaç d'aconseguir la distància mínima per arribar a la plataforma, mentre que en els altres grups aquest mínim no arriba fins el darrer dia d'entrenament (*PT4*) (*Figura 3.30D*). A més, m-KL és el grup més eficient arribant a la plataforma tots els dies i és el que necessita una menor distància, excepte en l'últim on tots els grups ja es troben força igualats. En general, el grup s-KL mostra un comportament intermig entre el grup m-KL i el grup control. Per exemple, si ens fixem en el primer assaig de cada dia observem que els grups m-KL presenta una millora diària des de *PT1*, disminuït la distància a cada dia d'entrenament. En el cas de s-KL, sembla ser que el procés d'aprenentatge és una mica més lent i aquesta millora s'observa a partir de *PT3*. Pel grup control, existeix un corba d'aprenentatge però molt més subtil.

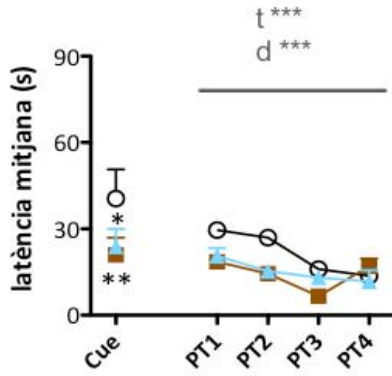
L'anàlisi de les velocitats indica que durant els tres primers dies d'aprenentatge de referència (*PT1*, *PT2*, *PT3*) hi ha un efecte extremadament significatiu del tractament, essent la velocitat de natació superior en els grups tractats amb klotho. Donat que la velocitat de natació en les proves de Morris tendeix a disminuir amb l'edat, podem considerar que aquests animals presenten un fenotip més propi d'animals joves.

Per últim, el nivell d'adquisició d'aprenentatge espacial assolit al final de la tasca (*PT4*) va ser similar en tots els grups, independentment del tractament administrat (latència i distància mitjana en *PT4* *n.s.* entre grups) és a dir, que abans de les proves de memòria, tots els animals es trobaven en igualtat de condicions i eren coneixedors de la tasca a realitzar.

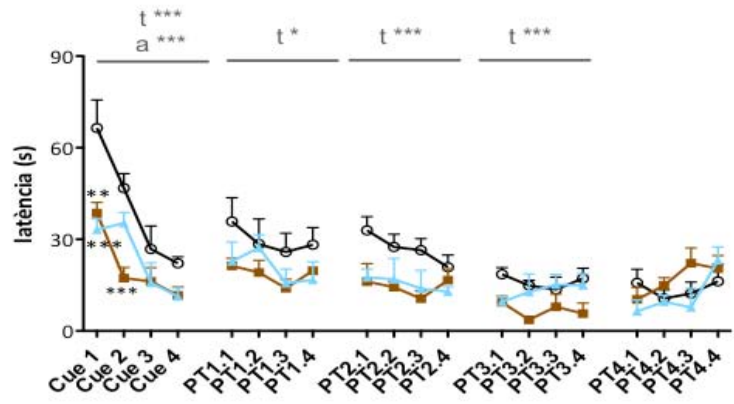
“DIA A DIA”

“ASSAIG A ASSAIG”

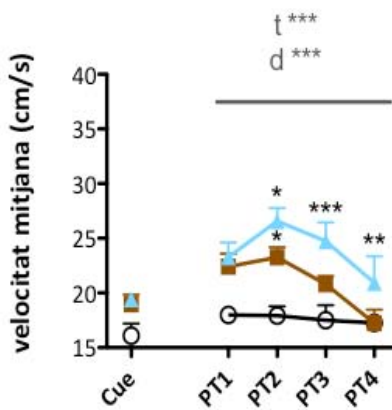
A)



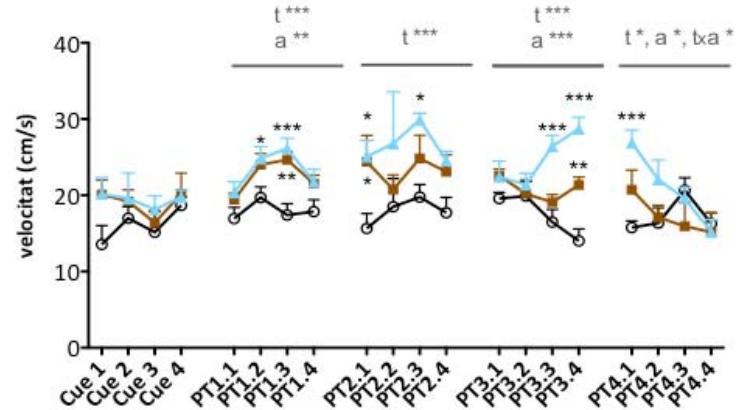
B)



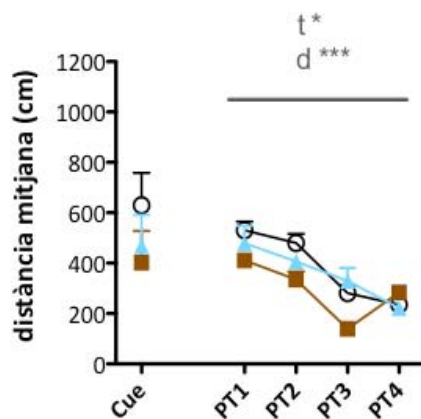
C)



D)



E)



F)

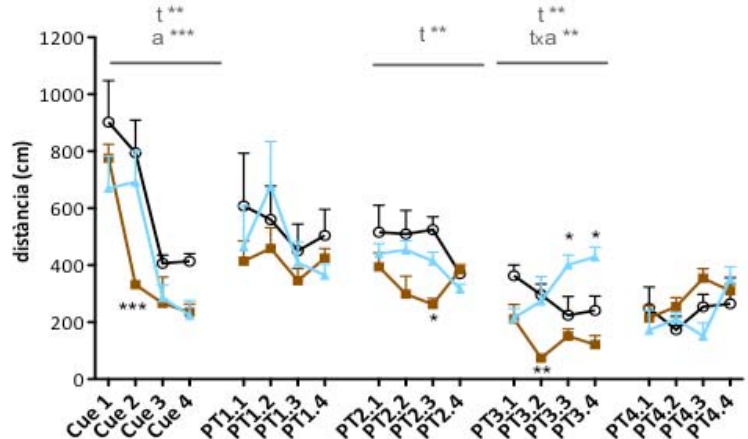


Figura 3.30- Anàlisi quantitatives de les tasques d’aprenentatge guiat i de localització en MWM en ratolins de 18 mesos d’edat. Variables de latència (A,B), velocitat (C,D) i distància recorreguda (E,F) fins a localitzar la plataforma. Mitjana ± SEM. [ANOVA de dos factors; t: efecte del tractament, a: efecte de l’assaig dins d’un mateix dia, d: efecte del dia d’entrenament, txa: interacció tractament x assaig; *** $p < 0,0001$ i ** $p < 0,0,01$ * $p < 0,05$ vs. control].

b) Proves de memòria

Dues hores després de finalitzar l'últim assaig de la tasca d'adquisició espacial de referència del quart dia, es va avaluar la capacitat de retenció o memòria a curt termini en un assaig (60 segons) sense plataforma. De nou, degut a diferències importants en la velocitat entre grups (*Null*: $20,64 \pm 0,83$ cm/s; m-KL: $27,24 \pm 1,62$ cm/s; s-KL: $28 \pm 1,68$ cm/s) s'analitza la variable distància. La *Figura 3.31A* mostra el percentatge de distància que els animals recorren en cadascun dels quadrants de la piscina, el que tenia la plataforma (PT), i els altres tres, oposat a la plataforma (Opos. PT), dret a la plataforma (Dret. PT) i esquerre a la plataforma (Esq. PT). Tal i com s'observa, tots els grups són capaços de prioritzar el quadrant PT, recorrent-hi un major percentatge de distància que en la resta.

D'altra banda, per avaluar la memòria o capacitat de retenció a llarg termini, es va repetir l'assaig sense plataforma 24 hores després de l'últim assaig d'adquisició. En aquesta prova, de nou, es calcula el percentatge de preferència de cada grup en cadascun dels quadrants de la piscina. Tal i com es mostra en el gràfic de la *Figura 3.31B*, i a diferència de l'observat en el test de memòria a les 2 hores, els grups tractes amb klotho són capaços de prioritzar de manera molt més eficient el quadrant de la plataforma que el grup control ($p < 0,0001$). Mentre que el grup control recorre un $32,18\% \pm 1,87\%$ de la distància total en el quadrant PT, el grup m-KL ho fa en un $48,74\% \pm 2,28$ i el grup s-KL $42,00\% \pm 2,89\%$. Aquest resultat indicaria que l'increment dels nivells de klotho en SNC té un efecte significatiu sobre la memòria a llarg termini, millorant-ne el rendiment.

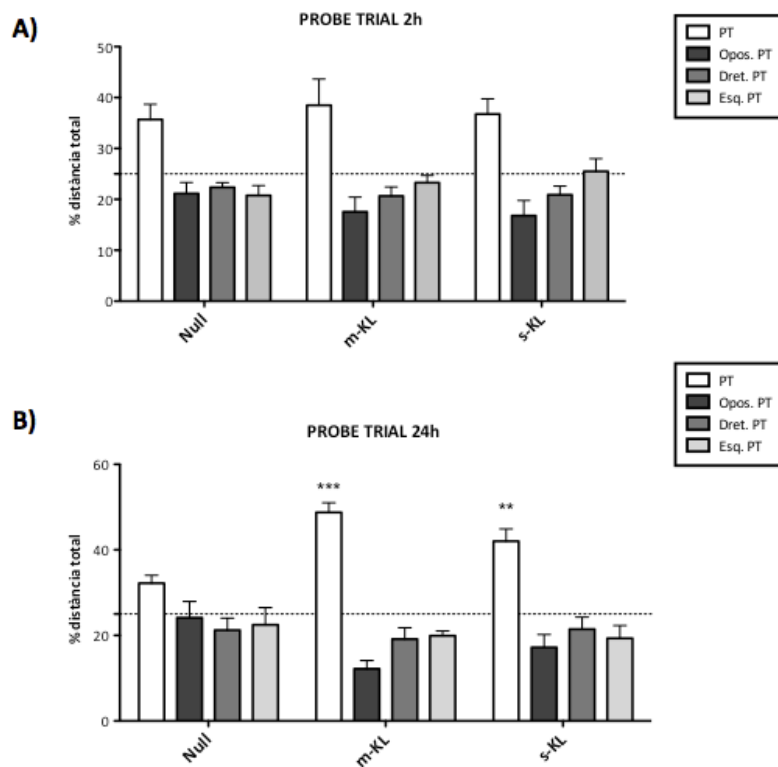


Figura 3.31- Anàlisi quantitativa dels assaigs de memòria final en el MWM en ratolins de 18 mesos d'edat. Les dades representen el percentatge de la distància total recorreguda durant el temps de la prova (60s) en cadascun dels quadrants de la piscina: PT (quadrant que contenia la plataforma), Opos. PT (quadrant oposat al de la plataforma) i Dret i Esq. PT (quadrants a la dreta i a l'esquerra respectivament del de la plataforma). **(A)** Probe trial 2 hores després de l'últim assaig d'aprenentatge de referència per avaluar la capacitat de retenció a curt termini. **(B)** Probe trial 24 hores després de l'últim assaig d'aprenentatge de referència per avaluar la capacitat de retenció a llarg termini. Mitjana \pm SEM. [ANOVA; *** $p < 0,0001$ i ** $p < 0,001$ * $p < 0,05$ vs. control].

3.1.6- Quantificació de genomes virals en SNC d'animals injectats

Un cop finalitzada la caracterització conductual i de les capacitats cognitives dels animals injectats, aquests van ser sacrificats per decapitació i la meitat del cervell de 3 animals de cada grup va ser fixat en paraformaldehid 4% per a estudis histològics. L'altra meitat d'aquests cervells es va mantenir a -80°C per a l'obtenció d'homogenats de proteïna/RNA totals de cervell. El cervell de la resta d'animals de cada grup (5 per al grup control i 3 per als grups tractats amb klotho) va ser utilitzat per a disseccionar les diferents àrees cerebrals objecte d'estudi en aquest treball: còrtex prefrontal, còrtex, hipocamp i cerebel. Amb la meitat d'aquestes seccions es va realitzar un procediment d'extracció de DNA *Hirt* amb l'objectiu de quantificar per PCR quantitativa els genomes virals presents en les mostres injectades. Aquest tipus d'extracció, permet aïllar el DNA extracromosòmic en cèl·lules de

mamífer. Durant el procés, s'elimina el DNA nuclear que presenta un elevat pes molecular i s'obté majoritàriament DNA mitocondrial de baix pes molecular i qualsevol episoma viral present a la cèl·lula. Un cop obtingut el DNA d'interès, utilitzant uns primers específics de la zona del promotor CMV, per PCR quantitativa, es construeix una recta patró amb quantitats conegudes de plasmidi pGG2 (Figura 3.32A). A partir del valor de Cq representatiu de cada mostra i per extrapolació de la recta patró (Figura 3.32B) s'obté els valor dels genomes virals presents en la mostra. En el càlcul, es rectifica el valor obtingut per la quantitat inicial de mostra utilitzada (mg) per a l'extracció de DNA i el volum utilitzat en la PCR.

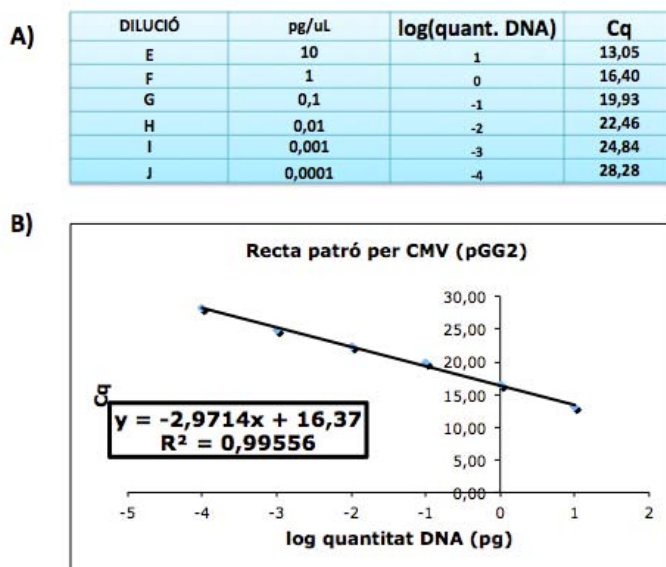


Figura 3.32 Construcció de la recta patró CMV (pGG2). (A) Taula amb les quantitats de DNA en pg/uL utilitzades per contruir la recta patró i el corresponent valor de Cq. (B) Representació gràfica de la recta patró a partir de la qual és possible obtenir els genomes virals per quantitat de teixit obtinguts en les mostres injectades.

En primer lloc, vam ser capaços de detectar partícules víriques en la majoria d'àrees analitzades de tots els animals injectats. Això indicaria que 6 mesos després de l'administració intraventricular, el vector AAVrh10 encara és present en el SNC dels ratolins de 18 mesos (Figura 3.33). Tot i així, s'observa una gran variabilitat en quant a la distribució del virus en les diferents àrees cerebrals estudiades. L'explicació a aquest fet la podem trobar, segurament en la via d'administració del virus, observant que l'alliberament del vector en CSF permet una distribució àmplia i aleatòria de les partícules virals a través del parènquima cerebral.

A gran trets, s'observa que en els animals injectats amb m-KL el virus es localitza majoritàriament en còrtex i hipocamp. En el grup injectat amb s-KL mostra un perfil similar al del grup control, amb baixa transducció del còrtex cerebral (Figura 3.33).

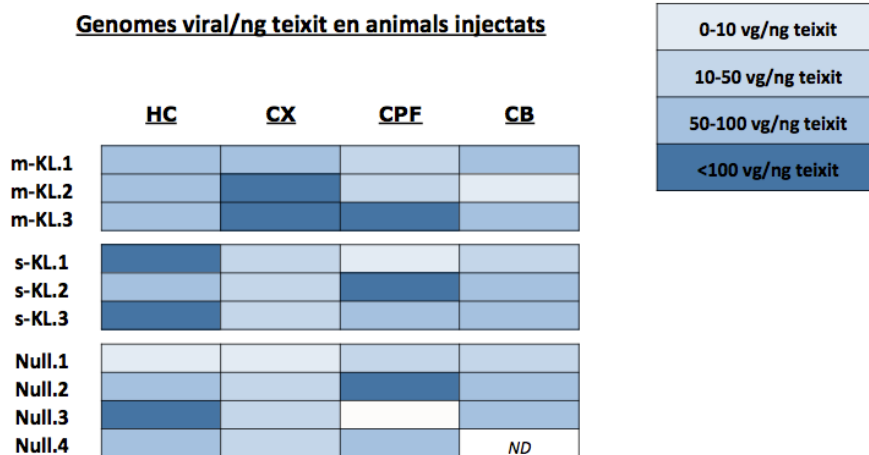


Figura 3.33- Quantificació de genomes virals en diferents regions cerebrals d'animals injectats. Resultats obtinguts per PCR quantitativa. HC: hipocamp, CX: còrtex, CPF: còrtex prefrontal, CB: cerebel.

3.1.7- Anàlisi de l'expressió vírica.

Amb l'altre meitat de les mostres disseccionades es va dur a terme una extracció d'RNA per analitzar els nivells d'expressió de m-KL i s-KL per PCR quantitativa i saber si els vectors virals, a part de ser capaços d'infectar, permetien augmentar l'expressió dels gens diana en els animals injectats.

En primer lloc, s'observa una dèbil correlació entre la distribució dels genomes virals i l'augment en l'expressió dels gens diana. En els animals injectats amb AAVrh10-mKL s'observa un increment significatiu de l'expressió de m-KL en còrtex prefrontal ($p=0,001$) i també en còrtex ($p=0,011$) i cerebel ($p=0,015$), però no en hipocamp ($p=0,25$) (Figura 3.34A). De manera similar, els animals injectats amb AAVrh10-sKL, es detecta un important augment en els nivells d'expressió de s-KL de fins a 20 vegades en còrtex ($p=0,011$) i cerebel ($p=0,03$), i de fins a 5 vegades en còrtex prefrontal ($p=0,02$) i hipocamp ($p=0,02$) (Figura 3.34B). Aquesta major eficiència del vector AAVrh10-sKL podria ser atribuïble al fet de que, els nivells endògens d'expressió de l'mRNA de s-KL solen ser més baixos que els de m-KL, i per tant, esdevindria més fàcil augmentar-los i detectar el canvi.

A més, aquests resultats podrien indicar que alguns dels efectes, a nivell de conducta i funcions cognitives, observats en els animals injectats podria estar mediada per la sobreexpressió de klotho en còrtex prefrontal, una estructura que es troba altament interconnectada amb la resta de cervell i que inclou extenses connexions corticals i subcorticals i amb el tronc encefàlic [409]. El còrtex prefrontal dorsal està especialment interconnectat amb les regions del cervell encarregades de

l'atenció, la cognició i l'acció; mentre que el còrtex prefrontal ventral enllaça amb les regions relacionades amb les emocions [410]. No obstant, tal i com mostren els gràfics, únicament amb s-KL l'hipocamp, la principal estructura implicada en processos d'aprenentatge i memòria va veure augmentada significativament l'expressió de klotho. Aquest fet, va constituir una limitació no esperada en el nostre estudi, ja que esperàvem una major expressió dels vectors virals en aquesta estructura. En vistes d'aquest resultat, tenint en compte la gran variabilitat entre individus dins un mateix grup i la reduïda disponibilitat de mostres per als estudis bioquímics i/o histològics, es va decidir finalitzar en aquest punt l'experiment, sense descartar tornar més endavant a analitzar-ne alguns aspectes.

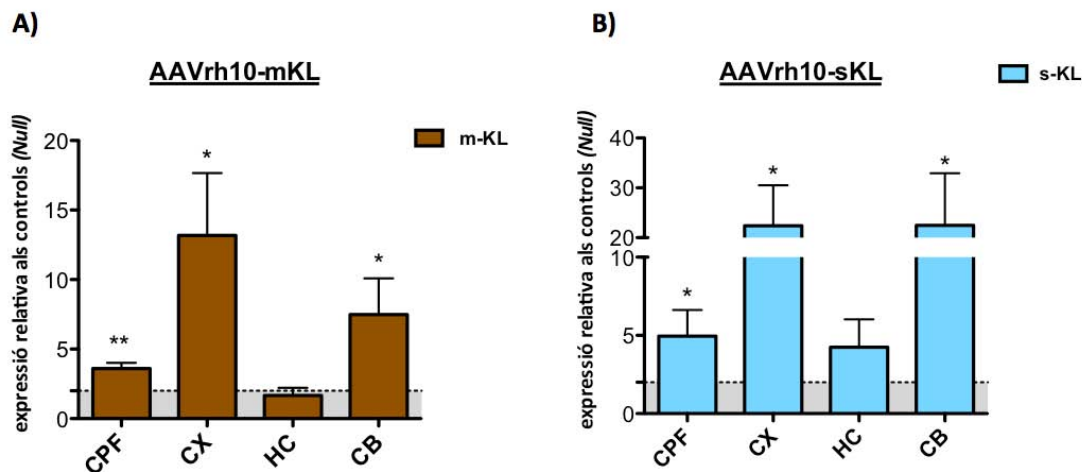


Figura 3.34- Sobreexpressió de m-KL i s-KL en diferents àrees cerebrals mitjançant la injecció intraventricular de vectors AAVrh10 portadors dels gens diana. Es van analitzar els nivells d'expressió de m-KL (A) i s-KL (B) en animals injectats amb els constructes portadors dels cDNAs d'aquests gens. Les regions analitzades van ser còrtex prefrontal (CPF), còrtex (CX), hipocamp (HC) i cerebel (CB). Les barres representen la mitjana \pm SEM del canvi en l'expressió respecte el grup control (AAVrh10-Null). [ANOVA; ** $p < 0,001$ * $p < 0,05$ vs. control] .

3.2- Estudi en ratolins adults joves (6 mesos)

3.2.1- Disseny experimental

En aquest nou experiment in vivo es va decidir incloure dos grups injectats amb vectors portadors d'shRNAs, un contra m-KL i l'altre específic contra s-KL, a més dels grups injectats amb vectors portadors dels cDNAs. Així, l'experiment consta de 5 grups (Figura 3.35): un grup control o *Scrambled* (injectat amb un virus que codifica per un shRNA irrellevant que no comparteix seqüència

amb cap gen murí); dos grups de sobreexpressió, un per la forma transmembrana de klotho (m-KL) i un per la forma secretada (s-KL); i dos grups on s'inhibeix la expressió de klotho, un injectat amb sh-mKL i un altre injectat amb l'sh-sKL (inhibeix només l'expressió s-KL, ja que l' shRNA es contra la cua d'aminoàcids específics d'aquesta isoforma). Tenint en compte l'elevada mortalitat en l'experiment anterior i la variabilitat en els resultats, probablement degut a una "n" final massa reduïda, en el disseny d'aquets nou experiment, es va decidir treballar amb ratolins mascles C57Bl/6J més joves, els quals van ser injectats als 6 mesos d'edat i testats en la mateixa bateria de proves de conducta i cognitives als 12 mesos d'edat. També es va augmentar la "n" dels diferents grups experimentals, essent per a cadascun dels grups, entre 11-16 ratolins.

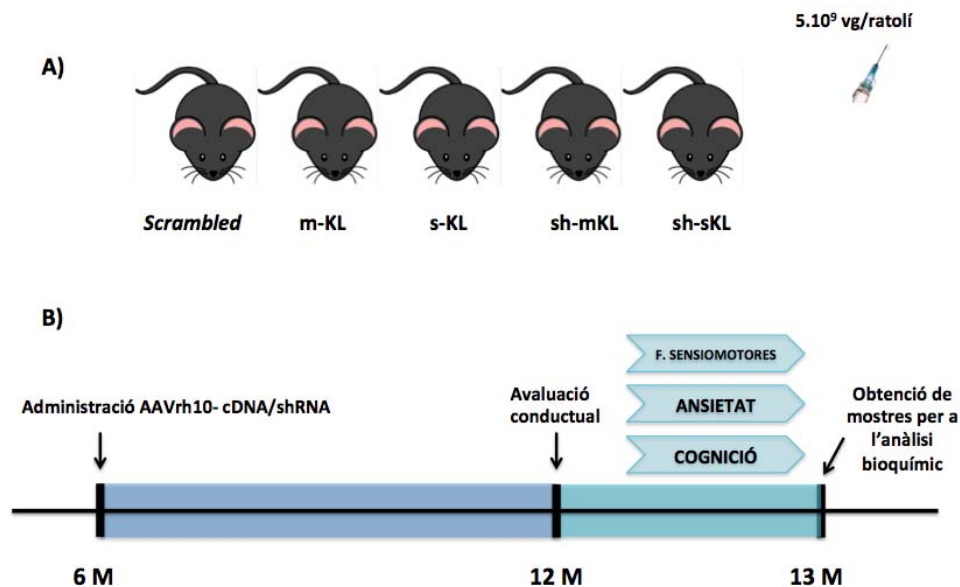


Figura 3.35- Disseny experimental de l'estudi *in vivo* en ratolins de 6 mesos d'edat. (A) Grups experimentals (n=11-16): Scrambled (control), m-KL, s-KL, sh-mKL, sh-sKL. **(B)** Esquema temporal de l'estudi. Els animals són injectats als 6 mesos d'edat amb els diferents vectors adeno-associats i als 12 mesos se sotmeten a una bateria de tests de comportament.

A diferència de l'anterior experiment, els vectors virals AAVrh10 que permeten modificar els nivells de klotho en SNC no van ser injectats en ventricle sinó directament en hipocamp. Es van realitzar dues injeccions, una per cada hemisferi, amb un total de 5.10⁹ vg/ratolí. D'aquesta manera, es va voler estudiar de manera més específica i localitzada els efectes de la modificació dels nivells endògens de klotho en una estructura implicada en processos d'aprenentatge i memòria on aquest gen s'expressa abundantment.

3.2.2- Dades de supervivència i pes corporal

Durant els 6 mesos que els animals van estar injectats, ni durant el transcurs de les proves de conducta, es va produir cap mort. No obstant, 3 mesos després de la injecció es van sacrificar 2 animals per grup per analitzar els nivells d'expressió de klotho, i comprovar que els models generats eren correctes (veure *Resultats 3.2.6.a*)

El pes dels animals es va mesurar a l'inici de l'experiment (6 mesos), als 9 i als 12 mesos. Tal i com s'observa en el gràfic (*Figura 3.36*), la sobreexpressió i/o inhibició sostinguda en el temps de les isoformes de klotho, m-KL i s-KL, no té cap efecte significatiu en el pes corporal de l'animal. Així, durant l'etapa que compren dels 6 als 12 mesos d'edat tots els grups experimentals mostren un augment de pes sostingut i similar entre grups.

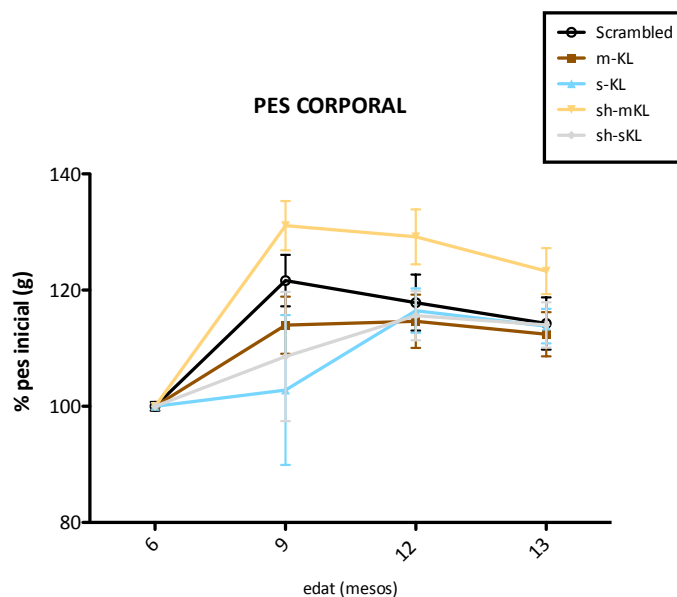


Figura 3.36- Evolució del pes corporal. Representat com a % del pes inicials dels diferents grups experimentals durant els 6 mesos injectats amb els corresponents virus (*Scrambled*, m-KL, s-KL, sh-mKL i sh-sKL).

3.2.3- Funcions sensoriomotores:

En la *Taula 3.5* es mostren els resultats de l'examen sensoriomotor que es va realitzar abans de l'inici de les proves de conducta. En cadascun de les proves i per a cada animal, s'agafa la millor marca dels diversos assajos.

Paràmetres sensoriomotors avaluats					
	<i>Scrambled</i>	<i>m-KL</i>	<i>s-KL</i>	<i>sh-mKL</i>	<i>sh-sKL</i>
Barra de fusta					
Latència caiguda (s)	14,45 ± 1,95	17,44 ± 1,37	17,92 ± 1,16	19,00 ± 1,00	12,81 ± 2,16
% Moviment	18,18	33,33	28,57	18,18	18,18
Distància (cm)	7,5 ± 1,06	4,37 ± 1,25	6,25 ± 1,59	6,25 ± 1,59	7,5 ± 1,06
Barra metàl·lica					
Latència caiguda (s)	9,09 ± 1,86	5,44 ± 2,02	6,85 ± 1,27	9,81 ± 1,77	5,54 ± 1,33
% Moviment	27,27	9,09	0	9,09	18,18
Perxa					
Latència caiguda (s)	34,36 ± 7,06	32,22 ± 7,45	39,57 ± 5,84	25,18 ± 5,92	41,27 ± 6,76
% Moviment	63,63	72,72	85,71	72,72	90,90
Distància (cm)	5,35 ± 1,33	14,58 ± 2,43 **	10,62 ± 1,99	11,56 ± 0,69	5,25 ± 1,39 ##
% Animals ben agafats	54,54	81,81	57,14	45,45	63,63
Reflex visual	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

Taula 3.5- Paràmetres d'activitat espontània i exploratòria en la prova de camp obert. Mitjana ± SEM. [ANOVA i Kruskal-Wallis. ** $p < 0,01$ vs. control ; ## $p < 0,01$ vs. *m-KL*].

En la prova del reflex visual el 100% dels animals mostraven resultats positius identificant correctament la proximitat de la planxa. En les proves d'equilibri, l'anàlisi de les latències de caiguda entre grups no mostra diferències significatives però, en general s'observa que aquells animals tractats amb klotho presenten una major tendència a moure's sobre la barra, entre un 10-15% més que el grup control o el tractat amb shRNAs ($p=0,61$). D'altra banda, la distància mitjana recorreguda per els animals que es mouen en cadascun dels grups és similar ($p=0,66$). Els resultats de la prova en barra metàl·lica tampoc mostren diferències entre grups, ni en la latència de caiguda ni en el percentatge d'animals que surten del segment central inicial (on se situa el ratolí a l'inici) $p=0,22$ i $p=0,33$ respectivament. Finalment, quan s'avalua la coordinació motora en la perxa l'únic paràmetre que esdevé estadísticament significatiu entre grups és la distància mitjana recorreguda per aquells animals que arriben a moure's ($p < 0,01$). El grup *m-KL* és el que recorre una major distància ($14,58 \pm 2,43$ cm), mentre que el grup *sh-sKL* els que menys ($5,35 \pm 1,39$ cm).

Així, podem afirmar que les condicions físiques dels diferents grups experimentals als 12 mesos són similars entre elles i en general, millors (latències superiors) que les condicions dels animals testats als 18 mesos d'edat.

3.2.4- Ansietat i neofòbia.

3.2.4.1- Test de les cantonades (*Corner Test*).

En la *Figura 3.37*, es representa tant el nombre total de cantonades explorades com el nombre d'aixecaments verticals que realitzen els animals durant els 30 segons del test. De manera similar a l'observat en aquesta prova en animals de 18 mesos d'edat, als 12 mesos, els animals que sobreexpressen els cDNAs presenten una activitat exploratòria horitzontal (nº cantonades visitades) significativament superior al grup control ($p=0.003$ i $p=0.047$ per a m-KL i s-KL, respectivament). En línia amb aquest fet, en els grup injectat amb shRNAs, la tendència és que el nombre de corners visitats es vegi reduït respecte el grup control, esdevenint significatiu per sh-mKL ($p=0.039$) però no per sh-sKL ($p=0.55$). Així doncs, aquesta prova va permetre observar que els constructes injectats cDNAs vs. shRNAs conduïen a comportaments oposats respecte la variable "activitat exploratòria horitzontal" detectant-se diferències significatives entre grups experimentals (m-KL/s-KL vs. sh-mKL/sh-sKL).

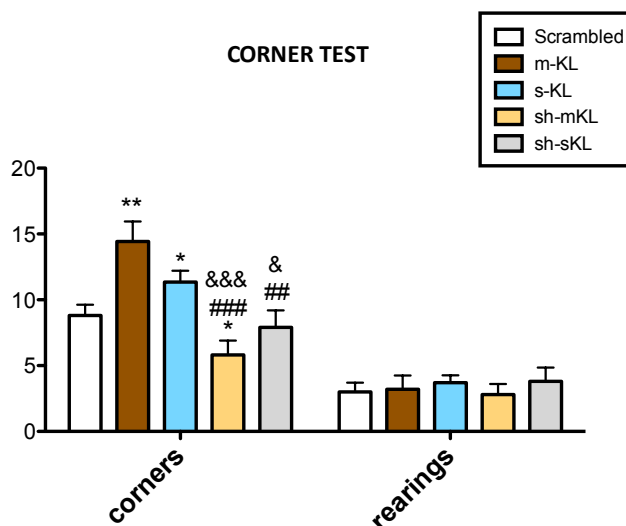


Figura 3.37- Avaluació conductual en el test de neofòbia (Corner test).

Nombre total de cantonades explorades i d'aixecaments verticals durant la sessió.
[ANOVA: ** $p<0,001$, * $p<0,05$ vs. control; ### $p<0,0001$, ## $p<0,00105$ vs. m-KL; &&& $p<0,0001$, & $p<0,05$ vs. s-KL].

3.2.4.2- Avaluació de l'activitat en un ambient nou: camp obert

Els resultats presentats en la *Figura 3.38* també mostren que els vectors virals injectats són capaços de modificar l'activitat exploratòria horitzontal dels ratolins en la prova de camp obert. Quan se sobreexpressen els cDNAs de klotho, la distància total recorreguda pels animals és significativament superior a la del grup control: $1364 \pm 18,79$ cm per el grup *scrambled*, $1834 \pm 28,15$ cm per a m-KL i $1721 \pm 9,64$ cm per a s-KL i amb una $p < 0,0001$. Per contra, la inhibició, mitjançant shRNAs d'algunes isoformes de klotho, no té cap efecte, essent la distància total recorreguda respecte el grup control: $1301 \pm 6,27$ cm per a sh-mKL amb $p = 0,015$ i $1369 \pm 8,5$ cm amb $p = 0,13$ per a sh-sKL. L'anàlisi ANOVA detecta que la sobreexpressió de klotho (m-KL i s-KL) té un efecte diferent a la inhibició (sh-mKL i sh-sKL) en aquesta prova amb una $p < 0,0001$. Aquests resultats estan d'acord amb allò observat en els animals de 18 mesos, on també es detectava una major activitat horitzontal en aquest test.

D'altra banda, quan es mira la distància recorreguda en la zona central del camp, es veu de nou aquest efecte oposat entre cDNAs/ shRNAs. Els grups que sobreexpressen klotho recorren més distància en la zona central desprotegida que el grup control, $211,82 \pm 6,5$ cm en l'*scrambled*, $238,88 \pm 2,4$ cm i $p < 0,01$ per a m-KL i $242,85 \pm 4,84$ cm i $p < 0,0001$ per a s-KL. Aquesta distància es veu significativament disminuïda respecte els controls en el grup sh-mKL ($152,72 \pm 5,1$ cm $p < 0,0001$) però no en el grup sh-sKL ($219,09 \pm 3,87$ cm). Aquests resultats, tal i com s'observava en ratolins d'edat avançada, suggereixen que la sobreexpressió de les dos isoformes de klotho en SNC presenta un cert efecte ansiolític fent que els animals recorren una distància superior en la zona central desprotegida i ansiogènica del camp obert que el grup control. A més, també es detecta que la inhibició de l'expressió de klotho comporta una disminució de la distància recorreguda en la zona central, deduint-se una major ansietat en aquests animals.

En la *Taula 3.6*, es mostren els resultats d'altres paràmetres relacionats amb conductes d'ansietat. El primer que es detecta, és una diferència significativa en el temps de sortida de la posició central a l'inici de la prova. En aquest cas, els ratolins injectats amb els cDNAs de klotho tenen tendència a sortir una mica més ràpid del centre que el grup control, mentre que els animals injectats amb els shRNAs necessiten força més temps. De fet, alguns animals d'aquests grups mostren un comportament de *freezing* o petrificació, de duració variable, i que podria estar associat a una major ansietat. No es detecten diferències entre grups en la resta de variables analitzades.

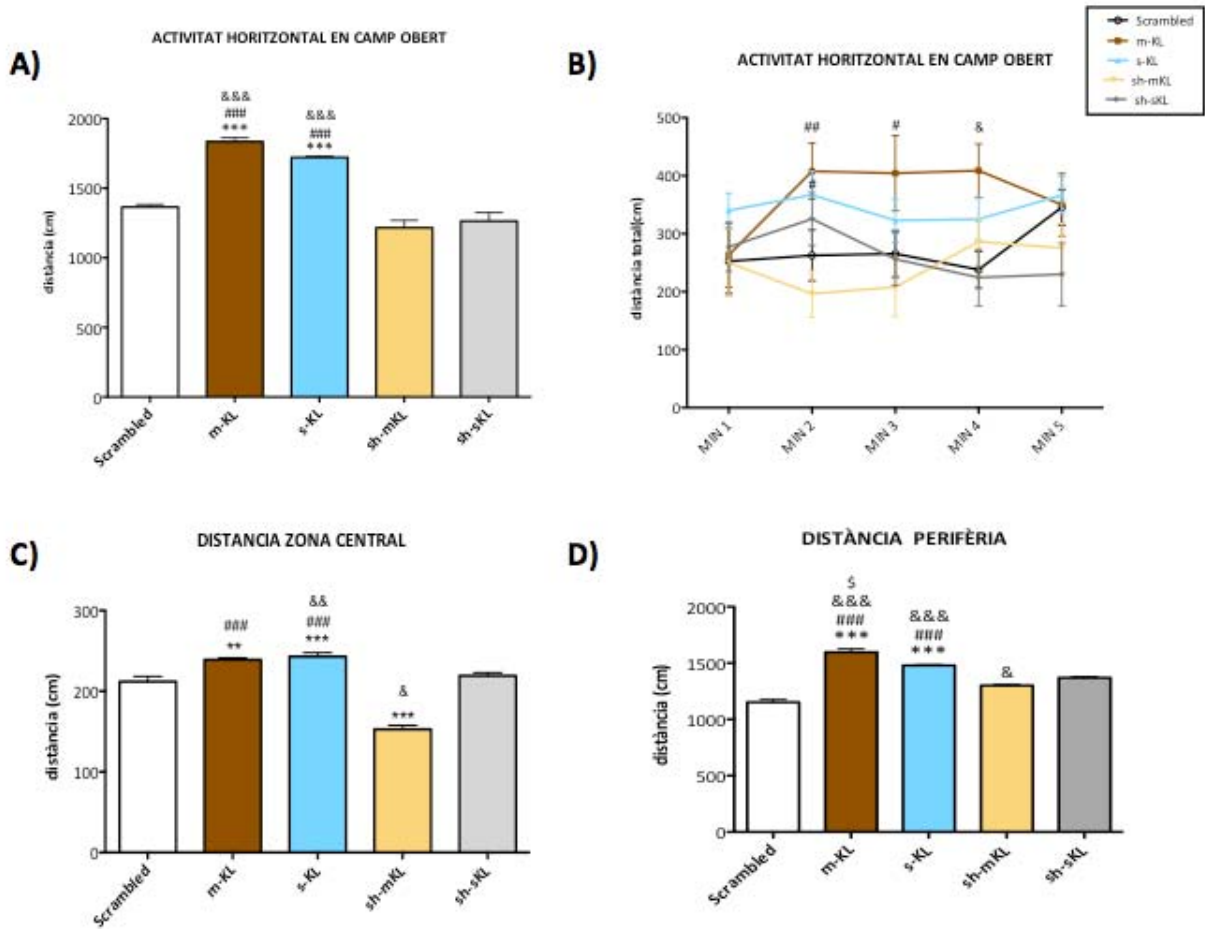


Figura 3.38- Activitat horitzontal en la prova de camp obert. (A) Nombre de vegades que l'animal travessa un espai al centre o a la perifèria del camp i la distància total recorreguda. (B) distància total recorreguda minut a minut. (C) distància recorreguda en el centre del camp. (D) distància recorreguda en la perifèria del camp. [ANOVA; *** p<0,0001 i ** p<0,01 vs. control; ### p<0,0001, ## p<0,001 i # p<0,05 vs. sh-mKL; &&& p<0,0001, && p<0,001 i & p<0,05 vs. sh-sKL; \$ p<0,05 vs. s-KL.]

Paràmetres d'activitat exploratòria en el camp obert

	Null	m-KL	s-KL	sh-mKL	sh-sKL
Latència sortida del centre (s)	5,18 ± 1,60	3,44 ± 1,05 #	3,00 ± 0,97 ## &	9,27 ± 1,64	8,00 ± 0,78
Latència arribada a la perifèria (s)	9,14 ± 1,36	6,33 ± 2,31	7,17 ± 1,09	12,23 ± 2,11	10,34 ± 1,09
Activitat vertical (nºrearings)	29,45 ± 2,68	37,55 ± 4,84	33,30 ± 1,93	32,36 ± 3,99	32,30 ± 2,80
Latència 1r rearing (s)	27,63 ± 3,96	29,11 ± 2,65	26,92 ± 4,08	32,54 ± 4,24	23,80 ± 2,74
Empolainament (nºgroomings)	1,81 ± 0,42	0,62 ± 0,17	1,42 ± 0,32	1,45 ± 0,21	1,81 ± 0,31
Latència 1r grooming (s)	115,54 ± 25,49	228,37 ± 27,28	164,92 ± 23,16	151,54 ± 18,03	112,36 ± 18,43
Defecacions (n)	2,33 ± 0,47	2,00 ± 0,29	1,96 ± 0,35	2,5 ± 0,42	2,4 ± 0,40

Taula 3.6- Paràmetres d'activitat espontània i exploratòria en la prova de camp obert. Mitjana ± SEM [RM ANOVA; ## p<0,001, # p<0,05 vs. sh-mKL; & p<0,05 vs. sh-sKL].

3.2.5- Funcions cognitives: aprenentatge i memòria

3.2.5.1- Laberint en T

Quan s'avaluen els processos de memòria de treball en el laberint en forma de T, s'observen diferències entre els grups experimentals. En la *Taula 3.7*, es mostren els principals paràmetres estudiats en aquesta prova. En tots els casos, el resultat correspon a la mitjana dels valors obtinguts per a cadascun dels tres dies que es va realitzar el test.

En l'assaig d'elecció forçada, tots els animals del grup control i els que sobreexpressaven *klotho* (m-KL i s-KL) van ser capaços de complir el criteri per contra, entre un 10-18% dels animals dels grups portadors d' shRNAs no van poder assolir el criteri, i per tant, van quedar fora de l'assaig de lliure elecció. A més, en aquest primer assaig, els grups injectats amb els cDNAs van necessitar menys temps per arribar al punt d' intersecció del laberint que els grups injectats amb shRNAs ($p=0.0041$), essent el grup s-KL el més ràpid en fer-ho i el grup sh-sKL el més lent. Aquesta variable es troba relacionada amb l'ansietat ja que permet detectar conductes de petrificació a l'inici del test. Els resultats també mostren que el grup sh-mKL va necessitar un temps significativament menor que el grup control per complir el criteri d'exploració ($p=0,032$).

En el segon assaig, el de lliure elecció tots els animals compleixen el criteri establert, però s'observen diferències entre grups en quant a l'eficiència a l'hora d'escollir correctament el braç no visitat anteriorment. El grup control (*scrambled*) resol la tasca amb un percentatge d'error del $27,27\pm 0,33\%$. Aquesta puntuació és millorada pels grups portadors dels cDNAs disminuint el percentatge d'error al $18,44\pm 0,57\%$ per m-KL i al $21,42\pm 1\%$ per s-KL. Tal i com ja s'havia observat en animals de 18 mesos, els resultats suggereixen que l'augment dels nivells de *klotho* en SNC permet millorar els resultats obtinguts en aquesta prova. És més, s'ha pogut comprovar que el silenciament de m-KL o s-KL, fa que els animals empitjorin en la resolució de la tasca, incrementant el percentatge d'errors comesos fins al 40% en ambdós casos.

PROVA DE MEMÒRIA DE TREBALL:					
- ASSAIG D'ELECCIÓ FORÇADA					
	<i>Scrambled</i>	m-KL	s-KL	sh-mKL	sh-sKL
Intersecció de la T (latència, s)	8,48 ± 1,77	6.59 ± 0.77	5.29 ± 1.29 &	8.18 ± 0.56	10.28 ± 1,11
Assoliment del criteri (freqüència/n total)	11/11	9/9	14/14	9/11	10/11
Criteri d'exploració (latència, s)	72,15 ± 5,41	62,88 ± 5,61	50,47 ± 4,38	46,66 ± 8,81*	57,27 ± 5,24
- ASSAIG DE MEMÒRIA					
Assoliment del criteri (freqüència/n total)	11/11	9/9	14/14	9/9	10/10
Error (freqüència/n total)	4/11	1,66/9 ***###&&&	3/14 ***###&&&	4/9 ***	4/10 ***

Taula 3.7- Paràmetres analitzats en la prova de memòria de treball en el laberint en T. Mitjana ± SEM [RM ANOVA i Kruskal-Wallis. ***p<0,0001, *p<0.05 vs. control; ### p<0,0001 vs. sh-mKL; & p<0,05 vs. sh-sKL].

3.2.5.1- Laberint aquàtic de Morris.

Finalment es va realitzar el test de Morris Water Maze ,seguint el mateix protocol utilitzat anteriorment en la caracterització dels animals de 18 mesos.

a) Tasques d'aprenentatge guiat i de localització

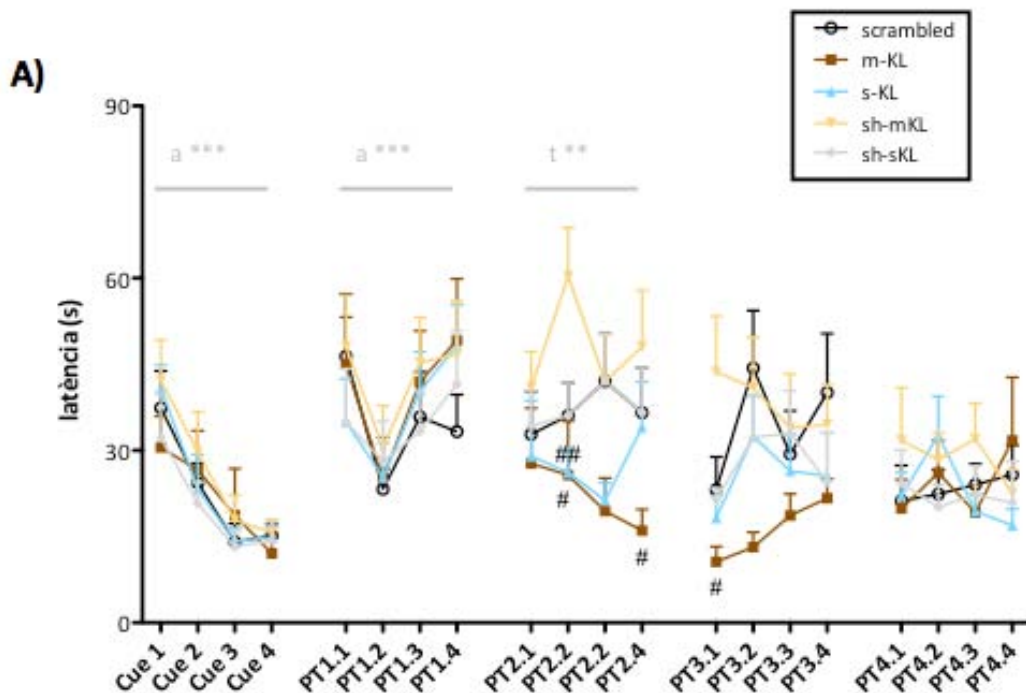
En el dia d'aprenentatge guiat amb una bandera visible (*Cue*) que senyalitza la posició de la plataforma, no s'observen diferències significatives entre els diversos grups tractats ni pel que fa el temps necessari (latència), ni tampoc en la velocitat mitjana o la distància recorreguda fins arribar a la plataforma. Tot i que el tractament (virus injectat) no té un efecte significatiu en la realització de la prova, si que el té l'assaig, observant-se així, com tots els grups experimentals mostren una clara corba d'aprenentatge a través dels successius assajos tal i com indica l'anàlisi ANOVA de 2 factors (tractament x assaig) on $p < 0,0001$ per la latència, velocitat i distància. A més això queda reflectit en una reducció del temps i la distància necessaris per arribar a la plataforma.

Durant els quatre dies d'aprenentatge espacial de referència o *Place Task* (PT) es pot observar que tots els grups mostren un aprenentatge a través dels dies d'entrenament tal i com queda reflexat en

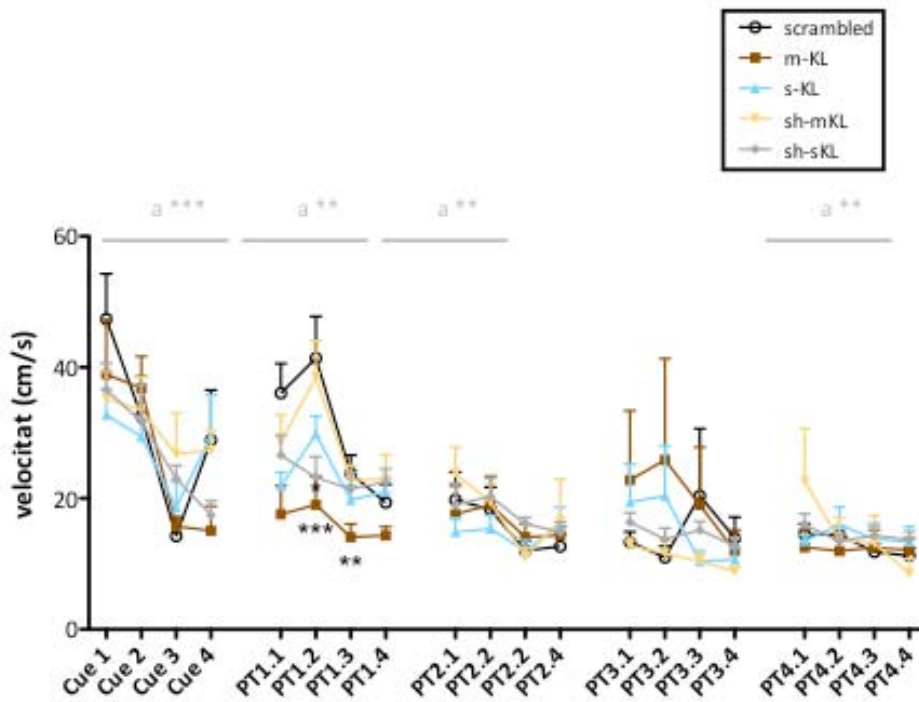
la disminució progressiva tant de la latència d'arribada a la plataforma com de la distància recorreguda per fer-ho (Figura 3.39A i Figura 3.39C).

El test ANOVA de dos factors de mesures repetides indica un efecte clar del assaig en ambdues variables ($p < 0,0001$). Així mateix, en aquests dos paràmetres també hi té un efecte significatiu clar el tractament rebut o virus injectat, $p < 0,001$ per a latències i $p = 0,0015$ per a distàncies. En essència, aquests resultats indiquen que els dos grups que sobreexpressen klotho (m-KL i s-KL) són més eficients en la búsqueda de la plataforma que el grup control, mentre que els grups en els quals se suprimeix la seva expressió, via shRNAs (sh-sKL i sh-sKLS), ho són menys.

A diferència del que succeïa en l'experiment anterior, el test ANOVA de dos factors (tractament x assaig) no detecta diferències significatives en les velocitats natatòries dels diferents grups, $p = 0,74$. (Figura 3.39B).



B)



C)

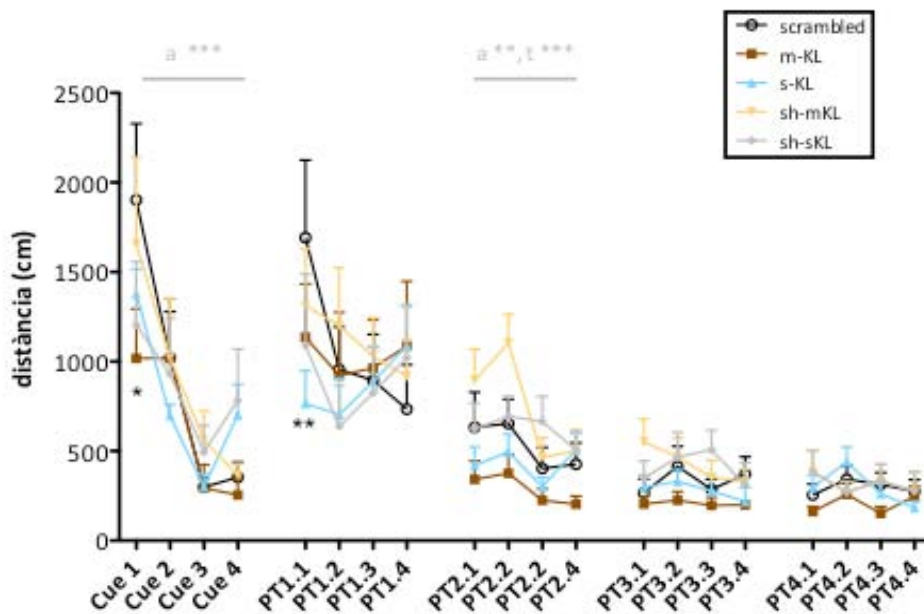


Figura 3.39- Anàlisi quantitatives de les tasques d'aprenentatge guiat i de localització en MWM en ratolins de 12 mesos d'edat assaig a assaig. Variables de latència (A), velocitat (B) i distància recorreguda (C) fins a localitzar la plataforma. Mitjana \pm SEM. [ANOVA de dos factors; t: efecte del tractament, a: efecte de l'assaig dins un mateix dia d'entrenament, t x a: interacció efecte del tractament i l'assaig; *** $p < 0,0001$ i ** $p < 0,0,01$ * $p < 0,05$ vs. control; ## $p < 0,0,01$ # $p < 0,05$ vs. sh-mKL].

b) Proves de memòria.

En la *Figura 3.40A* es representa el percentatge de la distància total recorreguda en el quadrant on es localitzava la plataforma (PT) i en cadascun dels altres 3 quadrants (oposat a la plataforma i dret/esquerra a la plataforma) en la prova de memòria realitzada 2 hores després de l'últim assaig d'adquisició espacial. Tot i que les diferències observades no són significatives, el grup control no mostra preferència per cap dels quadrants en aquesta prova, així com tampoc ho fan els grups tractats amb shRNA. Per contra, s'observa que els grups que reben els cDNAs de klotho sí són capaços de prioritzar el quadrant ,recorrent-hi una major distància.

Per a avaluar la memòria o la capacitat de retenció a llarg termini, es va repetir l'assaig sense plataforma 24 hores després de l'últim assaig d'adquisició. Tal i com s'observa la *Figura 3.40B*, s'obtenen perfils similars al test realitzat a les 2 hores sense plataforma. Els dos grups que sobreexpressen klotho (m-KL i s-KL) mostren una major preferència pel quadrant que contenia la plataforma ($p < 0,0001$ per m-KL i $p < 0,001$ per a s-KL) comparat amb el grup control, recorrent-hi una major distància. Per contra, aquells grups en els quals es silencia l'expressió de klotho (sh-mKL i sh-sKL) no prioritzen cap quadrant per sobre la resta.

En termes general, es pot concloure que tal i com ja s'havia observat en animals d'edat avançada, l'administració dels cDNAs de klotho a SNC permet millorar la capacitat de discriminació del quadrant PT sobretot, a les 24 hores després de l'últim assaig d'aprenentatge espacial. És més, el silenciament de m-KL i s-KL provoca un empitjorament de la resolució de la tasca, la qual cosa confirmaria el seu paper en funcions cognitives.

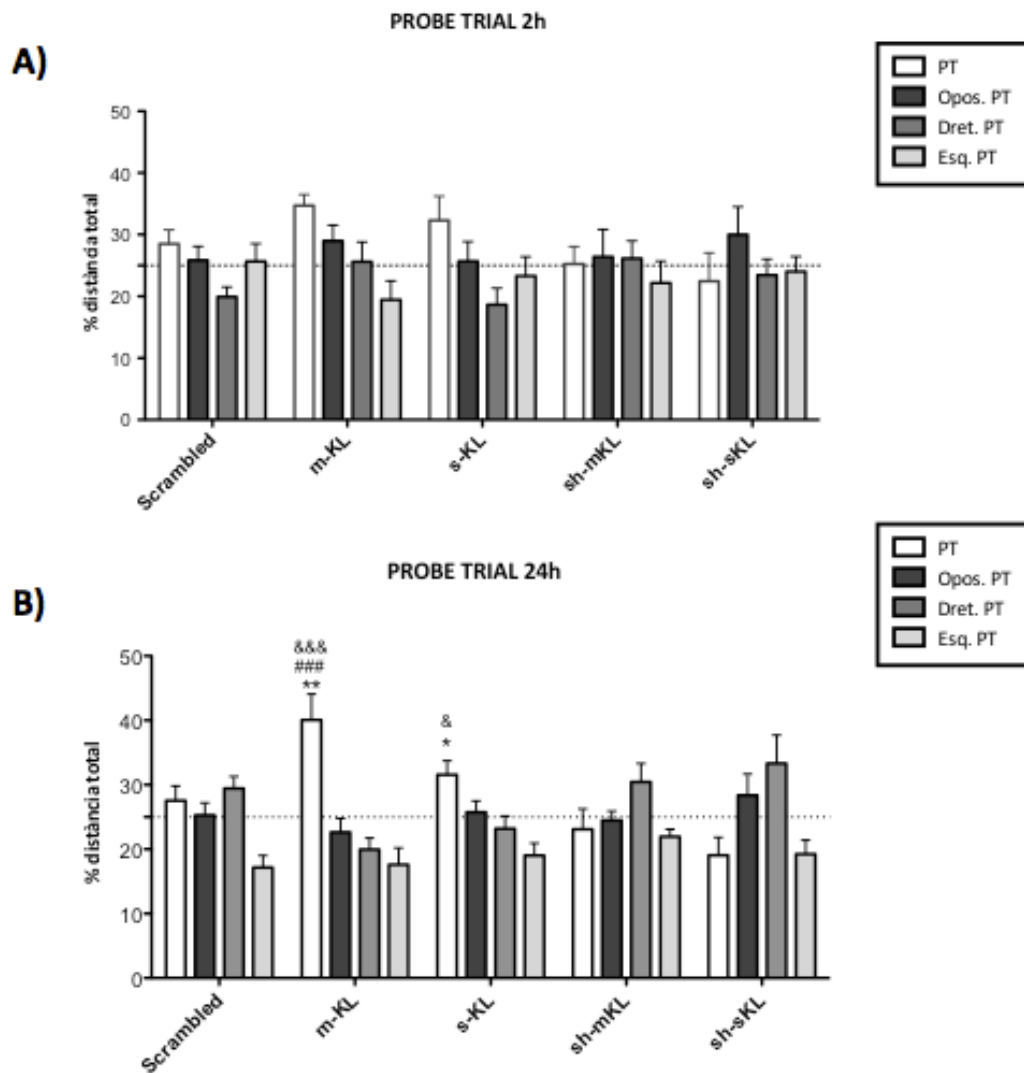


Figura 3.40- Anàlisi quantitatives dels assaigs de memòria final en el MWM en ratolins de 12 mesos d'edat. Les dades representen el percentatge de la distància total recorreguda durant el temps de la prova (60s) en cadascun dels quadrants de la piscina: PT (quadrant que contenia la plataforma), Opos. PT (quadrant oposat al de la plataforma) i Dret i Esq. PT (quadrants a la dreta i a l'esquerra respectivament del de la plataforma). **(A)** Probe trial 2 hores després de l'últim assaig d'aprenentatge de referència per avaluar la capacitat de retenció a curt termini. **(B)** Probe trial 24 hores després de l'últim assaig d'aprenentatge de referència per avaluar la capacitat de retenció a llarg termini. Mitjana \pm SEM. [ANOVA; *** $p < 0,0001$ i ** $p < 0,001$ * $p < 0,05$ vs. control] .

3.2.6- Anàlisi bioquímica dels models animals generats als 12 mesos d'edat.

En aquesta primera caracterització bioquímica dels models generats utilitzant vectors virals per transferència gènica a SNC es va decidir limitar l'estudi a hipocamp, l'estructura que havia estat injectada.

a) Expressió de m-KL i s-KL en hipocamp d'animals injectats

En primer lloc, es va voler comprovar que el procediment de transferència gènica en SNC amb AAVrh10 havia funcionat correctament. Per fer-ho es va dur a terme una PCR quantitativa amb mostres d'animals obtingudes als 9 mesos d'edat ($n=2$), és a dir, tres mesos després de l'administració dels vectors i es van analitzar els nivells d'expressió de m-KL i s-KL. Tal i com es mostra en la *Figura 3.41A*, en els animals injectats amb AAVrh10-mKL els nivells d'expressió d'aquest gen augmenten més de 4 vegades ($p=0,0182$) i en el grup injectat amb AAVrh10-sKL els nivells d'aquest gen augmenten unes 7 vegades, tot i que degut a la variabilitat no té significança estadística ($p=0,088$). Per contra, en els grups injectats amb shRNAs s'aconsegueix disminuir de manera bastant específica l'expressió en hipocamp, de m-KL (grup AAVrh10-shmKL) fins a 8 vegades ($p=0,031$) i de s-KL (grup AAVrh10-shsKL) fins a 10 vegades ($p=0,029$) (*Figura 3.41B*).

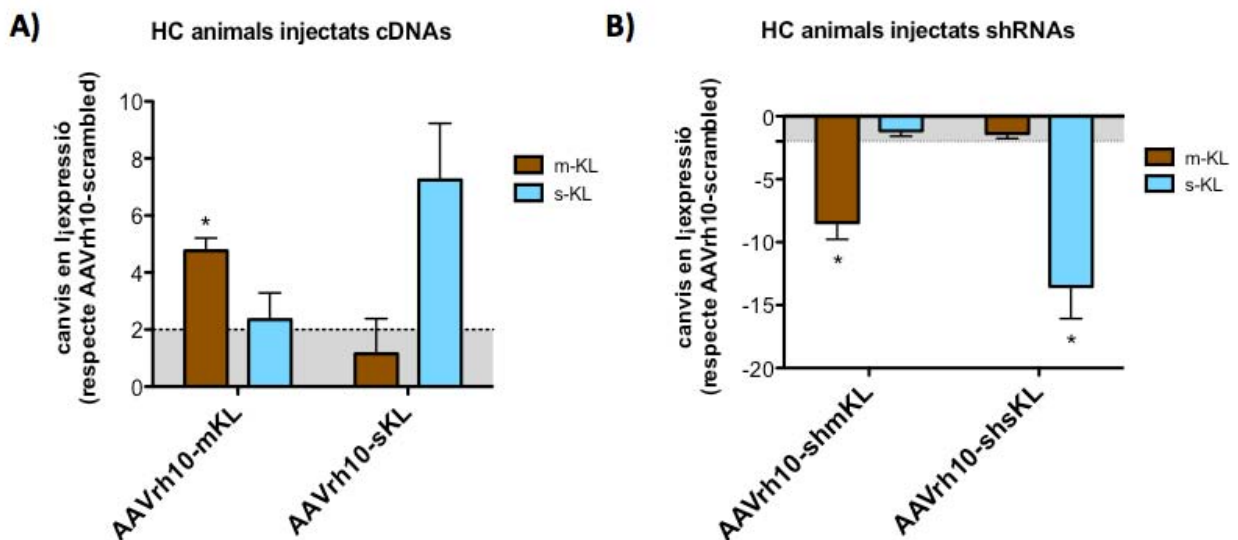


Figura 3.41- Sobreexpressió/ Inhibició de m-KL i s-KL en hipocamp mitjançant la injecció de vectors AAVrh10 portadors del cDNAs o shRNAs de klotho. 3 mesos després de la injecció dels vectors virals, es van analitzar els nivells d'expressió de m-KL i s-KL en animals injectats amb els constructes portadors dels cDNAs (A) o shRNAs (B) d'aquests gens. Les barres representen la mitjana \pm SEM del canvi en l'expressió respecte el grup control (AAVrh10-Scrambled). [ANOVA; ** $p < 0,001$ * $p < 0,05$ vs. control].

A més, un cop finalitzada la caracterització conductual, per Western Blot també va ser possible analitzar els nivells de proteïna s-KL utilitzant l'anticòs K113 en hipocamp d'animals injectats. Així, s'observa que només els 2 grups injectats amb el cDNA o l' shRNA específic de s-KL mostren canvis en

els nivells d'expressió en direcció oposada ($p=0,027$). Mentre que en el grup injectat amb s-KL l'expressió augmenta un 50% respecte el grup control, en el grup injectat amb l'sh-sKL disminueix gairebé en la mateixa proporció respecte el grup control (52%). En la resta de grups, els nivells de s-KL no es veuen afectats i romanen similar als del grup control (Figura 3.42). Aquests resultats confirmarien que aquests dos grups de ratolins injectats amb vectors virals en hipocamp podrien ser bons models per a estudiar els efectes de la sobreexpressió o inhibició de s-KL a nivell bioquímic i/o conductual.

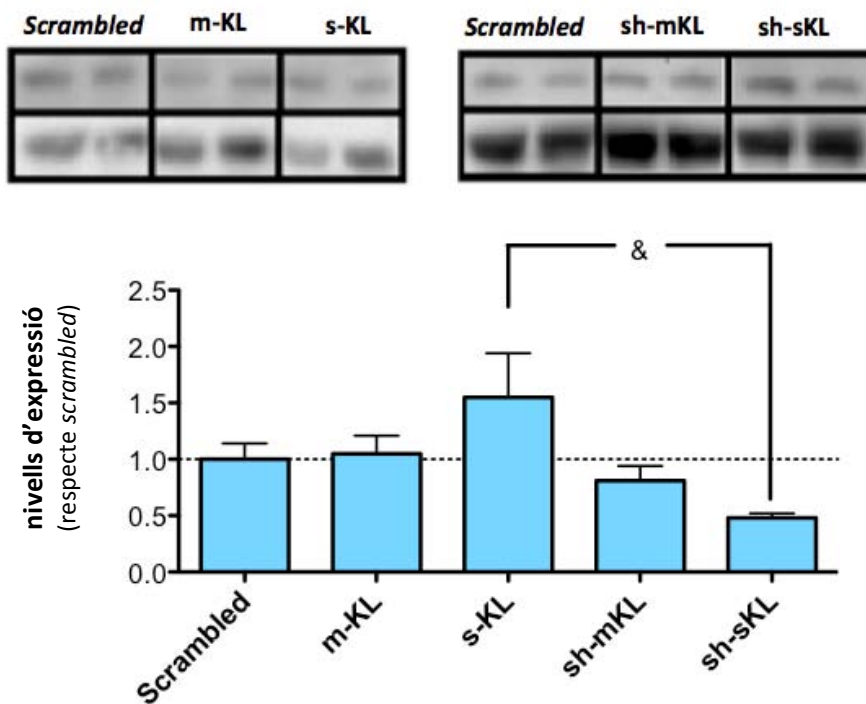


Figura 3.42- Anàlisi de la sobreexpressió o inhibició la proteïna s-KL en hipocamp per Western Blot utilitzant l'anticòs K113. Les barres representen la mitjana \pm SEM. L'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada (n= 4-5). [ANOVA; ** $p<0,001$ * $p<0,05$ vs. control]

b) Efectes sobre la expressió dels enzims antioxidants SOD2 i GPX1.

Per intentar valorar si existeix una relació entre els nivells de klotho (m-KL i s-KL) i la resposta a l'estrès oxidatiu, es van analitzar com la sobreexpressió i/o inhibició d'aquestes dues isoformes afectaven els nivells de les proteïnes *Superoxid Dismutase 2* (MnSOD o SOD2) i *Glutathione Peroxidase 1* (GPX1).

En el cas de SOD2 es va observar una correlació negativa amb s-KL: quan es disminueixen els nivells de s-KL (via sh-sKL) s'observava un increment en els nivells de proteïna MnSOD ($p=0.003$), que sorprenentment no té lloc en els animals injectats amb sh-mKL. Per contra, la sobreexpressió de ambdues isoformes, m-KL ($p=0,04$) i s-KL ($p=0,03$) provoca la disminució dels nivells de SOD2 (Figura 3.43). Aquests resultats suggereixen una implicació directa de s-KL en la resposta a l'estrès oxidatiu a través de l'enzim SOD2.

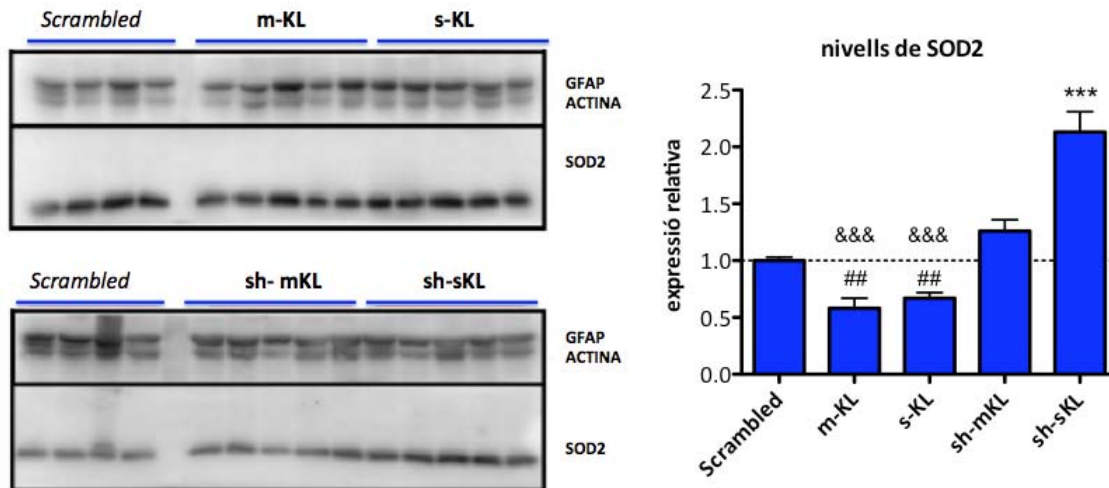


Figura 3.43- Nivells de proteïna SOD2 en animals injectats. Les barres representen la mitjana \pm SEM. L'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada ($n= 4-5$). [ANOVA; *** $p<0,0001$ vs. control; ## $p<0.001$ vs. sh-mKL; &&& $p<0.0001$ vs. sh-sKL]

El mateix experiment analitzant els nivells de GPX1, va mostrar que no es produïen canvis significatius a nivell de proteïna GPX1 ($p=0,64$), ni quan se sobreexpressa ni quan s'inhibeix l'expressió de klotho (Figura 3.44). Aquest resultat suggeriria que el sistema antioxidant GPX1 no es veu afectat per alteracions en els nivells de klotho.

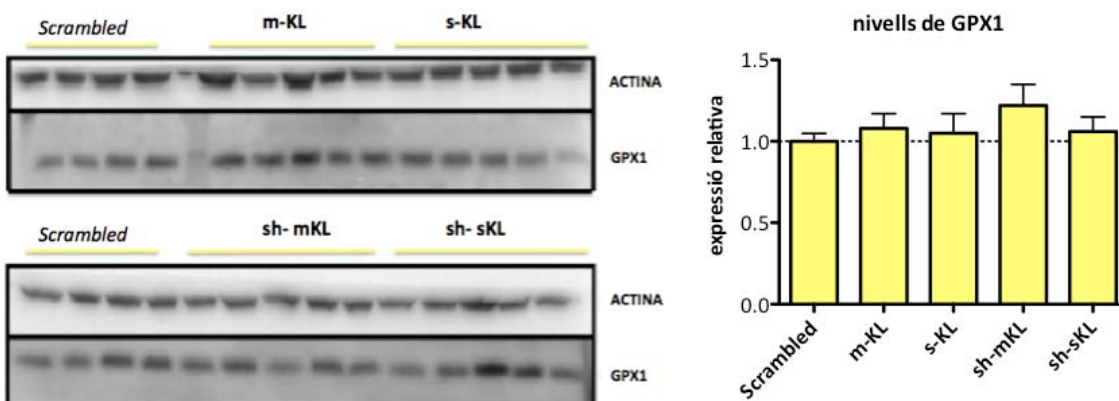


Figura 3.44- Nivells de proteïna GPX1 en animals injectats. Les barres representen la mitjana \pm SEM. L'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada ($n= 4-5$). [172]

C) Efectes sobre l'astroglíolisi.

Per últim, es va voler comprovar si la modulació dels nivells de klotho en SNC podia tenir un efecte sobre els processos d'astroglíolisi en els animals injectats.

Els astròcits són les cèl·lules més abundants del cervell. Les seves funcions no es limiten a proporcionar suport tròfic, metabòlic i estructural a les neurones, sinó que, a més d'establir una comunicació complex amb aquestes, participen activament en la senyalització sinàptica, la regulació del flux sanguini i la modulació dels precursors neuronals al SNC adult. En situacions de dany agut o crònic del SNC els astròcits adquireixen un estat reactiu (astroglíolisi reactiva) en el que aquestes cèl·lules mostren hipertrofia i un augment de diverses molècules com la proteïna GFAP i la NOS [108]. Diferents estudis han demostrat que durant l'envelliment cerebral té lloc una hipertrofia dels astròcits i un augment de la proteïna GFAP en cervell de ratolí, rata i humans [411].

Quan es van comparar els nivells de GFAP en els animals injectats, no es van detectar diferències entre grups ($p=0,64$), la qual cosa indicaria que en les condicions d'aquest estudi, als 12 mesos d'edat, els nivells de klotho no estarien relacionats amb processos d'astroglíolisi (Figura 3.45).

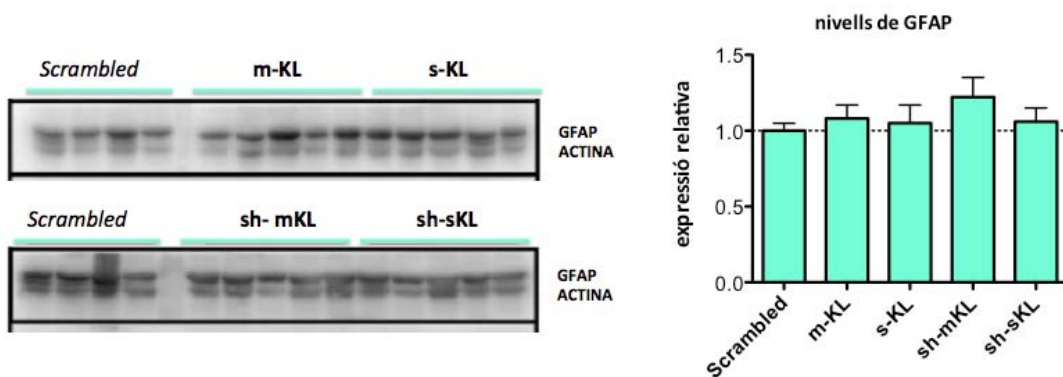


Figura 3.45- Nivells de proteïna GPX1 en animals injectats. Les barres representen la mitjana \pm SEM. L'actina s'utilitza per normalitzar la quantitat de proteïna carregada (n= 4-5).

IV. DISCUSSIÓ

4.1- Envel·liment, envelliment cognitiu i klotho

S'estima que l'any 2050, un 30% de la població mundial tindrà més de 65 anys [412]. En paral·lel a aquest augment en l'edat de la població, incrementa també, de manera preocupant, el risc de patir problemes de salut associats a l'envel·liment com ara malalties cardiovasculars, neurodegeneratives o autoimmunes, entre d'altres, [413-415] així com la necessitat d'augmentar el pressupost destinat a la cura i tractament d'aquestes patologies. Per tant, l'envel·liment de la població representa una de les grans transformacions socials del segle XXI i requereix d'intervencions polítiques, sanitàries, econòmiques i d'investigació, coordinades i enfocades a retardar els símptomes de l'envel·liment i aconseguir una etapa final de la vida més lliure de discapacitats i malalties [416]. Per aquest motiu, en els darrers anys ha crescut l'interès en l'estudi dels mecanismes moleculars i cel·lulars així com dels possibles gens reguladors implicats en aquest procés. De fet, estem assistint a l'esclat de la biogerontologia, ciència que pot tenir la clau de l'envel·liment saludable i que estudia a nivell molecular i genètic perquè hi ha persones que envelleixen més ràpid que d'altres o quines característiques fan especial els individus longeus. En aquest sentit, s'han descobert variacions genètiques que predisposen a malalties degeneratives o que promouen una major capacitat muscular malgrat l'envel·liment. A més, també s'encarrega d'estudiar la "immunosenesescència", camp en el qual s'ha descobert que amb el pas dels anys, els organismes desenvolupen més processos inflamatoris que poden conduir a la incidència de trastorns com l'arteriosclerosi, l'artritis o la obesitat. L'objectiu últim d'assolir aquest coneixement no implica allargar l'esperança de vida, però sí, retardar tot el possible l'aparició dels efectes indesitjables de l'envel·liment [1, 417-420].

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'envel·liment és un procés multifactorial que té lloc durant l'última etapa del cicle vital i que es caracteritza per la disminució progressiva de la capacitat funcional en tots els teixits i òrgans i la consegüent capacitat per ajustar-se als estímuls ambientals. A més, es tracta d'un procés altament diferencial i asincrònic en les seves manifestacions i existeix una gran heterogeneïtat entre individus, inclús entre òrgans i teixits d'un mateix individu. Probablement, una de les conseqüències més desfavorables de l'envel·liment són les alteracions que afecten el sistema nerviós en general, i el cervell en particular. Per tant, preservar la funció cerebral durant aquesta etapa final de la vida s'ha convertit en un gran repte biomèdic. De fet, s'estima que sense noves intervencions, més de 80 milions de persones en tot el món patiran problemes de memòria com a conseqüència de l'envel·liment o malalties relacionades amb l'edat [133]. L'envel·liment cerebral es caracteritza per alteracions en l'anatomia i fisiologia del cervell, que en darrer terme condueix a l'aparició d'alteracions en les funcions cognitives, com per exemple, la memòria. Entre les

alteracions relacionades amb l'envelliment cognitiu trobem les que afecten a la plasticitat sinàptica i la comunicació intraneuronal [421], les relacionades amb els neurotransmissors [422] i neurotrofines [423] i les vies d'activació i metabolisme cerebral [424].

Donat que l'envelliment és un procés susceptible al canvi, i tenint en compte que l'edat és el principal factor de risc per patir deteriorament cognitiu, aquells agents que s'encarreguen de regular-lo podrien esdevenir dianes terapèutiques prometedores pel tractament i prevenció de l'envelliment cognitiu [425]. En aquest sentit, elucidar si els factors que prolonguen la vida també poden prevenir, retardar o contrarestar la disfunció neuronal associada a l'envelliment o a processos neurodegeneratius és una qüestió crucial amb importants implicacions terapèutiques. Diversos metanàlisis han estudiat la proporció que representa el binomi gens-ambient (*nature vs. nurture*) en el procés d'envelliment i en el cerebral de manera més específica, assenyalant que la genètica representaria un 25%, mentre que seria l'ambient amb un 75% seria el que exerciria un paper més important [426-429]. Tot i així, hi ha gens que semblen tenir un important paper protector, destacant els que codifiquen proteïnes implicades en la via de senyalització de la insulina i IGF-1 [430], la metilació i acetilació del DNA i proteïnes [424], la reparació del DNA [431] i el metabolisme dels greixos [432].

Així doncs, en el context d'aquesta tesi doctoral centrada en la búsqueda de factors neuroprotectors per retardar els efectes nocius del pas del temps sobre les funcions cognitives, *Klotho* va emergir com un gen candidat molt interessant, juntament amb *SIRT1*. Ambdós gens es troben relacionats amb la via de la insulina i es creu que també podrien estar mediant alguns dels efectes observats en condicions de restricció calòrica [338, 433]. El gen *SIRT1*, el membre més estudiat de la família de les sirtuïnes en mamífers, té múltiples funcions en diversos òrgans i teixits. Tot i així, diferents treballs indicarien que la seva influència sobre l'envelliment i l'esperança de vida podria deure's a la seva activitat en neurones del SNC. De manera sistèmica, *SIRT1* està implicat en la regulació del metabolisme energètic i el ritme circadià a través de la seva activitat en el nucli hipotalàmic [434]. Des d'una perspectiva biològica cel·lular, *SIRT1* és un component de múltiples xarxes de regulació interconnectades que modulen el creixement axonal i dendrític, així com la supervivència en condicions d'estrès. L'activitat neuronal de *SIRT1* també és important pel manteniment de la plasticitat neuronal i les funcions cognitives, així com per la protecció contra la degeneració neuronal i el deteriorament cognitiu associats a l'edat [435]. D'altra banda, *klotho* és un gen regulador de l'envelliment que quan se sobreexpressa augmenta l'esperança de vida en ratolins (16123266)[54] i quan s'inhibeix la seva expressió s'accelera el desenvolupament de fenotips d'envelliment accelerat

[51]. És més, s'ha observat que en humans la variant al·lèlica KL-VS en el locus klotho, que incrementa els nivells de klotho soluble [232], promou la longevitat i disminueix el risc de patir malalties cardiovasculars [235]. En cervell, klotho s'expressa abundantment en cèl·lules epitelials del plexe coroide i en cèl·lules cerebel·lars de Purkinge, així com també en neurones hipocampals [51]. En conjunt aquestes dades, suggereixen que klotho podria estar influenciant una gran varietat d'estructures i funcions durant la maduració i l'envelliment del SNC.

En primer lloc, a l'hora d'escollir entre aquests dos gens candidats, es va valorar el fet que en el moment de plantejar aquest treball, existien força dades publicades que implicaven a SIRT1 en funcions cognitives i envelliment i diversos grups investigant la seva implicació en aquests processos [434, 436-439]. Per contra, poc es coneixia sobre el paper de klotho en la regulació i el manteniment de les funcions del SNC. Tot i així, des del seu descobriment l'any 1997 per *Kuro-o et al.* se sabia que, després del ronyó, el plexe coroide era l'òrgan que mostrava una expressió de klotho més elevada [51]. *Nagai (2003)*, poc després també va descriure que el model *knock-out* de klotho presentava problemes cognitius a l'edat de 7 setmanes i un increment de neurones apoptòtiques en hipocamp, molt probablement resultat d'un increment en l'estrès oxidatiu ([317]. A més, *Imura (2007)* en el seu treball havia estat capaç de detectar mitjançant l'ús d'anticossos, expressió de m-KL i p-KL en plexe coroide i hipotetitzava sobre la seva possible implicació en el transport de Ca^{2+} en cervell basant-se en (i) que el nombre Na^+, K^+ -ATPases en el ratolí *kl-/kl-* és inferior al dels ratolins *wild-type*; (ii) d'acord amb això, la concentració total de calci en CSF ($[\text{Ca}]_{\text{CSF}}$) en el ratolí *kl-/kl-* és un 23,6% inferior a la dels ratolins *wild-type*; i (iii) tant el nombre de Na^+, K^+ -ATPases en superfície com la secreció de klotho responen a baixades en els nivells de $[\text{Ca}]_{\text{CSF}}$. [440]. De fet, la "teoria del desequilibri de la homeòstasi del calci" postula que els canvis sostinguts en la regulació de la concentració de calci intracel·lular, són la principal causa de l'envelliment cerebral. Aquestes alteracions estarien afectant a la vegada la transducció sinàptica, l'alliberament de neurotransmissors i la transducció de senyals, causant dèficits de memòria [441]. Per últim, s'acabava de publicar l'estudi de *Duce et al. (2008)* on per primer cop clarament s'assenyalava klotho com una peça clau en els canvis observats durant l'envelliment en matèria blanca de cervell en primats [240].

Finalment, i essent conscients d'estar optant per una aproximació arriscada, vam decidir estudiar klotho i el seu paper en el procés d'envelliment cerebral. Així, vam decidir dividir aquest treball en dos grans blocs. Primer, vam creure interessant caracteritzar detalladament l'expressió de klotho (a nivell d'mRNA i proteïna) en SNC tant durant l'envelliment fisiològic com durant l'envelliment patològic (malaltia d'Alzheimer). A més, es va voler analitzar si la practica d'exercici físic continu i

moderat durant l'etapa adulta, una de les intervencions amb efectes neuroprotectors més ben estudiada [442], era capaç d'induir canvis en l'expressió cerebral de klotho, un factor anti-envelliment. En segon lloc, pel ja exposat anteriorment, klotho presentava un conjunt de característiques molt atractives que feien pensar en ell com a potencial factor neuroprotector. Aprofitant l'expertesa del nostre laboratori en la generació de vectors virals de teràpia gènica, una valuosa eina per a l'estudi de la funció gènica, també es va voler avaluar *in vivo*, els efectes conductuals i cognitius de la sobreexpressió de klotho en SNC en animals adults, utilitzant vectors adenoassociats.

4.2. Estudi de la isoforma s-KL: Per què?

Una de les qüestions importants que ens vam haver de plantejar a l'hora de caracteritzar l'expressió de klotho va ser els seus mecanismes de processament gènic i proteic, molt poc estudiats. Segons els primers treballs, el gen klotho codifica dos transcrits, un que genera una proteïna transmembrana de 130kDa (m-KL) i un altre, produït per splicing alternatiu, que genera una proteïna secretada d'uns 70 kDa (s-KL). Aquest transcrit alternatiu conté una senyal específica de secreció formada per una cua de 15 aminoàcids que no es troba en el transcrit m-KL. L'existència d'aquest mRNA alternatiu de klotho detectat en humans [274] i ratolins [275], va donar lloc a la hipòtesi de que existia una forma de klotho extracel·lular. Aleshores també es va especular que aquesta suposada proteïna secretada formada només pel domini KL1 podia tenir un paper important com a factor humoral. No obstant, els resultats del treball d' *Imura et al. (2004)* en el que es desenvolupaven anticossos monoclonals per a la detecció de klotho en fluids corporals indicaven que, malgrat els intents, no havia estat possible detectar el domini KL1 soluble producte de l'splicing alternatiu de klotho en compartiments extracel·lulars. Per contra, en aquest mateix estudi sí que va ser possible detectar una proteïna de 130kDa tant en sèrum com en fluid cerebroespinal (CSF), de manera que es va proposar una revisió sobre la possible importància dels productes derivats del processament de la proteïna transmembrana ([276]. Poc després, *Bloch et al. (2009)* en el seu estudi utilitzant aproximacions de sobreexpressió i inhibició va evidenciar que klotho és processat per les α -secretases ADAM10 i ADAM17 així com per la β -secretasa BACE1 [443]. És a dir, en determinades circumstàncies, el domini extracel·lular de m-KL és alliberat generant una nova forma soluble de klotho, d'uns 130kDa, que ha estat detectada en sèrum, orina i CSF. És més, l'estudi de *Chen (2007)* va descriure que de fet, existiria un segon lloc de tall per aquestes proteases entre els dominis KL1 i KL2, que podria generar dos noves isoformes, també solubles, de 70kDa, una formada pel domini KL1 (p-KL1) sol i l'altre

formada pel domini KL2 sol (p-KL2) [277]. En conjunt aquestes dades suggereixen que klotho pot entrar al sistema circulatori a través de dos mecanismes principals: (a) per splicing alternatiu o (b) per processament proteolític de la forma transmembrana. Fins aleshores, aquesta gran varietat d'isoformes de klotho havia conduït a una nomenclatura confusa i havia fet difícil poder assignar funcions específiques a cadascuna d'elles [280, 444, 445]. Finalment, per adreçar aquesta qüestió, vam decidir adoptar la nomenclatura proposada per *Forster et al. (2011)* on: m-KL designa la forma *full-length* transmembrana de klotho; p-KL designa la forma proteolitzada de klotho formada pel domini extracel·lular sencer (KL1+KL2); i s-KL designa la forma secretada de klotho, generada per splicing alternatiu [446].

Per caracteritzar exhaustivament el perfil d'expressió de klotho durant l'envelliment del SNC en diferents àrees cerebrals, es va analitzar de manera específica l'expressió de les dues isoformes principals de klotho, m-KL i s-KL. Tenint en compte que la majoria de treballs publicats fins aleshores havien centrat la seva atenció gairebé exclusivament en la forma transmembrana de klotho, es va creure interessant poder analitzar separatament els perfils d'expressió de les dues isoformes per poder observar-ne similituds o diferències. Per a l'anàlisi transcripcional dels dos mRNAs de klotho, es van utilitzar primers específics per amplificar mitjançant qPCR els transcrits de m-KL i s-KL. D'aquesta manera, s'ha pogut obtenir per primer cop el perfil d'expressió de s-KL en un òrgan diferent de ronyó. De fet, fins ara únicament dos treballs anteriors havien analitzat ambdues formes d'splicing de l'mRNA de klotho, amb resultats poc clars sobre la especificitat de funcions de cada isoforma. *Lu (2008)* va comprovar que nivells elevats en l'expressió del mRNA de s-KL correlacionen amb la progressió i els risc de patir càncer d'ovari i amb un increment en l'expressió d'IGF-1, mentre que aquesta associació no s'observa per a m-KL, la qual cosa podria ser indicativa de que els dos transcrits de klotho tenen funcions diferents [447]. D'altra banda, *Forster et al. (2011)* van demostrar que la 1,25-dihidroxivitamina D (1,25D) és capaç d'augmentar l'expressió d'ambdós transcrits de klotho en ronyó [446]. En el nostre cas, hem pogut observar que durant l'envelliment cerebral i la progressió de la malaltia d'Alzheimer els mRNAs de m-KL i s-KL es veuen afectats en el mateix sentit, es troben disminuïts, en diferents regions cerebrals, d'acord amb d'altres treballs publicats [240, 448, 449]. Tot i que això no implica semblança en les seves funcions, si que suggereix que els mecanismes que regulen la seva expressió cerebral són compartits, i que per tant, aquesta disminució en la expressió de klotho durant l'envelliment en SNC afecta de manera similar tots dos transcrits. Per últim, val la pena remarcar, que *Lu et al. (2008)* en mostres humanes de càncer d'ovari va observar que un 70% de l'expressió de klotho correspon a la isoforma s-KL [447]. No sabem si aquest fet pot ser degut a que en l'estudi es van analitzar mostres tumorals on la ratio m-KL/s-KL pot trobar-se

alterada, tot que de fet, en humans ja s'havia descrit que a diferència del que passa en ratolins, la isoforma s-KL és la que s'expressaria més abundantment [274, 275]. Aquest últim motiu també es va considerar important a l'hora de decidir analitzar els nivells d'expressió de s-KL durant l'envelliment cerebral i la patologia d'AD, tenint present però aquesta diferència en el perfil d'expressió entre isoformes entre humans i ratolins.

De fet, malgrat actualment la importància fisiològica de la forma m-KL es troba ben establerta [450], el paper de la isoforma s-KL, si és que en té algun, encara no està clar i alguns autors com *Froster et al. (2011)* fins i tot dubten que aquest mRNA alternatiu pugui donar lloc a una proteïna funcional [446]. L'existència d'una forma circulant de klotho que es correspongui exactament amb el pèptid que es produiria per splicing alternatiu no ha estat detectat en sèrum o CSF [276], malgrat existeix un estudi no publicat on es reporta aquest fragment en orina de ratolí. Finalment es va concloure que probablement aquest pèptid (format únicament pel domini KL1) era resultat de l'escissió proteolítica, però la possibilitat que aquest pèptid pugui procedir de l'splicing alternatiu del mRNA de s-KL no pot ser exclosa. De fet, el domini KL1 proteolitzat o el generat per splicing alternatiu tenen un pes molecular similar (uns 70kDa). Malgrat la funció de s-KL i p-KL1 es desconeixen, ambdues proteïnes podrien actuar com a hormones i regular funcions en òrgans i cèl·lules que no expressen klotho. *Abramovitz et al. (2011)* en el seu treball va proposar que independentment del seu origen, el pèptid de klotho que conté únicament el domini KL1 presenta certes propietats. És més, va demostrar que el cDNA que codifica pel domini KL1 de klotho produeix un pèptid que pot actuar com a supressor de tumors en cèl·lules pancreàtiques, de manera més potent que el cDNA de m-KL, contradient els resultats obtinguts per *Lu et al. (2008)* en els seus estudis en càncer d'ovaris [447]. Finalment, en els darrers anys, l'estudi de la isoforma proteica s-KL produïda per splicing alternatiu del gen klotho ha estat progressivament oblidat pels grups que estan treballant en el camp. Aquest fet pot ser degut a que tot i els nombrosos esforços fets per identificar la isoforma s-KL (70kDa) utilitzant anticossos mai ningú fins ara ha estat capaç de detectar-la [276, 451], i per tant, s'ha hipotetitzat que podria tractar-se d'un mRNA amb funcions reguladores que no arriba mai a generar una proteïna estable.

De la mateixa manera que s'havia fet l'estudi de caracterització a nivell transcripcional, es va voler també obtenir el perfil d'expressió per a m-KL i s-KL a nivell proteic. Malgrat existien alguns anticossos comercials disponibles per a l'estudi de klotho, tots ells reconeixen epítops que són compartits per més d'una isoforma proteica. Per exemple, aquells dissenyats contra el domini KL1 poden reconèixer m-KL, s-KL, p-KL i p-KL1, essent només possible diferenciar en assajos de Western blot per diferència de tamany entre les tres primeres isoformes, però en cap cas entre s-KL i p-KL1.

En aquest punt i donada la manca d'anticossos comercials disponibles, vam decidir generar un anticòs propi per a la detecció específica dels nivells de proteïna s-KL anomenat K113. Aquest anticòs contra el pèptid C-term exclusiu de la isoforma s-KL va ser validat en estudis *in vitro*. Sorprenentment, va demostrar ser extremadament específic detectant una banda d'uns 70 kDa en cèl·lules transfectades amb s-KL, però no en cèl·lules control. En el marc del nostre estudi també va ser possible detectar l'expressió de la proteïna s-KL directament en mostres de ronyó i cervell, així com també en alguns altres òrgans com ara testicles o melsa (dades no mostrades). És més, es va poder comprovar que, a diferència de la forma m-KL, els nivells d'expressió de la proteïna s-KL són molt elevats en cervell però molt baixos en ronyó, la qual cosa suggereix que la seva activitat podria ser important en sistema nerviós. Aquest fet no va ser observat a nivell d'mRNA. Un estudi més detallat va revelar que la proteïna s-KL pot ser detectada en diferents regions cerebrals en ratolí. Els nostres resultats mostren que el cerebel i l'hipocamp són les estructures amb nivells més alts de proteïna s-KL, encara que també es detecta en còrtex prefrontal i còrtex cerebral.

Així doncs, els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral demostren per primera vegada que el transcrit de *klotho* produït per splicing alternatiu genera una proteïna estable, que pot ser detectada directament en mostres de proteïna provinents de teixit utilitzant el nou anticòs generat K113. Per tant, la identificació de la proteïna s-KL generada per splicing alternatiu del gen *klotho* obre un nou i ampli camp d'estudi amb possibles implicacions terapèutiques que avarca diverses qüestions, des de conèixer on es produeix, si realment és important per a les funcions cerebrals, o si és capaç d'afectar les mateixes vies de senyalització que m-KL. Per descomptat, l'estudi de la seva expressió en diverses patologies on els nivells de *klotho* s'han vist alterats, com l'Alzheimer o la diabetis, ha de proporcionar dades molt útils per avaluar la seva capacitat d'actuar com a factor protector i antienvelliment.

Per limitacions de temps, un cop finalitzat aquest treball dues preguntes que considerem clau en l'estudi de s-KL han quedat obertes. En primer lloc, després d'haver descrit la presència de s-KL, una nova isoforma soluble de *klotho* generada a partir d'un mRNA alternatiu, creiem que seria convenient revisar tots els estudis realitzats utilitzant el kit d'ELISA comercial més utilitzat per a la detecció de *klotho*, desenvolupat contra el domini comú KL1 [444], comú a s-KL i p-KL, ja que des del nostre punt de vista, la actual quantificació no es pot considerar del tot acurada [273, 281, 337, 445, 452]. En aquest sentit l'anticòs K113 pot esdevenir una eina valuosa per distingir entre les proteïnes s-KL i p-KL, i detectar de manera específica la presència de s-KL en fluids corporals, més encara si s'utilitza en un ELISA. D'aquesta manera, potser algunes de les funcions atribuïdes a la isoforma

proteolitzada (p-KL) haurien de ser reassignades a la isoforma secretada (s-KL). L'altre tema que es planteja a partir dels resultats obtinguts és si realment, *in vivo*, es produeix un segon processament proteolític de la isoforma p-KL (130kDa) donant lloc a p-KL1 (70kDa), una proteïna que conté només el domini KL1 de klotho, però que no conté la senyal de secreció exclusiva de la isoforma s-KL, generada per splicing alternatiu. Tot i que treballs recents així ho indicarien, és important adonar-se que únicament s'ha pogut detectar p-KL1 (70kDa) en experiments *in vitro* [277, 279]. Tenint en compte els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral, on es detecten nivells d'expressió elevats de s-KL directament en homogenats proteics d'animals *wild-type*, no es pot descartar, que aquesta isoforma de klotho sigui la única que es produeix *in vivo* d'acord amb el treball de *Kato et al (2009)*[451], i per tant, la seva funció sigui única o essencial. Per això, calen nous estudis centrats en el paper de s-KL que adrecin la seva implicació en algunes funcions ja descrites per a m-KL com els processos de mielinització [335, 453] o la regulació de les sinapsis glutamatèrgiques [337, 454].

4.3. Caracterització de l'expressió de klotho en SNC durant l'envelliment

Fins ara, diversos estudis s'han encarregat d'analitzar l'expressió de klotho en alguns òrgans. Tot i així, malgrat klotho va ser descrit per primera vegada com un factor antienvelliment [51], la majoria d'estudis han estat realitzats en etapes fetals, postnatales o en animals joves. És més, encara que l'expressió en cervell de klotho ha estat assenyalada com a clau en l'envelliment del SNC, només el treball de *Duce et al. (2008)* estudia l'expressió de klotho en homogenats de cervell total durant l'etapa adulta, dels 6 als 24 mesos d'edat en la soca de ratolí B6D2F1, observant una reducció d'entre 2 i 3 vegades en l'mRNA de klotho durant l'envelliment quan s'analitzen mostres d'homogenats procedents d'hemisferis totals de cervell [240]. Els resultats obtinguts en aquest estudi es troben dins del mateix rang que les nostres dades. Dades similars s'han descrit també durant l'envelliment en matèria blanca de micos *rhesus* ancians [240].

En relació als estudis sobre la localització de l'expressió de klotho en SNC, l'expressió de la proteïna klotho s'ha detectat per immunoblot en homogenats de cervell total [448] però no existeixen encara evidències clares sobre la seva expressió en diferents regions cerebrals. Això podria ser degut a una deficiència en eines de detecció eficaces, a una baixa expressió de klotho, i/o a una baixa transcripció de klotho en cervell [314]. En aquest sentit, la pregunta que ens plantejàvem era si el perfil d'expressió de les isoformes m-KL i s-KL de gen klotho era uniforme al llarg de les diferents regions cerebrals analitzades (còrtex prefrontal, còrtex, hipocamp i cerebel) o si per contra, variava depenent

de l'àrea. *Clinton et al. (2013)* van descriure en el seu treball que els nivells de m-KL es mantenen relativament estables en hipocamp durant el desenvolupament, mentre que en còrtex, l'mRNA de m-KL es transcriu abundantment durant la primera setmana de vida, disminueix de P0 a P21 i després augmenta significativament durant l'etapa adulta, suggerint que m-KL estaria jugant papers diferents tant en diferents moments durant el desenvolupament neuronal com dins de diferents regions cerebrals durant aquests períodes [314].

4.3.1. Els nivells de klotho en SNC decauen significativament durant l'envelliment

Amb l'objectiu de conèixer si la transcripció dels 2 mRNAs de klotho (m-KL i s-KL) està regulada de manera similar o diferent durant l'envelliment es van estudiar els seus nivells d'expressió en SNC a diferents edats: 6, 9, 12 i 18 mesos. Tal i com ja s'havia descrit anteriorment [275], també vam observar que els nivells del transcrit m-KL eren superiors als de s-KL en mostres murines de cervell i ronyó. És més, quan es van analitzar els seus nivells de transcripció en diferents àrees cerebrals, vam poder observar que el perfil d'expressió de klotho no era uniforme en cervell. Per últim, vam comprovar que els nivells d'expressió es veien disminuïts significativament durant l'envelliment en totes les àrees analitzades. D'altra banda, malgrat ambdós transcrits mostraven un perfil espai-temporal similar, aquests no eren idèntics, la qual cosa podria suggerir funcions diferents. Per exemple, en cerebel els nivells de m-KL es veuen reduïts 10 i 50 vegades en ratolins de 12 i 18 mesos d'edat respectivament, mentre que els nivells de s-KL romanen encara constants als 12 mesos i no comencen a decaure fins als 18 mesos (unes 3 vegades). Donat que el cerebel és una estructura on klotho s'expressa abundantment, les diferències entre s-KL i m-KL podrien ser indicatives de funcions fisiològiques no relacionades entre s-KL i p-KL. Per adreçar aquestes qüestions serien necessaris estudis addicionals (en relació, entre d'altres, a diferències en la distribució subcel·lular o en l'estabilitat proteica, per exemple) per intentar elucidar si s-KL i p-KL tenen funcions diferents o si són dues isoformes funcionalment idèntiques.

En aquest sentit, l'anticòs K113 ens va permetre detectar que malgrat els nivells d'expressió de l'mRNA de s-KL són similars en cervell i ronyó, els nivells de proteïna s-KL són unes 10 vegades superiors en cervell que en ronyó. Aquesta diferència inesperada suggereix que mentre que en ronyó s-KL seria ràpidament secretat al torrent circulatori, en cervell tendria a acumular-se en el parènquima cerebral fent possible la seva detecció en diverses àrees com còrtex prefrontal, còrtex cerebelar, hipocamp o cerebel. Tot i així, no es poden descartar altres possibilitats com per exemple que el s-KL renal s'acumuli també en cervell, o la presència en SNC de determinats factors que

estabilitzin aquesta isoforma de klotho. D'altra banda, considerant que el cervell és un dels principals òrgans on s'expressa klotho [275] i el seu paper neuroprotector [303, 321], l'evidència d'una distribució específica de s-KL en aquest òrgan, tant a nivell temporal com local, sembla tenir una rellevància funcional. En aquest sentit, creiem que com a mínim s-KL (i probablement també p-KL), poden tenir un paper clau en l'activitat neuronal i especialment en les funcions cognitives. Per tant, la detecció de la proteïna s-KL en hipocamp o còrtex prefrontal, estructures importants en relació a processos d'aprenentatge i memòria, així com la disminució de la seva expressió durant l'envelliment cerebral la converteixen en una bona diana d'estudi en l'àrea de l'envelliment cognitiu i la búsqueda de factors neuroprotectors.

Per últim, som conscients que en aquesta caracterització de klotho, manca l'estudi del perfil proteic de m-KL i hi estem treballant. De fet, malgrat existeixen anticossos comercials per a l'estudi de la biologia de la proteïna klotho, els problemes d'especificitat i de funcionalitat en les seves aplicacions són avui en dia, importants barreres per seguir avançant [455]. Tot i així, un treball recent de *Dubal et al. (2014)* detecta l'expressió de m-KL utilitzant anticossos comercials (*KM2076*) en mostres d'hipocamp de ratolins de 3 mesos wild-type o transgènics per a klotho [454]. En el nostre cas, malgrat diversos intents per posar a punt tres anticossos comercials *sc-22220 (Santa Cruz Biotechnology)*, *ab181131 (Abcam)* i *KM2076 (Cosmo Bio Co. Ltd)* no vam poder obtenir cap resultat satisfactori. Des del nostre punt de vista, la poca disponibilitat i diversitat d'eines per a l'estudi de klotho esdevé un factor limitant, tal i com comenta *Maltare et al. 2014* [455]. Per exemple, l'anticòs més utilitzat i específic disponible *KM2076* és capaç de detectar klotho en mostres humanes i murines per Western blot quan els nivells d'expressió són elevats, majoritàriament en cèl·lules transfectades i ronyó [312, 451, 456] però la detecció de klotho a nivells d'expressió baixos és ineficient, fins i tot quan l'mRNA es detecta fàcilment [314].

4.3.2. Els nivells de klotho en cervell decauen més ràpidament en el model 3xTg d'AD que en ratolins control.

Diferents estudis publicats recentment, suggereixen que klotho podria estar jugant un paper clau en la malaltia d'Alzheimer. *Semba et al. (2014)* van demostrar en el seu treball que els nivells de klotho en CSF en pacients d'Alzheimer es troben disminuïts en comparació a adults ancians sense problemes cognitius [281]. És més, *Dubal (2015)* va evidenciar el paper neuroprotector de klotho en un model murí d'Alzheimer (*hAPP*), mostrant que l'augment dels nivells de klotho és capaç de reduir eficientment la mortalitat prematura, els dèficits cognitius, les alteracions conductuals i la disfunció de la xarxa sinàptica en aquest model, sense alterar els nivells d'hAPP [454]. Aquests resultats estan

d'acord amb els obtinguts per *Kuang et al (2014)*, on detectava que l'augment de l'expressió klotho seria responsable en part dels efectes neuroprotectors del compost ligustilide en el model d'envelliment accelerat SAMP8 [321]. A més, *Li et al (2010)* ja havia descrit que l'expressió de klotho depèn dels gens *amyloid precursor protein (APP)* i *APP-like Protein 2 (APLP2)* [457].

Fins ara, diversos treballs han analitzat com alteracions en els nivells de klotho afecten la senyalització mediada per insulina, mTOR o Wnt, així com l'estrès oxidatiu, la producció d'òxid nítric, l'activitat de canals iònics, la diferenciació dels oligodendròcits o el seu paper neuroprotector en el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer (AD). No obstant, cap d'ells s'ha parat a analitzar com canvia l'expressió de klotho durant la progressió d'aquesta malaltia. Amb aquesta finalitat es va estudiar l'expressió de m-KL i s-KL en el model d'Alzheimer triple transgènic (*3xTg*) a diferents etapes de la progressió de la malaltia: 6, 9 i 12 mesos.

D'entre els diferents models animals per a l'estudi d'AD, destaca el model triple transgènic (*3xTg*), produït en el laboratori del *Dr. La Ferla* l'any 2003 i que expressa els transgens humans APP_{Swe} , TAU_{301L} i PS_{M146V} , totes elles, mutacions trobades en pacients d'AD [458]. Es tracta d'un model que mimetitzava molt bé els símptomes de la malaltia, tant des del punt de vista histopatològic com per les alteracions conductuals i cognitives. L'any 2004 es va crear una colònia d'aquest model en la Unitat de Psicologia Mèdica del Institut de Neurociències de la UAB, i aprofitant que aquest model estava sent utilitzat en un altre projecte del nostre laboratori, es va decidir analitzar les mostres d'RNA i proteïna de les àrees cerebrals estudiades anteriorment (CPF, CX, HC i CX) per analitzar mitjançant qPCR i Western Blot l'expressió de m-KL i s-KL.

Així, vam poder observar que, tant des del punt de vista d' mRNA com de proteïna, els nivells de klotho decauen més ràpidament en el model *3xTg* que en animals control de la mateixa edat. Tenint en compte que la disminució és més pronunciada en animals de mitjana edat que en animals d'edat més avançada, i que no és uniforme en les diferents regions analitzades, els resultats suggereixen que el perfil d'expressió d'ambdues isoformes de klotho durant l'envelliment cerebral patològic és diferent a l'observat durant l'envelliment normal o fisiològic. Aquestes dades podrien ajudar a discernir en quin grau la reducció en l'expressió de klotho està associada a l'envelliment o amb la malaltia d'Alzheimer. És més, el fet que l'expressió de l'mRNA es trobi disminuïda significativament ja durant les primeres etapes d'AD, el posicionen com a possible marcador predictiu de la malaltia. En aquest sentit, seria útil investigar el perfil d'expressió de klotho (i en particular de s-KL pels seus elevats nivells d'expressió en cervell) en d'altres malalties neurodegeneratives.

4.3.3. L'exercici físic continu i moderat durant l'etapa adulta ajuda a prevenir la caiguda dels nivells de klotho en cervell durant l'envelliment

Diversos factors del nostre estil de vida, com ara l'estimulació intel·lectual, les relacions socials, la dieta i diferents tipus d'exercici semblen tenir un efecte protector front el risc de patir trastorns associats a l'edat com ara la malaltia d'Alzheimer o la demència vascular [405]. De fet, nombrosos treballs assenyalen que promoure l'activitat física pot tenir un efecte protector contra el deteriorament cognitiu [405, 459-461].

També s'ha descrit que l'expressió de klotho pot veure's afectada en condicions fisiològiques i patològiques tant a nivell transcripcional com post-transcripcional. Per exemple, se sap que PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*), un factor de transcripció implicat en processos d'adipogènesis, homeòstasi de la glucosa i inflamació, és capaç d'augmentar l'expressió de klotho, a nivell de proteïna i d'mRNA, en ronyó [462]. D'altra banda l'angiotensina II presenta efectes oposats també en ronyó [299] i s'ha vist que el bloqueig del receptor d'angiotensina tipus 1 (AT1R) incrementa els nivells circulants de klotho en humans [463]. L'estrès oxidatiu també disminueix l'expressió de klotho en cèl·lules de ronyó [246]. És més, alguns estudis prèvis havien suggerit que la pràctica d'exercici incrementa PPAR γ [464] i disminueix AT1R [465] i l'estrès oxidatiu [466]. Tot i així, únicament el treball de *Matsubara et al. (2014)* examina a nivell sistèmic els efectes de l'exercici físic sobre l'expressió de klotho, demostrant que l'exercici aeròbic augmenta la concentració de klotho en plasma (p-KL, segons l'article), probablement a través d'un augment en la producció de PPAR γ i una disminució en AT1R i l'estrès oxidatiu en ronyó [467].

Per últim, en aquest estudi vam voler analitzar si la pràctica d'exercici físic voluntari i moderat, estava afectant l'expressió de klotho en cervell. De manera interessant, vam poder observar que l'exercici físic continu i moderat realitzat tant a l'etapa adulta jove és capaç d'augmentar significativament l'expressió dels transcrits m-KL i s-KL en diverses regions cerebrals, tant en animals de 6 mesos com en animals de 18 mesos d'edat. No obstant, a nivell de proteïna aquest efecte només va ser significatiu en còrtex prefrontal però no en la resta d'àrees analitzades on s'observa una tendència positiva però no estadísticament significativa. Se sap que l'exercici físic (*running wheel*) incrementa la densitat de les espines dendrítiques i el nombre de sinapsis en hipocamp [204, 468] així com també en còrtex prefrontal [469]. És més, la practica moderada d'exercici (12 dies) és capaç de millorar algunes de les tasques cognitives que requereixen del còrtex prefrontal medial [469]. Per tant, d'acord amb els nostres resultats és possible que en part, alguns dels efectes beneficiosos ja descrits

de l'activitat física sobre els processos d'aprenentatge i memòria puguin ser deguts a l'augment de l'expressió cerebral de *klotho*.

4.4. Desenvolupament d'eines de teràpia gènica per modificar els nivells de *klotho* en SNC.

Fins ara, tots els treballs sobre les funcions de *klotho in vivo* s'han realitzat en dos models de ratolins transgènics: o bé el ratolí que sobreexpressa *klotho* [55, 337, 470] o bé el ratolí *knock-out* deficient per a *klotho* [54, 249, 311, 324, 471, 472]. Tot i les potencials aplicacions dels animals transgènics en investigació bàsica, ajudant a entendre els mecanismes de funcionament i control dels gens, també presenten algunes limitacions. Per nosaltres una de les més importants recau en el fet que la proteïna diana se sobreexpressa o s'inhibeix des d'etapes fetals, per la qual cosa, si es tracta d'un gen amb funcions clau, pot afavorir l'aparició de mecanismes compensatoris i per tant, que allò observat no sigui només conseqüència de la presència/absència de la proteïna diana. És important adonar-se que un gen no funciona de manera aïllada, sinó que és part d'una cadena o sistema en cascada, en la que freqüentment un esdeveniment en dispara d'altres subseqüents. Per tant, algunes alteracions genètiques molt definides, poden tenir efectes pleiotròpics, els quals expliquen sovint la dificultat per interpretar aquests models.

En el nostre cas, per aprofundir en l'estudi de *klotho* i la seva implicació en el correcte funcionament dels SNC, vam decidir modificar els nivells d'aquesta proteïna específicament en cervell en animals adults *wild-type* utilitzant vectors adenoassociats de teràpia gènica, que permeten una transducció estable en SNC. Prèviament els vectors adenovirals i adenoassociats de serotip 2 (AAV2) portadors de *klotho* ja havien estat utilitzats com a eines de transferència gènica per modificar els nivells de *klotho in vivo*. Per exemple, *Mitani et al. (2002)* va demostrar que la transferència gènica de *klotho* utilitzant un adenovirus administrat per via intravenosa permetia augmentar l'eliminació de creatinina, disminuir l'excreció de proteïnes en orina i millorar el dany histopatològic induït per angiotensina II [299]. *Wang Y et al. (2009)* després d'administrar per via intravenosa un AAV2 portador de *klotho* en un model espontani de rates hipertenses van reportar una millora en la progressió de la hipertensió i el dany renal [473]. És més, *Wang X (2010)* va utilitzar un sistema híbrid entre vectors adenoassociats i seqüències d'shRNA per inhibir l'expressió de *klotho* en cervell, molt similar al nostre i també els va administrar directament en cervell [474].

Així doncs, els vectors virals AAVrh10 portadors dels cDNAs o els shRNAs de les diferents isoformes de klotho generats en aquest treball esdevenen eines amb un gran potencial per a l'estudi del paper de klotho especialment en SNC, pel serotip escollit amb tropisme neuronal [475, 476]. Els vectors portadors dels cDNAs de les diverses isoformes de klotho (m-KL, s-KL, p-KL i p-KL2) han de permetre, en futurs estudis, arribar a diferenciar entre les seves funcions i avaluar el seu paper, de manera individual, com a factors neuroprotectors. Per diverses limitacions, en aquest treball únicament han estat analitzats els efectes de l'administració dels vectors AAVrh10-mKL i AAVrh10-sKL, però creiem que sobretot l'estudi dels efectes de l'administració del vector AAVrh10-pKL aportarà informació molt interessant en aquest sentit. D'altra banda, només s'han pogut provar aquests vectors en animals *wild-type*, però seria d'especial interès testar la seva capacitat per millorar la simptomatologia en el model d'AD 3xTg així com en d'altres malalties neurodegeneratives. Tenint en compte que klotho és un factor mielinitzant, podria ser una diana terapèutica de gran aplicació en malalties com l'esclerosi múltiple o l'ALS. Finalment, creiem que els vectors portadors dels shRNAs poden esdevenir eines molt útils per generar nous models animals que mimetitzin a edats joves un envelliment cerebral accelerat, fet que hauria de permetre superar algunes de les limitacions que implica treballar amb animals vells.. En aquest sentit però, caldrien més estudis suplementaris a nivell histopatològic i immunohistoquímic del SNC dels animals injectats que permetessin confirmar aquesta hipòtesi.

4.5- Anàlisi del paper neuroprotector de klotho mitjançant transferència gènica en SNC.

4.5.1. Klotho i mecanismes d'aprenentatge i memòria.

En el moment d'iniciar el primer estudi *in vivo* d'aquesta tesi encara no hi havia evidències clares de la implicació de klotho en les funcions cognitives, tot i que *Nagai et al.* (2003) ja havia descrit que el model deficient per a klotho mostrava problemes en alguns test cognitius [317]. És per aquest motiu i perquè ja disposàvem de les primeres dades de qPCR que indicaven una disminució de klotho en algunes regions cerebrals implicades en els processos d'aprenentatge i memòria, com l'hipocamp o el còrtex prefrontal, que es va decidir construir els vectors AAVrh10 portadors dels cDNAs de klotho amb la intenció d'avaluar la seva capacitat per contrarestar alguns dels efectes de l'envelliment cerebral a través d'una bateria de proves conductuals. Malgrat aquesta aproximació fou en un principi força arriscada (per la feina que implicava la construcció dels vectors virals, la injecció dels

animals i la realització dels tests de comportament), un temps després (just finalitzat el primer estudi en animals ancians) alguns treballs publicats sobre el paper de klotho en SNC van fer-nos adonar que estàvem en la bona direcció [281, 337].

Actualment, a més dels resultats aportats per aquest treball, diversos estudis confirmen la implicació de klotho en processos d'aprenentatge i memòria. De fet, tant en humans com en ratolins, els efectes de klotho sobre diversos tests cognitius que avaluen les funcions de xarxes que inclouen, però no estan limitades, a hipocamp i còrtex prefrontal han estat demostrats [477, 478]. Recentment, *Dubal et al. (2014)* va descriure per primer cop que l'augment dels nivells de klotho permet millorar les capacitats d'aprenentatge i memòria en ratolins tant en ratolins joves com d'edats més avançades. És més, va proposar que el mecanisme a través del qual ho fa és augmentat l'expressió hipocampal de la subunitat Glu2NB del receptor de glutamat NMDAR [337], la qual cosa afavoreix la inducció d'LTPs [479]. Tot i així, no és possible descartar la possibilitat de que klotho sigui capaç de regular altres receptors en compartiment subcel·lulars o en condicions patològiques. Així altres mecanismes controlats per klotho podrien també contribuir o millorar les capacitats cognitives, com ara la regulació de les sinapsis d'altres neurotransmissors [324], de canals iònics [480], el metabolisme del calci [440], la senyalització via insulina [56, 277], o FGF23 [481] en neurones o altres tipus cel·lulars. D'altra banda també s'ha comprovat que en humans, els portadors de la variant KL-VS es desenvolupen millor en la resolució de proves cognitives i que aquest fet correlaciona amb nivells més elevats de klotho circulants en plasma [337]. Tot i que altres treballs molt recents també donen suport a aquesta hipòtesi [482], calen més estudis per confirmar aquesta associació entre millors capacitats cognitives i nivells elevats de klotho soluble en plasma. De fet, creiem necessari discernir a quina isoforma de klotho, s-KL o p-KL, se li poden atribuir aquests efectes pro-cognitius. En aquest sentit, com ja s'ha comentat anteriorment, l'anticòs K113 podria resultar molt valuós. Lamentablement, per limitacions de temps, en aquest treball no s'han pogut incloure estudis que adrecin a nivell bioquímic els mecanismes subjacents a la capacitat estimuladora de les funcions cognitives que mostra klotho. Tot i així, els resultats preliminars dels immunoblots ens suggereixen que alguns mecanismes enzimàtics amb propietats antioxidants també podrien estar-hi implicats.

4.5.2. Efectes conductuals de la sobreexpressió de klotho en SNC

En el nostre primer experiment in vivo, es va voler avaluar l'efecte neuroprotector de klotho en ratolins *wild-type* adults d'edat avançada, tenint en compte els resultats obtinguts en l'*Estudi I* i que klotho fou descrit inicialment com un gen anti-envelliment. Pel fet de treballar amb animals vells,

vam poder comprovar que 6 mesos després de la injecció dels vectors virals, en el moment d'avaluació dels seus efectes, el nombre d'animals per grup experimental es veia reduït de manera important degut a l'augment de la taxa de mortalitat en la franja compresa entre els 15-18 mesos d'edat. Aquests efectes els atribuïm tan sols a l'edat dels animals, 18-19 mesos i el fet de que estéssin estabulats en gàbies de 4 animals (per evitar l'efecte de l'aïllament sobre les proves de conducta) la qual cosa afavoria les agressions entre ells i en cap cas, a l'efecte dels vectors administrats. Per aquest motiu si s'hagués de treballar de nou amb animals d'edat avançada es dissenyarien grups experimentals de 15 animals com a mínim, per evitar que la "n" de cada grup quedés reduïda significativament i d'aquesta manera poder obtenir resultats fiables i consistents en els tests de comportament.

D'altra banda, i *a priori*, pel fet de treballar amb animals vells cal tenir en compte algunes consideracions importants:

1) La heterogeneïtat és la principal característica conductual dels animals vells, mentre que entre els animals joves s'observen patrons de conducta molt més homogenis. Aquesta variabilitat, típica també de l'ésser humà, és deguda a que el procés d'envelliment afecta de manera més severa a alguns individus que a d'altres [483].

2) L'envelliment és un procés que afecta tot l'organisme, i per tant, pot afectar moltes variables a més de les de tipus cognitiu. És per aquest motiu que en la interpretació dels resultats s'han de considerar amb detall les característiques de la tasca conductual i la possibilitat de que variables no cognitives estiguin afectant la seva execució. Així, per exemple, els animals vells poden tenir menor sensibilitat als xocs elèctrics degut al seu major volum corporal i al fet de tenir la pell més resistent, el que, juntament amb d'altres factors, pot afectar sobre la motivació de l'animal. De la mateixa manera, cal tenir en compte si la tasca en qüestió requereix coordinació muscular, força, velocitat, conducta exploratoria o fins i tot, capacitat d'habitució davant de nous estímuls, variables totes elles afectades per l'envelliment [484, 485].

3) Finalment, cal considerar que els dèficits mostrats en proves d'aprenentatge i memòria poden ser deguts a l'afectació d'altres processos cognitius, com ara l'atenció o la percepció. Dèficits en aquestes etapes inicials de processament de la informació poden tenir conseqüències en altres funcions cognitives més endavant en el procés. Altres funcions cognitives de nivell superior, tals com la presa de decisions poden també veure's afectats per l'edat [486].

D'altra banda, en el segon experiment, basant-nos en els resultats de *Dubal et al. (2014)* on s'observa un efecte estimulador de klotho sobre les capacitats cognitives independentment de l'edat [337] vam decidir treballar amb animals més joves. D'aquesta manera, se superen les limitacions comentades anteriorment i a més, aquests animals són més fàcils d'aconseguir en grups nombrosos per a experiments de comportament.

En termes generals, podem concloure que malgrat algunes diferències en el disseny dels dos experiments, com ara l'edat dels animals o la via d'administració (intraventricular vs. intrahipocampal), els resultats obtinguts en les proves de comportament són consistents i demostren efectes significatius de l'administració de klotho en SNC en algunes de les variables mesurades, principalment aquelles relacionades amb l'ansietat i la flexibilitat cognitiva.

Abans de avaluar les funcions cognitives, es van examinar les condicions físiques dels animals injectats. En primer lloc, no vam trobar diferències significatives en el pes corporal dels animals malgrat diversos treballs recents han suggerit una estreta relació entre els nivells de klotho i el pes corporal, ja que s'han trobat alterats en individus que pateixen obesitat o anorèxia nerviosa [256, 487]. De fet però, *Abramovitz (2011)* tampoc detecta canvis en el pes corporal ni en paràmetres de salut general quan injecta diàriament per via intraperitoneal proteïna recombinant de klotho [488]. Tot i que klotho és una proteïna multifuncional relacionada amb la disminució de la homeòstasi dels teixits associada a l'edat [406], tampoc vam observar diferències en l'estat físic dels animals entre els grups que sobreexpressaven m-KL i s-KL i el grup control a cap de les edats estudiades (12 vs. 18 mesos). En aquest sentit, tenint en compte els resultats de *Phelphs et al. (2013)* que observa com la deficiència de klotho provoca una pèrdua de força muscular, potser haguéssim esperat un augment en la capacitat muscular en els animals que sobreexpressen klotho [406]. Algunes possibles explicacions del perquè l'administració dels vectors no va provocar canvis significatius en les capacitats sensorials dels animals podrien ser: (i) l'administració local en SNC enlloc d'una administració sistèmica (ii) 6 mesos sobreexpressant klotho des dels vectors AAV injectats no sigui un temps suficient per poder observar aquests efectes descrits en relació a la força i/o (iii) la dosi de virus injectada no sigui suficient per augmentar les concentracions de klotho en plasma als nivells necessaris per tenir efectes a nivell muscular. Tot i així, sí que es van poder observar diferències en els resultats de les proves sensorials entre els dos grups d'animals, joves i ancians, essent aquests últims menys eficients en la seva realització, tal i com s'esperava. En resum doncs, dins d'un mateix experiment tots els animals es troben en igualtat de condicions físiques i per tant, no

existeixen diferències entre grups que puguin estar influïent en els resultats de la resta de proves conductuals.

Per tal d'estudiar si *klotho* és capaç d'afectar també alguns dels símptomes psicològics i conductuals associats a la demència (BSPD) es va utilitzar la prova de l'*Open Field*. En l'*Open Field* es mesura l'activitat motora/exploratòria dels animals influïda per components emocionals davant una situació nova i fortament aversiva. Encara que els rosegadors presenten una tendència natural a explorar espais nous, són animals nocturns i tendeixen a evitar els espais oberts i il·luminats. En aquesta prova, els nivells d'activitat general són avalats per mesures com l'activitat horitzontal, l'activitat vertical i la distància total recorreguda en el transcurs del test [489]. Un cop analitzats els resultats, aquestes dades permeten detectar si l'activitat motora presentada pels animals es correspon amb la normalitat o si bé es troben comportaments d'hipo- o hiper- activitat. En aquest sentit, es va poder comprovar que, independentment de l'edat, els animals que reben els cDNAs (*s-KL* i *m-KL*) de *klotho*, mostren una activitat locomotora horitzontal superior a la dels animals control. Nombrosos estudis indiquen que durant l'envelliment es produeixen alteracions significatives en l'activitat motora i exploratòria en rosegadors, tant en rates [490] com en ratolins [491]. De fet, sembla clar que a finals de l'etapa de maduresa (12 mesos), s'inicia una disminució gradual de l'activitat locomotora que augmenta amb l'edat [492]. Per tant, els nostres resultats mostren que l'administració de *klotho* en SNC permet revertir aquest fenotip propi d'animals ancians, fent que els animals esdevinguin més actius. D'altra banda, el fet de que en aquesta prova l'animal s'enfronti a una àrea oberta, permet també detectar d'altres comportaments relacionats amb l'ansietat. En general, els animals quan es troben davant àmplis espais oberts, se senten ansiosos i tenen por, mostrant un comportament esterotipat anomenat "tigmotaxi". La tigmotaxi o "*wall-hungting behaviour*" descriu la tendència a situar-se prop de les parets de la cambra en resposta a l'estimulació obtinguda per un cos sòlid, evitant així la zona central més desprotegida. Així doncs, vam poder comprovar que malgrat els animals que rebien *klotho* es mostraven hiperactius, aquest fet no estava relacionat amb conductes ansiogèniques. Per contra, els animals als quals se'ls havia administrat *klotho* recorrien una major distància en la zona central desprotegida del camp obert, mentre que els animals control mostraven una major conducta de tigmotaxi. A més, si ens fixem en les latències de moviment, considerades un indicador de la inhibició conductual com a conseqüència de la neofòbia o ansietat que experimenten els animals, podem comprovar la tendència tendència a ser més curta en els grups que reben *klotho*, indicant una major desinhibició conductual. Una dada important a remarcar en aquest punt és que, mentre que en animals de 18 mesos aquest efecte ansiolític només es va poder observar en el grup *m-KL*, en el segon experiment amb animals més joves, tant *m-KL* com *s-KL* van mostrar aquest efecte.

Tenint en compte que els desordres d'ansietat tenen major prevalència a mesura que augmenta l'edat [493, 494] les dades suggereixen que la isoforma m-KL presentaria major capacitat ansiolítica que la de s-KL, doncs aquesta última no és capaç de tenir efectes en animals ancians on els nivells d'ansietat endògens són més elevats. Aquests resultats estarien d'acord amb els publicats recentment per Prather (2015) que revelen que en dones joves sanes però amb nivells elevats d'estrès, les concentracions de klotho circulants en sèrum es veuen disminuïdes [273].

A continuació, per avaluar l'efecte de la sobreexpressió de klotho sobre la memòria de treball dels animals es va utilitzar el *T-maze*. Aquesta prova inclou l'assaig d'elecció forçada (en que un dels braços de la T es troba tancat) i el de memòria o evocació. La demanda de memòria crítica per resoldre aquesta tasca consisteix en recordar després d'una demora variable quina localització s'ha visitat a l'assaig anterior i visitar la contrària a l'assaig en curs. Els resultats obtinguts mostren que de nou, independentment de l'edat, l'administració de qualsevol de les dues isoformes de klotho, m-KL o s-KL, millora les capacitats cognitives dels animals fent que els animals cometin menys errors que el grup control en la resolució de la tasca. Tenint en compte que els dèficits en memòria de treball apareixen en etapes tardanes de la vida, al voltant dels 24 mesos d'edat [495], klotho estaria actuant com un potenciador de les funcions cognitives. En la mateixa línia, Dubal (2014) va descriure que l'augment dels nivells de klotho permetia millorar la memòria de treball en ratolins joves en la prova de *Y-maze* [337]. No obstant, l'elecció d'entrar en un o altre braç no depèn únicament de la capacitat per recordar el braç en que s'havia estat prèviament, sinó que també pot estar influenciada per altres factors com ara la motivació de l'animal per explorar o la por front la novetat. Cal tenir en compte que aquestes conductes es veuen alterades en els ratolins que sobreexpressen klotho i que per tant, podrien estar interferint en l'execució de la prova [496].

Per últim, es va realitzar el test de *Morris Water Maze* per avaluar els efectes de la sobreexpressió de klotho sobre les capacitats d'aprenentatge i memòria espacial. En ella, els animals són introduïts en una piscina circular i han de ser capaços d'aprendre a localitzar una plataforma submergida prenent com a referència les senyals o pistes contextuais de la sala. Els resultats obtinguts en ambdós experiments mostren que els animals tractats amb klotho són més eficients resolent la tasca i presenten un aprenentatge més ràpid que els animals control. En general, el grup s-KL mostra un comportament entremig entre el grup m-KL i el grup control. Malgrat aquest efecte s'observa a les dues edats estudiades, en animals vells s'observa que m-KL i s-KL milloren significativament la memòria a llarg termini. Així, mentre que els animals de 18 mesos del grup control tenen problemes en recordar en el primer assaig de cada dia (*PTX.1*) la localització de la plataforma, els grups s-KL i m-

KL mostren una millora significativa respecte el dia anterior. En les proves finals de memòria també s'observa aquest efecte, en aquest cas en ambdues edats, ja que 24 hores després de l'últim entrenament els animals que sobreexpressen klotho prioritzen més en la busqueda de la plataforma en el quadrant on es localitzava la plataforma. Així doncs, els efectes observats en memòria a llarg termini podrien estar relacionats amb els prèviament descrits per *Dubal (2014)* en els quals s'observa que durant la recuperació de memòria en la prova de MWM en l'hipocamp del ratolí transgènic de klotho hi ha un augment en la quantitat de receptors NMDA formats per la subunitat Glu2NB, que teneixen a desactivar-se més lentament que els receptors NMDA-Glu2NA [337]. De fet, la sobreexpressió transgènica de GluN2B [497, 498] en rates o ratolins permet millorar tant les funcions sinàptiques com les funcions cognitives, possiblement a través del retard en la desactivació dels NMDARs [499]. D'altra banda, en aquest test, també vam observar que els animals ancians que sobreexpressen klotho, sobretot el grup s-KL, mostraven una major velocitat natatòria que el grup control. Aquest fet podria relacionar-se amb la hiperactivitat ja observada anteriorment i és per aquest motiu que s'analitza la variable de distància enlloc de la de latència com a referència de la taxa d'aprenentatge dels animals. Per contra, en animals joves no es van observar diferències en les velocitats però sí que es va detectar que a aquesta edat, alguns animals tendeixen a flotar passivament i per tant, també es considera més fiable analitzar la variable de distància.

En resum, el nostre estudi ha permès corroborar el gran potencial de klotho com a agent estimulador de les capacitats cognitives, tant en animals joves com en animals d'edat avançada. A diferència de la resta de treballs publicats on s'utilitza el model transgènic que sobreexpressa klotho, en el nostre estudi els nivells de klotho no són elevats des del naixement de l'animal sinó que s'augmenten a l'edat escollida a través de l'administració de vectors adenoassociats de serotip 10, amb un elevat tropisme neuronal. Per tant, els resultats suggereixen que klotho no només té un caràcter protector front el deteriorament cognitiu associat a l'edat sinó que també és capaç de revertir alguns d'aquests efectes quan s'administra en SNC en animals vells. És més, hem pogut demostrar per primer vegada, que de manera similar a la isoforma transmembrana, també la isoforma secretada de klotho és capaç de millorar les funcions d'aprenentatge i memòria en animals, independentment de l'edat. En aquest sentit, si en d'altres treballs s'aconsegueix demostrar que s-KL esdevé tant efectiu com m-KL com a factor neuroprotector, tal i com va demostrar *Abramovitz (2011)* en el tractament del càncer de pàncrees [488], seria una opció terapèutica molt atractiva perquè podria presentar un millor perfil de bioseguretat ja que al contrari que la isoforma m-KL, s-KL no és capaç d'actuar com a coreceptor per FGF23 [58, 488, 500].

4.5.3. Efectes conductuals de la inhibició de klotho en SNC.

Per tal de poder estudiar millor la funció de les 2 isoformes de klotho, en el segon estudi *in vivo* també vam decidir incorporar dos grups experimentals als quals se'ls va administrar els mateixos vectors adenoassociats serotip 10 però portadors de dues seqüències d'shRNA contra klotho prèviament testades *in vitro*: (i) una contra el domini KL2 i que permet silenciar la isoforma m-KL i evitar la producció de p-KL que anomenarem sh-mKL; i (ii) una contra la cua d'aminoàcids específica de la isoforma s-KL, que anomenarem sh-sKL. D'aquesta manera s'esperaria que un dels grups experimentals, l'injectat amb sh-mKL expressi de manera majoritària la isoforma s-KL i en l'altre, sh-sKL, que els animals expressin normalment m-KL i p-KL però nivells molt baixos de s-KL.

De manera similar a l'anàlisi dels efectes de la sobreexpressió de klotho sobre les capacitats cognitives dels animals, per valorar l'efecte del silenciament específic de cadascuna de les isoformes de klotho en hipocamp, es va utilitzar la mateixa bateria de testos conductuals. Primerament, en l'examen físic dels animals, 6 mesos després de la injecció, no vam detectar diferències significatives ni en el pes corporal ni en les funcions sensimotors entre el grup control i els grups tractats amb shRNAs. Seguidament, en l'avaluació dels símptomes BPSD en la prova d'*Open Field* vam poder comprovar que l'administració dels shRNAs tenia l'efecte oposat a l'administració dels cDNAs. A diferència del lleuger efecte ansiolític que associàvem a la sobreexpressió de klotho, el seu silenciament va mostrar efectes ansiogènics en aquesta prova. Ambdós grups, sh-mKL i sh-sKL, mostren una elevada conducta de tigmotaxis, situant-se propers a les parets de l'arena i evitant la zona central desprotegida comparat amb el grup control. A més, aquests animals mostren una inhibició conductual a l'inici de la prova, mostrant fenòmens de petrificació o *freezing*, la qual cosa queda reflexada en unes latències de sortida del centre del camp molt superiors a les dels animals injectats amb els cDNAs. D'altra banda, comparat amb els animals que sobreexpressen klotho, aquests animals són hipoactius. Aquesta hipocativitat associada a uns nivells baixos de klotho ja va ser descrita per Kuro-o (1997), quan va observar que el ratolí *kl-/-*, a les 6 setmanes d'edat, presentava una taxa d'activitat espontània molt reduïda en el test d'*Open Field* comparada amb la dels controls [51]. A continuació, en la prova de memòria de treball *T-maze*, es va observar que en l'assaig d'elecció forçada, tots els animals del grup control i els que sobreexpressaven klotho (m-KL i s-KL) van ser capaços de complir el criteri per contra, entre un 10-18% dels animals dels grups portadors d'shRNAs no van poder fer-ho, i per tant, van quedar fora de l'assaig de lliure elecció. A més, en aquest primer assaig, els grups injectats amb els cDNAs van necessitar menys temps per arribar al punt d'intersecció del laberint que els grups injectats amb shRNAs, variable relacionada

amb l'ansietat ja que permet detectar conductes de petrificació a l'inici del test. També es va poder comprovar que el silenciament de m-KL o s-KL, fa que els animals empitjorin en la resolució de la tasca, incrementant el percentatge d'errors comesos fins al 40% en ambdós casos. Finalment, en el test del laberint aquàtic de Morris per avaluar la memòria espacial també es va poder observar que els animals injectats amb shRNAs mostraven alguns problemes en l'aprenentatge de la tasca la qual cosa esdevenia significatiu en el dia *PT2*. En aquest dia, mentre que els animals injectats amb cDNAs mostren ja un cert grau d'aprenentatge (menor distància recorreguda per assolir la plataforma), els grups on s'ha silenciado *klotho* requereixen nedar molta més distància. Però on clarament s'observen els efectes negatius del silenciament de *klotho* en SNC és en les dos proves de memòria fetes 2h i 24h després de l'últim entrenament. En cap cas, els animals injectats amb shRNAs són capaços de prioritzar en la seva búsqueda el quadrant on estava situada la plataforma, suggerint problemes de memòria i/o aprenentatge.

Així doncs, els resultats obtinguts indicarien que ambdues isoformes de *klotho* esdevindrien importants per una correcta funció cognitiva en l'etapa adulta, i que la pèrdua o disminució de la seva expressió en hipocamp estaria relacionada amb un baix rendiment cognitiu. Pel que sabem, aquestes són les primeres dades obtingudes en animals on s'ha silenciado *klotho*, en relació a les capacitats d'aprenentatge i memòria.

V. CONCLUSIONS

S'ha realitzat un estudi extensiu sobre l'expressió de s-KL i m-KL en SNC amb resultats que permeten obrir noves àrees d'investigació en el camp de klotho:

1. Per primera vegada, s'ha detectat la proteïna secretada de klotho produïda per splicing alternatiu (s-KL) utilitzant un nou anticòs dissenyat i generat en aquest treball (K113).
2. Tot i que a nivell d'mRNA s-KL s'expressa de manera similar en cervell i ronyó, a nivell de proteïna s-KL és 9-10 vegades més abundant en cervell que en ronyó, suggerint que el seu paper principal podria ser dut a terme en Sistema Nerviós Central.
3. s-KL presenta un perfil d'expressió espacio-temporal diferent per cadascuna de les regions cerebrals analitzades (còrtex prefrontal, còrtex cerebral, hipocamp i cerebel). A més, aquest no és igual al perfil de m-KL, suggerint que ambdues isoformes poden tenir funcions diferents en cervell.
4. Durant l'envelliment cerebral fisiològic els nivells d'expressió de les dos isoformes de klotho (m-KL i s-KL) disminueixen significativament. Aquesta disminució es veu accelerada en condicions d'envelliment patològic com la malaltia d'Alzheimer. Pel contrari, l'exposició a un hàbit de vida saludable com d'exercici físic moderat continuat durant l'etapa adulta alenteix significativament els nivells d'expressió de klotho en cervell.
5. En el model animal 3xTg-AD de Alzheimer, els nivells de Klotho estan clarament disminuïts als 6 mesos d'edat, es a dir, abans que la formació de placa beta-amiloide sigui evident, suggerint que Klotho podria ser utilitzat com a biomarcador de diagnòstic precoç de la malaltia de Alzheimer.
6. Independentment de l'edat, la sobreexpressió de m-KL i s-KL mitjançant estratègies de teràpia gènica permet millorar les capacitats cognitives dels animals en relació a la memòria de treball (*T-maze*) i als processos d'aprenentatge i memòria espacial (*Morris Water Maze*). Aquests resultats suggereixen que Klotho (possiblement les formes solubles) podria ser una diana amb potencial terapèutic pel tractament de dèficits cognitius associats a envelliment.
7. La modificació dels nivells de les dues isoformes de klotho (m-KL i s-KL) també té efectes sobre els símptomes neuropsiquiàtrics associats a la demència (BPSD). Així, la seva

sobreexpressió augmenta l'activitat exploratòria en ratolins adults, mentre que el seu silenciament fa que els animals esdevinguin menys actius. A més, la sobreexpressió de klotho (sobretot m-KL) també presenta un cert efecte ansiolític, i la seva inhibició, l'efecte contrari.

- 8.** Els estudis bioquímics preliminars indiquen que la inhibició de klotho incrementa l'expressió de SOD2, un enzim antioxidant, probablement com una resposta de compensació. A més, en els models animals generats, els canvis funcionals semblen aparèixer abans que els canvis morfològics, ja que als 12 mesos d'edat es poden detectar canvis en la resposta a l'estrès oxidatiu però no en els nivells de GFAP (*pool* d'astròcits activats).

VI. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Animals

Tots els experiments amb animals i necròpsies han estat realitzades en l'Estabulari Central de la Universitat Autònoma de Barcelona i d'acord amb la normativa espanyola vigent. El protocol utilitzat va ser aprovat pel Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona (CEE-UAB nº permís 2196). Els animals es van estabular en gàbies *Macrolon* en condicions d'alimentació *ad libitum* d'aigua i menjar, una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ i cicles de llum-fosc de 12 hores.

Per als estudis d'expressió s'han utilitzat: **(i)** ratolins C57Bl6 (Harlan Laboratories BV) *mascles wild-type* als 6,9,12 i 18 mesos d'edat; **(ii)** ratolins 3xTgAD i animals WT mascles amb un fons genètic 129/C57Bl6 als 6,9 i 12 mesos d'edat, de la colònia creada el juliol de 2004 en la Unitat de Psicologia Mèdica de l'Institut de Neurociències de la UAB, a partir de progenitors rebuts del laboratori del Dr. LaFerla, del Departament de Neurobiologia i Conducta de la Universitat de Califòrnia, Irvine (EEUU) i **(iii)** ratolins WT mascles amb un fons genètic 129/C57Bl6 als 6, 12 mesos d'edat els quals van ser exposats diàriament durant 3 mesos a un exercici voluntari gràcies a tenir disponible una "*running wheel*" (Activity Wheel Cage System for mica, Techniplast, Vuguggiate, Italy) en les gàbies. Aquest sistema va permetre enregistrar de manera continua el nombre de voltes de la roda i per tant, el càlcul de l'activitat mitjana per ratolí en cada gàbia. Les inspeccions visuals periòdiques van suggerir que tots els animals feien servir la "*running wheel*", però no va ser possible quantificar el temps que es va exercitar cada ratolí. Els ratolins controls sedentaris van ser estabulats en les mateixes gàbies però sense "*running wheel*". Aquestes mostres van ser amablement cedides per la nostra col·laboradora la Dra. Lydia-Giménez Llorc (Unitat de Psicologia, Facultat de Medicina, UAB) que es va encarregar del disseny experimental i la supervisió dels animals durant la pràctica d'exercici físic.

Per als estudis *in vivo* amb vectors adenoassociats es van utilitzar ratolins C57Bl6 (Harlan Laboratories BV) mascles wild-type als 6 i 12 mesos d'edat.

1.2. Anticòs K113

L'anticòs policlonal de conill que reconeix específicament s-KL generat per splicing alternatiu va ser produït per l'empresa EZBiolab (Carmel, USA) utilitzant el pèptid immunogènic dissenyat en aquest treball com a antigen.

1.3. Vectors plasmídics

Els vectors dels quals s'ha partit en aquest treball són, *pSMD2EGFP*, *p6600*, *pKSRSVGFP*, *pUC57Tlacz* (generats al nostre laboratori), *pAAVmiRNA* (GenArt), *psL1180* (Amersham), *pGG2*, *pXX6* (cedits per Genethon) i *pRep2CapRh10* (cedit pel Dr. J.M. Wilson, University of Pennsylvania).

1.4. Línies cel·lulars

Per a testar l'expressió del transgèn procedent dels constructes plasmídics i dels vectors virals s'utilitza la línia cel·lular HEK-293. En particular, un clon d'aquesta línia que rep el nom de 293-QB (Q-Biogen). Per a la producció dels vectors adenoassociats s'utilitza un altre clon de 293, anomenat 293-AAV (Stratagene).

2. MÈTODES

2.1. Obtenció i anàlisi del DNA

2.1.1. Minipreparació de DNA plasmídic

Per a l'obtenció de DNA plasmídic, es realitzen minipreparacions de DNA mitjançant lisi alcalina d'un precultiu de bacteris i la seva posterior amb isopropanol. Es parteix de cultius de 3mL del corresponent medi selectiu que ha estat inoculat a partir de colònies aïllades crescudes prèviament en plaques LB-agar selectives. Mitjançant aquesta tècnica s'obté DNA plasmídic en baixes quantitats (5-15ug) i de poca puresa però suficient per poder realitzar digestions amb enzims de restricció o amplificar per PCR.

Reactius: Medi LB líquid (Miller's LB Broth, Conda) suplementat amb ampicil·lina (USB) a 100ug/mL. Isopropanol i etanol absolut (Panreac). *Solució de resuspensió* (4 °C): 50mM Tris-HCl (Sigma) pH 8.0, 10mM EDTA (USB), 100ug/mL RNAsa (Sigma). *Solució de lisi:* 200mM NaOH (Panreac), 1% SDS (w/v)(USB); *Solució de precipitació proteica* (4 °C): 3M acetat potàssic pH 5.5 (Panreac).

Procediment: Es peleteja el cultiu bacterià per centrifugació durant un minut a 12.000g, es descarta el sobrenedant i es ressuspenen les cèl·lules en 200 µL de solució de resuspensió. S'afegeixen 400 µL del tampó alcalí de lisi, s'inverteix diverses vegades i s'incuba 5 minuts a temperatura ambient. Es neutralitza mitjançant l'addició de 400 µL de la solució d'acetat potàssic per precipitar les proteïnes.

2.1.2. Maxipreparació de DNA plasmídic

Per a l'obtenció de DNA plasmídic en quantitats elevades (250-1000ug) s'ha utilitzat el kit comercial E.Z.N.A.TM Fastifilter (Omega Bio-Tek). La preparació obtinguda té una puresa adequada per a la transfecció de cèl·lules en cultiu.

Procediment: Es parteix de 200ml de cultiu, després de la lisi alcalina dels bacteris i posterior precipitació amb acetat potàssic, el DNA es purifica per cromatografia d'intercanvi iònic en columna i es precipita amb isopropanol, seguint el protocol facilitat pel fabricant.

2.1.3. Extracció de DNA de baix pes molecular de mostres de teixit (*Hirt protocol*)

Aquest mètode (Hirt, 1967) enriqueix l'obtenció de DNA de baix pes molecular, front el DNA genòmic.

Reactius: *buffer de digestió HIRT*: 20mM Tris-Cl pH 8.0 (Sigma), 10mM EDTA pH 8.8 (USB), 0,6% SDS (USB), 0,2mg/mL proteïnasa K (Promega), NaCl 5M (Panreac), etanol 100% (Panreac), Phenol/CHCl₃/isoamyl alcohol (25:24:1) (Amresco).

Procediment: Es dispensen uns 10 µL de buffer de digestió Hirt suplementat amb proteïnasa K per mg de teixit en mostres congelades i s'incuben O/N a 50 °C en agitació (120 rpm). A l'endemà es vortexen les mostres per aconseguir una disgregació completa del teixit. S'ajusta la concentració de NaCl a 1M i es manté en gel durant més de 3 hores o O/N a 4°C. Seguidament es centrifuguen les mostres a 4°C a 14.000g durant 30 minuts, i amb cura s'obté el sobrenedant i es traspasa a un nou tub. Es dilueix el sobrenedant 2 vegades amb H₂O per reduir la concentració de sals i s'afegeix un volum de Phenol/CHCl₃/isoamyl alcohol. Després de centrifugar les mostres durant 10 min a 300g a temperatura ambient, s'obté la fase superior aquosa a la qual se l'hi afegeixen 2 volums d'etanol 100% i es centrifuguen a màxima velocitat durant 10 minuts perquè precipiti el DNA. Per últim, es descarta el sobrenedant, es deixa assecar el pellet durant 5 minuts a temperatura ambient i es resuspen el DNA en 30-50 µL d'H₂O. (Nota: Les mostres obtingudes també contenen RNA, si es vol eliminar afegir a l'aigua de resuspensió 100ug/mL d'RNAsa A).

2.1.4. Quantificació del DNA

Per quantificar el DNA obtingut mitjançant els diferents procediments (minipreparacions, maxipreparacions) es realitza una lectura de la preparació de DNA utilitzant l'aparell NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc) a una longitud d'ona de 260nm (OD 260/280). El software ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc) ens permet determinar la concentració de DNA en µg/ µL i la puresa d'aquest.

2.1.5. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

Aquesta tècnica permet separar fragments de DNA de diferent mida. Les mostres de DNA amb càrrega negativa neta se sotmeten a un camp elèctric i migren a través d'una matriu (gel) cap a

l'ànode, en funció de la mida del DNA. El percentatge d'agarosa utilitzat (Seaken LE Agarose, Iberlabo) varia entre l'1% i el 2% segons els fragments a analitzar.

Reactius: *Tampó d'electroforesi* TAE 1x (40mM Tris-Aetat pH 8.0), *tampó de càrrega* (50% glicerol (v/v) (Sigma-Aldrich), 100mM EDTA pH 8.0 (USB), 1% SDS (p/v) (Iberlabo), 0,1% blau de bromofenol p/v, 0,1% xilencianol (p/v).

Procediment: Les mostres a analitzar es carreguen al gel juntament amb el tampó de càrrega, que conté blau de bromofenol i xilencianol (que migren cap a l'ànode com a fragments de 500bp i 4kb respectivament per monitoritzar correctament l'electroforesi). S'estima la mida dels fragments de DNA amb un marcador de pesos moleculars d'1kb o 100bp, Gene Ruler 1Kb o 100bp DNA Leader (Fermentas). A l'hora de fer el gel s'afegeix el volum necessari de RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20.000x) (iNtRON Biotechnology), una solució de tinció no-carcinogènica alternativa al bromur d'etidi. Els fragments de DNA es visualitzen en un transil·luminador d'UV (GeneGenius BioImaging System, Syngene) i les imatges son capturades per el programa Genesnap (Syngene).

2.1.2. Purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa

La purificació dels fragments de DNA en gels d'agarosa es realitza utilitzant el kit GeneClean TurboKit^R (Q-BioGene), seguint el protocol facilitat per fabricant. El mètode es basa en la capacitat de DNA d'unir-se a una matriu de silica.

2.2. Construcció dels vectors plasmídics

2.2.1. Enzims de restricció

Les endonucleases de restricció son enzims purificats a partir de diferents soques bacterianes o fongs, les quals actuen reconeixent específicament seqüències curtes de nucleòtids i trencant enllaços fosfodièsters de l'hèlix de DNA en un lloc concret. S'han utilitzat entre 2-10 U de digestió per 1 µg de DNA plasmídic seguint les condicions de temperatura i solució establertes pel fabricant. El temps de digestió varia entre 2-18 hores en funció de les unitats enzimàtiques administrades i la quantitat de DNA a digerir. Els enzims de restricció utilitzats en aquests treball són de Fementas o New England Biolabs.

2.2.2. Clonatge per lligació de fragments de plasmidis

La tecnologia del DNA recombinant es basa en unir dos fragments de DNA per generar una única molècula d'àcid nucleic capaç de replicar-se de forma autònoma dins d'un bacteri. Quan es digereix amb un únic enzim de restricció o amb dos enzims que generen extrems roms o compatibles, és necessari realitzar una desfosforilació dels extrems per evitar la relligació del vector. En aquest treball s'ha utilitzat l'enzim FastAP™ (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) de Fermentas.

Procediment: S'afegeix 1 µL de FastAP™ al vector obert amb el(s) corresponent(s) enzim(s) de restricció durant 1h a 37°C, per tal de desfosforilar els extrems, i seguidament s'inactiva a 75°C durant 5 minuts. A continuació es du a terme la reacció de lligació catalitzada per l'enzim T4DNA lligasa (New England Biolabs) que permet unir fragments de DNA amb extrems roms o compatibles. La DNA lligasa catalitza de forma ATP-depenent la formació de ponts fosfodièster entre un grup 5' fosfat i un grup 3' hidroxil de DNA de doble cadena. Les reaccions de lligació es realitzen a 16°C O/N. Els productes de les lligacions es transformen en bacteris *E.coli* quimiocompetents (apartat 2.3.4) . A partir dels bacteris del pre-cultiu s'extreu el DNA plasmídic i es confirma la correcte orientació de l'insert al vector mitjançant l'ús d'enzims de restricció.

2.2.3 Clonació d'oligonucleòtids hibridats formant *dsDNA*

Mitjançant aquesta tècnica s'han construït els vectors plasmídics portadors dels shRNAs, *pSMD2-shKL1-GFP* i *pSMD2-shKLS-GFP*.

Reactius: *pSMD2GFP* (generat en el nostre laboratori), oligonucleòtids fosforilats en 5' (Invitrogen).

Procediment: Aquests oligonucleòtids codificants per la seqüència *sense* i *antisense* dels shRNAs corresponents es van dissenyar amb dianes per a enzims de restricció flanquejants i amb l'extrem 5' fosforilat, pel seu posterior clonatge en *pSMD2-GFP* digerit per *BamHI* i *AgeI*. Per obtenir fragments de DNA de doble cadena s'hibrida cada parell d'oligonucleòtids complementaris fent una dilució per obtenir una concentració final de cadascun de 100 nmol/ml. Es provoca una desnaturalització inicial, en un bloc tèrmic a 95°C durant 2 minuts, i es deixa refredar a raó de 5°C per min fins a temperatura ambient, perquè les cadenes hibridin. A continuació, es fan dues dilucions per cada parell d'oligonucleòtids hibridats (1/1000 i 1/200) i s'utilitzen 2 µL de dilució per lligar amb 50ng de vector digerit i purificat utilitzant 8U de T4 DNA lligasa.

2.2.4. Preparació de bacteris quimiocompetents

Per poder transformar DNA plasmídic en bacteris, aquestes han d'adquirir la capacitat de poder incorporar DNA. Les cèl·lules quimiocompetents utilitzades son *E.coli* TOP10.

Reactius: *E.coli* TOP10 (Invitrogen); *solució TFB1:* 100mM clorur de rubidi (Fluka), 50mM clorur de magnesi (Sigma), 30mM acetat potàssic (Panreac), 10mM clorur càlcic (Sigma), 15% glicerol (Panreac), pH 5.8 (HCl); *solució TFB2:* 10mM MOPS (Fluka), 10mM clorur de rubidi (Fluka), 75mM clorur càlcic (Sigma), 15% glicerol (Panreac), pH 6.8 (HCl). Ambdues solucions s'esterilitzen utilitzant filtres 0,22 µm (Millex, Millipore).

Procediment: S'inoculen 200mL d'LB a partir de 5µL de cèl·lules *E.coli* TOP10 quimiocompetents. El cultiu s'incuba a 37°C en agitació fins que arriba a fase exponencial decreixement a una densitat òptica (DO₆₀₀) de 0,5. Es transfereix el cultiu a Falcons de 50mL i es centrifuga 5min a 4.000g a 4°C. Es descarta el sobrenedant i es ressuspèn el pellet en 30mL de TFB1 per cada 100mL de cultiu i s'incuba en gel durant 90 minuts. Posteriorment, es centrifuguen 5 minuts a 4.000g a 4°C, es descarta de nou el sobrenedant i es ressuspèn el pellet en 4mL de TFB2 per cada 100ml de cultiu original. Finalment, es fan alíquotes de 100µL en eppendorfs freds, mantenint-los en neu carbònica i s'emmagatzemen a -80°C.

2.2.5. Transformació en bacteris quimiocompetents

La transformació és el procediment mitjançant el qual s'introdueix el DNA plasmídic dins la cèl·lula bacteriana i es realitza per xoc tèrmic.

Reactius: plaques (Nunc) d'LB-agar (Miller's LB Broth (Conda), agar (Panreac)) amb ampicil·lina a 100 µg/mL (USB), medi LB líquid amb i sense ampicil·lina.

Procediment: Es descongelen els vials de cèl·lules quimiocompetents en gel durant 10 minuts i s'afegeix 5µL de la reacció de lligació. Es deixen 30 minuts en gel i posteriorment es realitza el xoc tèrmic, mantenint els vials durant 45 segons a 42°C i després posant-los en gel durant 2 minuts. S'afegeix a cada vial 200µL d'LB sense antibiòtic i s'incuben 1h a 37°C en agitació, permetent així la recuperació dels bacteris i la síntesi de les proteïnes del plasmidi, entre elles la que conferirà resistència al antibiòtic (generalment, ampicil·lina). Es sembren les cèl·lules en plaques amb ampicil·lina i s'incuben O/N a 37°C.

2.2.6. Selecció de clons positius amb el sistema *blue-white*

El sistema d'*screening blue-white* és una tècnica que permet una convenient i ràpida detecció dels bacteris recombinants en experiments de clonatge molecular per generar vectors. El DNA d'interès és lligat al vector. Aleshores, el vector resultant es transforma en cèl·lules *E. coli* quimiocompetents que es fan créixer en presència d'X-gal. Les cèl·lules que han incorporat el vector modificat amb el DNA recombinant produiran colònies blanques; les cèl·lules transformades amb el vector no recombinant produiran colònies blaves.

Reactius: IPTG (Sigma) , X-Gal (Fermentas)

Procediment: Es transformen els bacteris seguint el procediment descrit anteriorment (apartat 2.3.4), abans de sembrar els bacteris en les plaques d'LB-agar+antibiotic, s'afegeix 20µL d' X-Gal i 4 µL d'IPTG. Es plaqueja, i es deixa O/N a 37°C. Aquest sistema de selecció basat en l'activitat β-galactosidasa codificada pel *casset lacZ* permet saber quins clons han incorporat el shRNA, ja que el plasmidi parental, *pSMD2-lacZ-GFP* al perdre el *casset TRlacZ*, les colònies positives seran blanques. D'aquesta manera, el procés de clonatge resultarà més fàcil, sobretot tenint en compte el petit tamany de les seqüències dels shRNAs que fa que esdevingui complicat seleccionar els clons positius per diferència de tamany en patrons de restricció.

2.3. Obtenció i anàlisi del RNA

L'RNA és molt sensible a l'acció de les RNAses, per tant es molt important utilitzar material lliure d'RNAses, preparar les solucions amb aigua DEPC i treballar sempre amb guants.

2.3.1. Extracció d'RNA

Reactius: Trizol (Invitrogen), Qiazol (Qiagen), dietilpirocarbonat (DEPC), RNaseZap^R (Ambion), homogenitzador VWR VDI-12 (VWR International).

Procediment: En primer lloc, es procedeix a eliminar possibles contaminacions per RNAses, utilitzant RNaseZap^R en pipetes i superfícies de treball. Per a la preparació de l'aigua DEPC es posa el volum necessari d'aigua en un recipient lliure d'RNAses (vidre pyrex, 3h a 250°C), s'afegeix el DEPC a un 0,01% (v/v), es deixa O/N a 37 °C i posteriorment s'autoclava dues vegades per inhibir el DEPC. Per a

l'extracció d'RNA de cèl·lules en cultiu, aquestes es lisen afegint 1mL de Trizol per cada 10cm², passant el lisat cel·lular diverses vegades per la pipeta. Per a l'obtenció d'RNA de teixits, s'afegeix un 1ml de Qiazol (s'utilitza per a teixits amb alt contingut amb lípids) per 100mg de teixit i s'homogeneïtza completament amb l'aparell VWR VDI-12. A continuació, es centrifuga 10 minuts a 12.000g i 4°C per eliminar les restes de teixit. En ambdós casos, s'incuben les mostres 5 minuts entre 15-30°C, considerada temperatura ambient (per a la dissociació dels complexos nucleoproteics), se'ls afegeix 0,2ml de cloroform per cada ml de Trizol/Qiazol utilitzat, s'agiten 15" amb vòrtex i es tornen a incubar entre 20-30 minuts a temperatura ambient. Es centrifuguen 15 minuts a 12.000g a 4°C i es recupera la fase aquosa de cada mostra i s'afegeix 0,5ml d'isopropanol per cada ml de Trizol/Qiazol utilitzat. Després d'una incubació de 10 minuts a temperatura ambient, es precipita l'RNA centrifugant 10 minuts a 12.000g a 4°C, es decanta el sobrenedant i es renta el pellet resultant amb etanol al 70% (amb aigua tractada amb DEPC) a raó d'1ml per cada ml de Trizol/Qiazol utilitza i es centrifuga 5 minuts a 7.500g a 4°C. Es descarta el sobrenedant i un cop sec el pellet d'RNA, es ressuspèn amb aigua DEPC, es mesura la seva concentració espectofotomètricament amb Nanodrop i s'emmagatzema a -80°C.

2.3.2. Anàlisi de la qualitat de l'RNA.

Abans d'utilitzar les mostres d'RNA en assajos de qPCR, es va voler analitzar la seva qualitat per evitar utilitzar aquelles en les quals s'havia produït degradació o baix rendiment d'obtenció d'RNA durant el procés d'extracció. Per fer-ho, es va utilitzar el sistema d'electroforesi automatitzada Experion™ (BioRad). Aquesta tècnica es basa en la tecnologia de microfluïds que integra la separació, detecció i anàlisi de dades fent ús d'una única plataforma.

Reactius: eppendorf de 200uL (Eppendorf) , *RNA Std Sens Kit Reagents* (BioRad).

Procediment: Cal treballar amb guants sense pols ja que pot interferir en el procés. En un eppendorf de 200µL s'afegeixen 2 µL de les mostres d'RNA a analitzar, mantenint-les en gel. A continuació s'utilitza l'*RNA Std Sens Kit Reagents* seguint les instruccions especificades pel fabricant i es visualitzen les dades en forma de cromatograma amb el software propi del sistema. En funció de com apareixen els 2 pics més importants, corresponents al RNA ribosomal (rRNA) 18S i 28S, s'estima la qualitat de la mostra.

2.3.3. Retrotranscripció

El motlle emprat en la PCR quantitativa (qPCR) és un DNA complementari (cDNA) monocatenari, obtingut per la retrotranscripció del RNA. Per tal d'obtenir l'mRNA total de les mostres es procedeix a la retrotranscripció dels mRNA de la cèl·lula utilitzant un primer poliT (*oligodT*) que s'unirà a les cues poliA retrotranscrivint únicament aquests RNAs.

Reactius: *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (BioRad), *oligodT* (Invitrogen)

Procediment: Es parteix d'1 microgram d'RNA total i es segueixen les instruccions del kit facilitades pel fabricant.

2.3.4. PCR quantitativa (qPCR)

La PCR quantitativa o en temps real s'utilitza per quantificar diferències en l'expressió de l'mRNA. La tècnica es basa en l'ús d'un termociclador espectrofluoromètric i una molècula anomenada *Sybergreen* que s'intercala entre els cadenes dobles de DNA (dsDNA) i no en el DNA de cadena senzilla (ssDNA). Al unir-se al dsDNA, emet fluorescència que el termociclador detectarà durant la reacció de PCR en la fase d'elongació de les cadenes.

Reactius: *iTaq™ Universal SYBR^R Green Supermix* (BioRad), termociclador *CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BioRad), *Hard-Shell^R Rhin-Wall 384-Well Skirted PCR Plates* (BioRad), *Microseal^R "B" Adhesive Seals* (BioRad), plaques de 384 pous i tapes respectivament.

Procediment: Utilitzant una dilució del cDNA 1/5 per a les mostres d'àrees cerebrals i 1/10 en les de ronyó i homogenat de cervell total, el *iTaq™ Universal SYBR^R Green Supermix* i el parell de primers específics per a cada gen a estudiar, realitzant duplicats de cada mostra i seguint el protocol del proveïdor es realitza la reacció de qPCR.

Gen	Primer Forward	Primer Revers
s-KL	5'- TGGCTTTCCTCCTTTACCTG-3'	5'-GCCGACACTGGGTTTTGT-3'
m-KL	5'-TTCAAACCCGGAAGTCTTTG-3'	5'-CCAGGCAGACGTTACATTA-3'
m36B4	5'-ATGGGTACAAGCGCGTCCTG-3'	5'-AGCCGCAAATGCAGATGGAT-3'

Taula 6.1- Primers per a qPCR utilitzats en aquest treball

El programa utilitzat és el següent: 98°C 2 minuts d'activació de la polimerasa i desnaturalització del DNA) seguit de 40 cicles a 95°C durant 5 segons (desnaturalització) i 58°C durant 30 segons (hibridació/extensió). L'anàlisi de les dades obtingudes en la qPCR s'ha fet seguint el mètode ΔC_t suggerit pel fabricant. Es mesura el valor de C_t (*cycle threshold*) per a cada mostra i l'expressió relativa dels gens es calcula per comparació dels valors de C_t . Totes les mostres es normalitzen al gen m36B4, utilitzat com a gen de referència. L'anàlisi de la corba de fusió (*melt-curve*) es fa servir per confirmar la producció d'un únic amplicó per a cada gen testat. Una mostra sense motlle (*no template control*) s'inclou per a cada gen per detectar possibles contaminacions.

2.4. Obtenció i anàlisi de proteïnes

2.4.1. Extracció de proteïnes

En aquest treball s'ha realitzat l'extracció de proteïnes totals de cultius cel·lulars establerts així com també de mostres de diversos teixits murins.

Reactius: tampó de lisi RIPA: 50mM Tris-HCl pH 7.4 (Sigma), 150mM NaCl (Panreac), 1mM EDTA (USB), 1% (v/v) NP-40 (Fluka), 0,25% (v/v) deoxicolat sòdic (Sigma), 50mM NaF (Sigma), 1mM ortovanadat sòdic (Sigma), 10mM Na-beta glicerofosfat (Sigma), 5mM Ppi (Sigma), 1mL inhibidors proteïnes (Calbiochem), sonicador (Sonics).

Procediment: Els extractes cel·lulars es ressuspenen amb 100uL de tampó RIPA i s'homogeneïtzen sonicant, sempre mantenint la mostra en gel. En les mostres de teixit, en funció del volum s'afegeixen entre 500-750uL de tampó RIPA i s'homogeneïtzen utilitzant entre 5-10 polsos de 10 segons a 30A, també mantenint-les en gel per evitar que s'escalfin i es degradin les proteïnes. Un cop finalitzada la homogeneïtzació, en el cas de les mostres de teixit es centrifuguen durant 15 minuts a 12.000g a 4°C per eliminar restes de teixit, es recull el sobrenedant i es manté a -20 °C fins a la quantificació.

2.4.2. Quantificació de proteïnes.

Tots els extractes proteics es quantifiquen seguint el mètode colorimètric BCATM Protein Assay Kit (Pierce), basat en la capacitat quelant que té l'àcid bicinoconínic (BCA) pels ions Cu⁺ resultants de la

reducció del Cu^{2+} a Cu^+ pels enllaços peptídics de les proteïnes en solució alcalina, el que es coneix com a reacció de Biuret. Aquesta reacció afavoreix el viratge de la solució verdosa a lila que absorbeix 562nm i que es pot mesura espectrofotomètricament.

Reactius: Protein Assay Kit (Pierce), lector de plaques d'ELISA.

Procediment: Es parteix d'una recta patró que consisteix en dilucions seriades d'un stock d'albumina bovina sèrica (BSA) proporcionada en el kit, que està a 2mg/mL fins a 0,0625 mg/mL. En paral·lel, es preparen les dilucions de les mostres proteiques a quantificar (normalment 1/10, però pot variar si els valors se surten de la recta). Es prepara la solució de treball (working reagent) tal i com indica el fabricant i es barregen 2 μ L de la recta patró i de les mostres a quantificar i es deixa incubar la reacció 30 minuts a 37°C. Posteriorment es mesura l'absorbància a 562nm el lector de plaques d'ELISA, començant per la recta patró a partir de la qual s'interpolen les mesures d'absorbància de les diferents mostres, obtenint-ne la concentració per a cadascuna d'elles.

2.4.3. Electroforesi desnaturalitzant (SDS-PAGE)

La tècnica d'electroforesi SDS-PAGE es basa en la capacitat de mobilització de les partícules amb carrega quan se'ls hi aplica un camp elèctric. La presència d'un detergent aniònic com és el cas de l'SDS, fa que les proteïnes es desnaturalitzin, es trenquen els enllaços disulfur i poden migrar i separar-se en funció del seu tamany molecular.

Reactius i material: Solució Acrilamida-Bisacrilamida (29:1) (Amresco), *tampó SDS-TrisHCl a pH 8.8:* 1,5M Tris (Sigma), 0,4% SDS (USB), *tampó SDS-TrisHCl a pH 6.8:* 0,5M Tris, 0,4% SDS, APS 10% (Amresco), terametil-etilen-diamina (TEMED) (Sigma), *tampó de carrega 5X:* 20% glicerol (Panreac), 10% SDS, 0,32% 2-mercaptoetanol (Sigma), 0,02% blau de bromofenol (Sigma), marcador de pes molecular (*Page-Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas)), cubeta *Mini Protean Tetra Cell* (BioRad), *tampó d'electroforesi 1X:* 25mM Tris, 192mM glicina (Serva), 1% SDS, agulla Hamilton Microliter™ Syringes (Hamilton).

Procediment: Es prepara un gel separador amb una concentració variable d'acrilamida segons el rang de pes molecular de les proteïnes a separar i un gel concentrador que està sempre a 3,9% d'acrilamida, corresponent a la zona on es carregaran les mostres. Per a la polimerització s'afegeix TEMED i APS. En funció del gruix dels espaiadors dels vidres utilitzats els gels poden ser de 0,75mm o 1,5mm, podent carregar en aquest últim el doble de mostra. Les mostres es preparen diluint la quantitat total de proteïna que es vol analitzar (15-50 μ g) en aigua i afegint tampó de carrega 5X. A

continuació, es desnaturalitzen a 98°C durant 10 minuts i es carreguen en el gel utilitzant una agulla Hamilton. Les condicions d'electroforesi son un voltatge inicial de 100V durant 20-25 minuts per permetre que les proteïnes es concentrin abans d'entrar al gel separador, i posteriorment durant 1h-1,30h a 130V segons les bandes que es desitgi separar.

2.4.1. Electrotransferència

Reactius: Transblot Semydry Transfer Cell (BioRad), membranes PVDF (GE Healthcare), metanol (Panreac), tampó de transferència 1x (25mM Tris (Sigma), 192mM glicina (Serva), paper Extra Thick Western Blotting Filter Paper (ThermoScientific), tampó Ponceau (5% en aigua amb àcid acètic)(Sigma).

Procediment: Les proteïnes presents en el gel d'acrilamida es transfereixen a una membrana de PVDF que prèviament ha estat activada, submergint-la 10 segons en metanol, seguit d'un rentat de 5 minuts en aigua destil·lada i de 15 minuts en tampó de transferència. El gel d'acrilamida que conté les proteïnes també s'equilibra durant 15 minuts en tampó de transferència, igual que els dos papers Extra Thick Western Blotting Filter Paper. Es munta el sandvitx de transferència que mirat des de sota cap a dalt consta de: paper, membrana, gel i un altre paper, eliminant amb un rodet les bombolles que poden interferir durant el procés. La transferència es realitza durant 45 minuts a 25V, i un cop finalitzada es poden visualitzar les proteïnes a través d'una tinció de 5 minuts amb solució *Ponceau* i rentant amb aigua destil·lada posteriorment per eliminar l'excés de colorant.

2.4.2. Immunodetecció

Reactius: TB (50mM Tris, 136mM NaCl (Panreac), 40mM KCl (Panreac), pH 7.5), llet en pols (Central Lechera Asturiana), BSA (Sigma), Tween-20 (Sigma), anticossos primaris i secundaris, ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare), Hyperfilm ECL High Performance Chemiluminescence Films (GE Healthcare), tampó de deshibridació (62,5mM Tris, 100mM 2-mercaptoetanol (Sigma), 2% SDS (USB)).

Els anticossos primaris utilitzats es mostren en la *Taula 6.2*, mentre que com anticossos secundaris s'han utilitzat **(i)** contra conill: *Polyclonal Swine Anti-Rabbit Ig/HRP* (Dako Cytomation) a una dilució 1/1000; **(ii)** contra ratolí : *ECL T^M Anti-Mouse IgG/HRP* (GeHealthcaee) a una dilució 1/10.000.

Taula 6.2- Anticossos primaris utilitzats en aquest treball. La dilució indicada es prepara a partir de l'original.

Anticòs	Dilució	% BSA	Condicions	Animal	Casa comercial
s-KL	1:5000	5%	O/N 4 °C	Conill	Self-generated
MnSOD2	1:10000	5%	O/N 4 °C	Conill	AB Bioscience
GPX1	1:2000	5%	O/N 4 °C	Conill	Ab Frontier
GFAP	1:1000	5%	1h 37 °C	Ratolí	Sigma
Actin	1:1000	5%	O/N 4 °C	Conill	Sigma

Procediment: Un cop s'ha transferit la membrana correctament, es procedeix a bloquejar-la durant 1-2 hores a temperatura ambient en una solució per tal d'evitar les unions inespecífiques de l'anticòs primari, normalment es una solució de BSA al 5% en TBST (TBS amb 0,1% de Tween-20). En el cas de voler immunodetectar proteïnes fosforilades s'utilitza una solució de bloqueig de BSA al 5% en TBST. Posteriorment s'incuba la membrana amb entre 3-10mL de la dilució de l'anticòs primari en solució de bloqueig, seguint les especificacions del fabricant (veure *Taula 6.2*), O/N a 4 °C, excepte l'actina que s'incuba 1 hora a temperatura ambient. Al dia següent, es realitzen tres rentats de la membrana de 10 minuts en TBST i s'incuba la membrana 1 hora a temperatura ambient amb la dilució de l'anticòs secundari que està conjugat amb l'enzim peroxidasa (HRP), en solució de bloqueig. Acabada la incubació, es fan de nou 3 rentats de la membrana amb TBST i es procedeix a la detecció. Es barregen els dos reactius del kit *ECL Plus* tal i com indica el fabricant i s'incuba la solució sobre la membrana durant 5 minuts perquè el luminol del kit reaccioni amb la peroxidasa i emeti llum. Finalment, s'exposa pel·lícules fotogràfiques a la membrana durant un temps determinat i es revelen automàticament en una màquina (KODAK) que subministrerà al film la solució reveladora, fixadora i per últim aigua destil·lada. Les bandes obtingudes en els films s'escanegen i es densitometren. Si aprofitant la mateixa membrana, es vol detectar una proteïna d'igual pes molecular que una d'anterior, cal procedir a la deshibridació (*stripping*) dels anticossos units a la membrana incubant-la durant 2 hores a 55 °C i en agitació amb la solució de deshibridació. Seguidament, serà necessari tornar a activar la membrana amb metanol i a bloquejar-la. Finalment, s'incuba amb el següent anticòs primari tal i com s'ha descrit anteriorment.

2.4.4. Densitometries i quantificació de bandes.

Per a quantificar la intensitat de les bandes obtingudes, es va utilitzar el software ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) i cada carril va ser normalitzat pels nivells d'actina.

2.5. Tècniques generals de cultiu cel·lular

La manipulació de cultius cel·lulars ha estat realitzada en les instal·lacions de nivell de seguretat biològica 2 (NSB2) de la cinquena planta del CBATEG, amb la finalitat de mantenir al màxim les condicions d'asèpsia i esterilitat.

Equipament general: Campana de flux laminar vertical amb sistema de llum UV (Telstar). Incubador de cèl·lules (Forma Scientific) d'atmosfera controlada (5% CO₂, 95% O₂, 95% d'humitat relativa i 37°C). Congelador de -80°C (Forma Scientific). Microscopi invertit (Nikon).

Material fungible: pipetes de plàstic estèrils (ALP), plaques de 10 i 15 cm de diàmetre, plaques de 6, 12 i 48 pous, tubs còncics (falcons) de 15 i 50 mL, criotubs, *scrappers* (Nunc).

2.5.1. Manteniment de cultius cel·lulars en monocapa

Reactius: Medi de creixement *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Labclinics), complementat amb un 10% (v/v) de *Sèrum Fetal Boví* (FBS) (Labclinics) i un 1% (v/v) d'antibiòtics Penicil·lina/Estreptomicina (P/S) (Labclinics). Tampó fosfat salí (D-PBS): 137mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7.4 (Panreac), Tripsina-EDTA (1X). Solució salina 1x (1,4M KCl, 0,7M NaCl).

Procediment: El manteniment normalment es realitza en plaques de 15 cm de diàmetre. Amb les línies cel·lulars 293, s'aspira el medi i es fa un rentat amb 5 mL de D-PBS. S'elimina el D-PBS i s'afegeixen 10 mL de solució salina 1x. A continuació es ressuspenen les cèl·lules per acció mecànica de la pipeta i es passen a un Falcon. Es centrifuguen durant 5 minuts a 1000g, es descarta per aspiració el sobrenedant i s'afegeixen uns mil·lilitres de medi. Es procedeix amb la pipeta a la disgregació mecànica del pellet fins a obtenir una suspensió homogènia. Es sembla en cada placa de 15 cm una dilució variable depenent del dia en que es vulguin utilitzar les cèl·lules, o s'hagin de tornar a passar. S'afegeix a la placa medi de creixement fins a un volum final de 17 mL i es realitzen moviments suaus per dispersar les cèl·lules per tota la placa. Finalment, s'incuba a 37 °C i 5% CO₂ fins a nou ús.

2.5.2. Criopreservació: congelació i descongelació de vials

Reactius: medi de congelació per a línies cel·lulars 293 (FBS amb un 10% de DMSO).

Procediment de congelació: De manera similar al descrit per al manteniment de la línia cel·lular, les cèl·lules de la placa es disgreguen mecànicament amb solució salina, es traspassen a un Falcon i es centrifuguen 5 minuts a 1.000g. S'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el pellet cel·lular en 1mL de medi de congelació. Ràpidament, es traspassa la suspensió a un criotub de congelació, es col·loca en un dipòsit de congelació gradual i es congela a -80°C .

Procediment de descongelació: Es descongela el vial de cèl·lules en un bany a 37°C i ràpidament es passa el contingut a un tub Falcon amb 10 mL de medi. Les cèl·lules es precipiten per centrifugació 5 minuts a 1.000g, s'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el pellet en 5 mL de medi de creixement. Finalment, es sembren en la placa de 10 cm. Quan les cèl·lules arriben al percentatge desitjat de confluència, es realitza el protocol de manteniment.

2.5.3. Introducció de DNA plasmídic en cèl·lules en cultiu per transfecció

Reactius: Polietilenimina (PEI) 10 mM (PolyScience), NaCl 0.9% (B.Braun). *Medi de transfecció:* medi DMEM amb FBS a l'1% i sense antibiòtics.

Procediment: El dia anterior es sembren les cèl·lules de manera que en el moment de la transfecció la confluència es trobi entre el 60-70%. Normalment, les transfeccions es realitzen en plaques de 6 pous. Per a realitzar aquest procediment en un altre tipus de placa, només cal adequar proporcionalment les quantitats.

Per un pou de placa de 6, es transfecten $3\mu\text{g}$ de plasmidi, dissolent el DNA en $200\mu\text{L}$ de NaCl 150mM. En un tub apart, es barregen $2,25\mu\text{L}$ de PEI per cada μg de DNA. La dilució de PEI s'afegeix poc a poc a la del DNA i s'incuba durant 20 minuts a temperatura ambient, amb la finalitat de que es formin els complexos PEI-DNA. Posteriorment, s'aspira el medi de cada pou, s'afegeix medi de transfecció i el volum de DNA/PEI corresponent a cada pou fins a arribar a un volum final de $750\mu\text{L}$ per pou. A continuació, s'incuben les plaques a 37°C i un 5% de CO_2 les hores necessàries segons l'experiment.

2.5.4. Infecció de cèl·lules amb vectors adeno-associats

Reactius: medi d'infecció (medi de cultiu habitual amb 2% d'FBS).

Procediment: En el cas de cèl·lules adherents, s'aspira el medi i es substitueix per medi d'infecció. A continuació s'afegeix el corresponent volum de vector viral. El càlcul depèn de les partícules físiques o genomes virals per cèl·lula (vg/cèl·lula) amb que es desitgi infectar.

2.6. Producció de vectors adenoassociats

Les produccions de vectors virals s'han realitzat en condicions de bioseguretat de nivell 2 (NSB2), seguint el Reglament de Seguretat de la Unitat de Producció de Vectors del CBATEG. Els residus generats durant aquest treball, han estat eliminats seguint el procediment corresponent.

2.6.1. Producció de vectors adeno-associats

La producció d'AAV es realitza seguint el protocol de triple transfecció (*Xiao et al., 1998*), que evita la presència d'adenovirus contaminats. En el procés de producció, cada plasmidi guarda una funció específica: **pRep2CapX** (X=1-10) codifica per a les proteïnes necessàries en la replicació viral i aporta també les proteïnes de la càpsida, **pXX6** proporciona els gens adenovirals necessaris per la replicació del AAV, i per últim el plasmidi **pGG2** conté un casset d'expressió flanquejat per les seqüències ITR virals (senyal d'empaquetament del virus). En la producció de vectors pseudotipats les ITRs i el gen *Rep* del AAV2 es mantenen, canviant només el gen *Cap* de l'AAV2 per el gen *Cap* del serotip a produir. D'aquesta manera, s'aconsegueix un AAV pseudotipat amb el tropisme canviat.

Reactius: PEI (PolyScience), benzonasa (Novagen), tampó de lisi (50mM Tris [Sigma], 20mM NaCl [Panreac], 2mM MgCl₂ [Panreac]).

Procediment: Es preparen 20 plaques de 15 cm amb cèl·lules 293-AAV perquè es trobin a un 70% de confluència el dia de la transfecció. Es realitza la triple transfecció amb PEI de les 20 plaques utilitzant: 500 µg de pXX6, 250 µg de pRep2Cap10 i 250 µg del plasmidi pGG2. Es barregen els tres plasmidis amb DMEM i es reparteixen en cada placa fins que queda un volum de 14 ml/placa. Passades 6 hores, es canvia el medi. 48 hores post-transfecció es recullen les cèl·lules amb l'ajuda d'un *scraper* i es centrifuguen. A continuació, es ressuspenen amb tampó de lisi i es realitzen tres cicles de congelació/descongelació.

2.6.2. Purificació dels vectors adeno-associats genets

Reactius: *PBSMK*: PBS 1x, 1mM MgCl₂ (Panreac), 2,5 mM KCl (Panreac), iodixanol (Axis-Shield PoC AS), phenol red (Sigma), polietilenglicol (PEG) (Fluka), *tampó de lisi*: 50mM Tris (Sigma), 20mM NaCl (Panreac), 2mM MgCl₂ (Panreac).

Procediment: Després dels 3 cicles de congelació/descongelació per lliurar les cèl·lules i alliberar-ne els virus, es precipiten les restes cel·lulars per centrifugació durant 10 minuts a 2.000g i es recupera el sobrenedant. A aquest sobrenedant, se l'hi afegeix la benzonasa (50U/mL) per degradar el DNA cel·lular i s'incuba 1h a 37°C. Posteriorment, es centrifuga 20 minuts a 3.000g i s'afegeix PEG al sobrenedant (1mL PEG/ 4mL de lisat) per facilitar la precipitació de les partícules virals i es deixa actuar 3 hores a 4°C. Seguidament, es centrifuga durant 15 minuts a 8000g a 4°C, es decanta el sobrenedant, s'afegeix 15 ml de tampó de lisi per a cada tub de gradient que es realitza i s'incuba 48h a 4°C.

Per a la preparació del gradient de iodixanol s'utilitzen les següents concentracions:

- Iodixanol al 15% en 1M de NaCl en PBSMK.
- Iodixanol al 25% en PBSMK amb 20 µl de phenol red per proporcionar un color vermell.
- Iodixanol al 40% en PBSMK.
- Iodixanol al 60% en PBSMK amb 2 µl de phenol red per proporcionar un color groc.

A continuació, es prepara el gradient formant capes, per això s'han d'anar afegint al fons del tub, de manera molt lenta, les solucions de iodixanol de menor a major densitat. Així, es comença posant 9mL de iodixanol al 15%, seguidament 6ml de iodixanol al 25%, després 5 mL de iodixanol al 40% i en darrer lloc 5 mL de iodixanol al 60%. Per últim, s'afegeixen a la part superior, molt lentament, els 15 mL de lisat. S'enrasa i s'equilibren els tubs amb PBSMK. Seguidament, es segellen i centrifuguen a 69.000g durant 1 hora. Finalment, es perfora el fons del tub amb un col·lector de fraccions i es recull el virus.

El mètode de purificació utilitzat basat en el fraccionament del lisat cru mitjançant un gradient de densitat en un medi no iònic com el iodixanol té l'avantatge, respecte la purificació clàssica amb doble gradient de clorur de cesi, de que les partícules no s'agreguen i que el iodixanol és inert, per tant, no requereix una purificació posterior.

2.6.3. Determinació del títol de les produccions virals

La determinació del títol de les preparacions virals es realitza mitjançant la utilització d'una molècula anomenada *Picogreen* que s'intercala en les cadenes dsDNA, quantificant el nombre de genomes virals presents en la preparació [501].

Reactius i material: Tampó de lisi (20mM Tris pH 7,4 [Sigma], 200mM NaCl [Panreac]), 0,2% SDS (USB), termociclador de PCR (Eppendorf), placa de 96w de plàstic negre (Nunc), fluorímetre (Wallac 1420 Victor³TM) del Servei d'Anàlisi i Fotodocumentació del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biociències de la UAB, picogreen (Invitrogen).

Procediment: Es dilueixen 2µL de cada mostra amb 8µL de TE, i s'afegeix 10µL de tampó de lisi. La lisi de les càpsides virals es realitza en el termociclador, realitzant un escalfament durant 1 hora a 70°C seguida d'un refredament gradual de 5°C cada minut. Un cop finalitzat el programa del termociclador, es passen els 20µL de cada mostra a un pouet de placa negra de 96w. Seguidament, s'afegeixen 180 µL de *picogreen* a cada pou, s'incuba 5 minuts a temperatura ambient i es procedeix a la lectura de la fluorescència de la placa amb un fluorímetre. A més de les mostres analitzades, també es construeix una recta patró amb 40ng, 13,33ng, 4,44ng, 1,48ng, 0,40ng, 0,16ng, 0,12ng i 0ng de DNA. També es carreguen mostres sense tampó de lisi que detecten el DNA exogen present, que es restarà dels valors obtinguts. Interpolant la fluorescència obtinguda de les mostres amb la de la recta patró s'obtenen els ng de DNA presents en cada mostra i amb la següent formula es calculen els genomes virals de cada preparació:

$$\frac{A \times 1.82 \cdot 10^{12}}{B}$$

On **A** són els ng/mL de DNA: ng/mL= ng en el pou x 1000/C,
B és la longitud del genoma AAV (distància en bases entre les ITRs)

2.7. Tècniques utilitzades *in vivo*

2.7.1. Injecció intracerebral de vectors AAV.

El procediment d'injecció *in vivo* de vectors adenoassociats es va dur a terme en les instal·lacions del Servei d'Estabulari de la UAB. Els ratolins van ser manipulats d'acord amb les normes de benestar animal i tots els protocols van ser acceptats pel Comitè d'Ètica de la UAB (CEAAH 2196).

Reactius i material: Ketamina (*Imalgene* 50mg/mL, Merial), Xilacina (*Rompun*^R, hidroclorur de xilacina, Bayern), NaCl 0,9% (B.Braun), aparell esterotàxic, bomba de microinjecció, agulles 0,40 (B.Braun), xeringa Hamilton de 10µl (Hamilton), grapes, grapadora.

Procediment: La injecció intracerebral consisteix en l'administració directa dels vectors a una zona concreta del cervell. S'anestesia l'animal amb una injecció intraperitoneal d'una mescla de ketamina/xilacina (10mg/1mg per kg de pes). Per evitar la sequedat de la còrnia durant el procediment, s'aplica una gota de solució salina (NaCl 0,9%) en cada ull. Un cop desapareix el reflex podal, es procedeix a iniciar la cirurgia. En primer lloc, es realitza un tall d'aproximadament 7-8 mm en la pell del crani de l'animal, per localitzar el punt Bregma. A continuació, amb l'ajuda de l'aparell esterotàxic, es col·loca la xeringa d'una agulla Hamilton de 10mL (l'interior de la qual conté la solució amb el virus) en el punt corresponent a les coordenades del lloc d'administració. Un cop marcada la posició, amb una agulla de 0,40 es perfora amb cura el crani, sense tocar el cervell. A través d'aquest orifici, s'introdueix l'agulla Hamilton, i amb l'ajuda d'una bomba de microinjecció es dispensa el contingut a una velocitat de 0,5µL/min. Un cop finalitzada la injecció, es retira l'animal de l'aparell esterotàxic, es tanca la ferida amb una grapa i es retorna a la gàbia, administrant-li calor fins a la recuperació en xas de que fos necessari per evitar la hipotèrmia.

Les coordenades dels punts d'injecció van ser les següents:

- Administració intraventricular: AP: 0,22mm; L: 0,1mm; V: 0,02mm.
- Administració intrahipocampal: AP: 2,80mm; L: 1,5mm; V: -1,4mm.

2.7.2. Eutanàsia i presa de mostres

Reactius i material: Isoflurà (Esteve), nitrogen líquid, tanc per al nitrogen líquid.

Procediment: L'eutanàsia dels animals es va dur a terme per decapitació, després de ser anestesiats amb Isoflurà. Ràpidament, per evitar la degradació de l'RNA i les proteïnes, es procedeix a la extracció del cervell i a la dissecció de les 4 àrees analitzades: còrtex prefrontal, còrtex cerebral, hipocamp i cerebel. Les mostres son congelades ràpidament en nitrogen líquid i s'emmagatzemen a -80°C fins al seu ús. En general, la meitat de l'hemisferi s'utilitza per a l'extracció de proteïnes i l'altra meitat per a l'extracció d'RNA.

2.7.3. Estudis conductuals.

Els diferents estudis de comportament que es presenten en aquest treball es van realitzar a través d'una sèrie de proves o bateria conductual estandaritzada, descrita prèviament per *Gimenez-Llort et al. 2002* [502]. A continuació es detallen els tests utilitzats per a l'avaluació de les condicions físiques i les habilitats motores, les capacitats d'aprenentatge i memòria, així com patrons de respostes conductuals que inclouen l'activitat exploratòria, la neofòbia i conductes associades a l'ansietat.

2.7.3.1. Pes corporal i funcions sensiomotores

La condició física dels ratolins es va avaluar a partir del seu pes corporal i de les funcions sensiomotores. La prova de les funcions sensiomotores avalua diversos aspectes de les condicions físiques i sensorials dels animals, com són els reflexes visuals, l'equilibri, la coordinació motora, la força i la resistència. Aquest test està format per quatre proves consecutives:

- 1) **Prova de reflex visual:** El reflex visual i l'extensió reflexa de les potes posteriors es mesuren tres vegades sostenint en alt (40 cm) a l'animal per la cua i aproximant-lo lentament cap a una superfície de color negra (30x30cm). L'animal ha d'estendre les potes abans de topar amb la superfície (puntuació "1") i es pren el valor mitjà de les 3 puntuacions.

2)

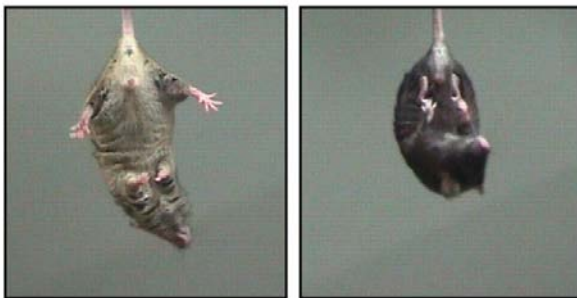


Figura 6.2- En un ratolí control (esquerra) s'observa el comportament normal en el test de reflex visual, en qual se separen les extremitats posteriors per prepara l'aterratge. En canvi, aquesta resposta es veu alterada en el model transgènic de atàxia espinocerebel·lar (dreta). (*Boy et al. 2009*) [4].

- 2) **Proves de la barra de fusta i la barra de metall:** L'equilibri i la coordinació motora es van avaluar en dues tasques consecutives formades per una barra de fusta (1cm de diàmetre) o metàl·lica (1cm de diàmetre), suspesa uns 40cm per sobre de la superfície de treball. L'animal es col·loca en el centre de la barra, on s'han marcat segments de 10cm de longitud a costat i costat del centre. Es conten el número de segments que recorre l'animal en 20 segons, i el temps que triga a caure. Es realitzen dos assajos consecutius.

3) Prova del penja-robes: Fent ús d'un penja-robes metàl·lic, es pot mesurar la capacitat prensil i la coordinació motora de l'animal, deixant que aquest s'agafi amb les extremitats davanteres a la barra horitzontal de la perxa, de 2mm de diàmetre i suspesa uns 60 cm per sobre de la superfície de treball. L'animal es col·loca en el centre i es realitzen dos assajos de 5 segons cadascun, i un tercer de 60s. El temps que triga a caure l'animal en l'assaig dels 5 segons és indicatiu de la força física de l'animal, i els segments recorreguts donen una idea de la coordinació motora. D'altra banda, el temps que triga a caure en l'assaig de 60s és directament proporcional a la resistència física.

2.7.3.2. Test de les cantonades o *Corner test*

El test de les cantonades s'utilitza per avaluar la neofòbia o por a la novetat i consisteix a introduir a l'animal en el centre d'una gàbia de plàstic estàndard (idèntica a la que s'utilitza per a la seva estabulació) amb encenall nèt i inodor. En aquesta prova s'avalua la conducta espontània de l'animal durant 30 segons i es registren el nombre de cantonades visitades i el nombre d'aixecaments verticals (l'animal ha de sostenir-se de peu sobre les potes del darrera, recolzant-se a la paret o no). Per a cada animal s'utilitza una gàbia nova (neta) per tal d'evitar possibles interferències en aquesta conducta a causa del rastre d'olors.

2.7.3.3. Test del camp obert o *Open field test*

La prova del camp obert s'utilitza per avaluar la reactivitat emocional i l'activitat exploratòria del rosegadors en un ambient ansiogènic. En aquest cas, l'animal es col·loca en el centre d'una cambra (ex: una caixa de 50 x 50 x 10 cm) en condicions d'il·luminació estàndards i es registra la conducta de l'animal durant 5 minuts. Es mesura la latència o duració dels següents esdeveniments conductuals: temps de sortida del centre i arribada a la perifèria i la conducta de *grooming* o d'empolainament. També es mesura l'activitat locomotora horitzontal (el nombre de *crossings* o creuaments de 10 x 10cm) i la vertical (latència i nombre total de *rearings*). Finalment s'anoten també el nombre de defecacions.

2.7.3.4. Test del laberint en T o *T-maze test*.

El laberint en T està format per dos braços de 25x8cm i un braç llarg de 30x8cm disposats en forma de T. Hi ha dos tipus de paradigma que es poden avaluar en aquest test: la prova d'alternança espontània i la prova de memòria de treball.

En el nostre cas, s'ha utilitzat per avaluar la memòria de treball. Aquest test es duu a terme en dues fases: la primera, anomenada assaig d'elecció forçada (*forced trial*) i la segona, la de memòria o evocació (*recall trial*) amb un interval de 90 segons entre ambdues. En la prova d'elecció forçada, només un dels braços és accessible, seguint un ordre a l'atzar i de manera contrabalancejada entre grups experimentals. L'animal es col·loca mirant a l'extrem que forma la base de la T i es deixa que explori lliurement el laberint, ara en forma de L, durant un màxim de 5 minuts. L'animal es retira un cop ha explorat el braç durant 20 segons, interval de temps establert com a criteri d'aprenentatge. En la prova de memòria, l'animal torna a tenir l'opció d'explorar el laberint lliurement, només que ara, tots dos braços són accessibles. S'anota el braç triat per l'animal i el nombre d'errors en l'elecció del braç no accessible en l'anterior prova.

2.7.3.5. Test del laberint aquàtic de Morris o *Morris Water Maze (MWM) test*

El laberint aquàtic de Morris és una prova àmpliament utilitzada en les bateries conductuals ja que permet executar paradigmes d'aprenentatge i/o memòria de diverses tipologies, complexitats i patrons temporals.

El laberint consisteix en una piscina circular d'un metre de diàmetre i un 40 cm d'alçada amb aigua opaca a 25°C. Durant les proves, l'animal s'introdueix delicadament dins de l'aigua des d'un punt cardinal diferent i alternat (nord, sud, est i oest). La tasca d'aprenentatge consisteix en trobar la plataforma (7 cm de diàmetre) que pot estar visible (0,5 cm sobre la superfície de l'aigua) i assenyalada amb una bandera de ratlles blanques i negres o bé, estar amagada (1cm per sota de la superfície de l'aigua) segons sigui el paradigma d'aprenentatge guiat (en anglès *cue learning task*, CUE) o d'aprenentatge de localització (en anglès, *place learning task*, PT). Les pistes que permeten guiar l'animal per trobar la plataforma són internes (la bandera en la tasca d'aprenentatge guiat) o bé externes (una figura de color diferent penjada en cada paret). Els animals han de trobar la plataforma en un temps màxim de 90 segons. Si durant aquest període, l'animal no aconsegueix trobar-la, l'experimentador el col·loca sobre de la plataforma durant 10 segons, el mateix temps que els animals que la troben hi romanen abans de ser retirats per l'experimentador. El protocol

experimental té la següent pauta: un dia d'aprenentatge guiat seguit de quatre dies d'aprenentatge de localització de la plataforma i els dos assaigs de memòria finals passades 2 i 24 hores respectivament de l'última sessió d'aprenentatge.

Cada sessió experimental consisteix de quatre assajos espaiats entre ells per un 35 minuts. Les variables que es mesuren són la latència d'arribada a la plataforma i la distància recorreguda per fer-ho. El càlcul es realitza en base a imatges enregistrades utilitzant un sistema informatitzat (software *Smart 3.0*, PanLab S.L, Barcelona). A partir d'aquestes dues variables es va calcular la velocitat de natació (cm/s) en cada assaig.

Per realitzar les proves de memòria a curt o llarg termini, 1 hora i mitja o 24 hores després de la última sessió d'aprenentatge de localització, es retira la plataforma (en anglès, *removal*). Aquesta prova consisteix en deixar que l'animal navegui durant 1 minut dins de la piscina i demostri, amb el percentatge de permanència en cada un dels seus quadrants, el grau de memòria per recordar la posició on estava la plataforma.

2.8. Anàlisi estadístic dels resultats

En general, els resultats obtinguts s'expressen com la mitjana dels valors obtinguts \pm l'error estàndard de la mitjana (SEM). Les diferències entre grups s'han analitzat o bé per T-student o bé per ANOVA (d'un o més factors) amb un test posthoc de Tukey. Per a les variables no paramètriques s'ha fet servir Kruskal-Wallis. En tots els casos es consideren els resultats estadísticament significatius per a valors de $p < 0,05$. L'anàlisi estadístic va ser realitzat utilitzant el programa *GraphPad Prism 5.0*.

VII. BIBLIOGRAFIA

REFERÈNCIES:

1. Bao, Q., et al., *Aging and age-related diseases--from endocrine therapy to target therapy*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **394**(1-2): p. 115-8.
2. Pathology, U.o.W.D.o., *International Registry of Werner Syndrome*.
<http://www.pathology.washington.edu/research/werner/registry/registry.html>.
3. Burke, S.N. and C.A. Barnes, *Neural plasticity in the ageing brain*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(1): p. 30-40.
4. Boy, J., et al., *Reversibility of symptoms in a conditional mouse model of spinocerebellar ataxia type 3*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(22): p. 4282-95.
5. Boyette, L.B. and R.S. Tuan, *Adult Stem Cells and Diseases of Aging*. J Clin Med, 2014. **3**(1): p. 88-134.
6. Lopez-Otin, C., et al., *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-217.
7. Shaw, A.C., et al., *Aging of the innate immune system*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(4): p. 507-13.
8. Molofsky, A.V., et al., *Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing*. Nature, 2006. **443**(7110): p. 448-52.
9. Blagosklonny, M.V., *Aging is not programmed: genetic pseudo-program is a shadow of developmental growth*. Cell Cycle, 2013. **12**(24): p. 3736-42.
10. Rincon, M., E. Rudin, and N. Barzilai, *The insulin/IGF-1 signaling in mammals and its relevance to human longevity*. Exp Gerontol, 2005. **40**(11): p. 873-7.
11. Cheng, C.L., et al., *Role of insulin/insulin-like growth factor 1 signaling pathway in longevity*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(13): p. 1891-5.
12. Kenyon, C., *The plasticity of aging: insights from long-lived mutants*. Cell, 2005. **120**(4): p. 449-60.
13. Blagosklonny, M.V. and M.N. Hall, *Growth and aging: a common molecular mechanism*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(4): p. 357-62.
14. Blagosklonny, M.V., *Aging: ROS or TOR*. Cell Cycle, 2008. **7**(21): p. 3344-54.
15. Blagosklonny, M.V., *Once again on rapamycin-induced insulin resistance and longevity: despite of or owing to*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(5): p. 350-8.
16. Bordone, L. and L. Guarente, *Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 298-305.
17. Clark, A.M. and A.B. Gould, *Genetic control of adult life span in Drosophila melanogaster*. Exp Gerontol, 1970. **5**(2): p. 157-62.
18. Mallick, L.E. and J.F. Kidwell, *The effect of mating status, sex and genotype on longevity in Drosophila melanogaster*. Genetics, 1966. **54**(1): p. 203-9.
19. Sondhi, K.C., *Studies in aging. VI. Genes, developmental environment, and the expression of aging processes in Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **59**(3): p. 785-91.
20. Apfeld, J. and C. Kenyon, *Cell nonautonomy of C. elegans daf-2 function in the regulation of diapause and life span*. Cell, 1998. **95**(2): p. 199-210.

21. Braeckman, B.P., K. Houthoofd, and J.R. Vanfleteren, *Insulin-like signaling, metabolism, stress resistance and aging in Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(7): p. 673-93.
22. Tatar, M., A. Bartke, and A. Antebi, *The endocrine regulation of aging by insulin-like signals*. Science, 2003. **299**(5611): p. 1346-51.
23. Rogina, B., et al., *Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in Drosophila*. Science, 2000. **290**(5499): p. 2137-40.
24. Inoue, K., et al., *Functional identity of Drosophila melanogaster Indy as a cation-independent, electroneutral transporter for tricarboxylic acid-cycle intermediates*. Biochem J, 2002. **367**(Pt 2): p. 313-9.
25. Wang, P.Y., et al., *Long-lived Indy and calorie restriction interact to extend life span*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(23): p. 9262-7.
26. Woodruff, R.C., J.P. Phillips, and A.J. Hilliker, *Increased spontaneous DNA damage in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) deficient Drosophila*. Genome, 2004. **47**(6): p. 1029-35.
27. Phillips, J.P., et al., *Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in Drosophila confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2761-5.
28. Seto, N.O., S. Hayashi, and G.M. Tener, *Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase in Drosophila does not affect life-span*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(11): p. 4270-4.
29. Orr, W.C. and R.S. Sohal, *The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic Drosophila melanogaster*. Arch Biochem Biophys, 1992. **297**(1): p. 35-41.
30. Elia, A.J., et al., *Expression of human FALS SOD in motoneurons of Drosophila*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(9-10): p. 1332-8.
31. Parkes, T.L., et al., *Extension of Drosophila lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 171-4.
32. Phillips, J.P., T.L. Parkes, and A.J. Hilliker, *Targeted neuronal gene expression and longevity in Drosophila*. Exp Gerontol, 2000. **35**(9-10): p. 1157-64.
33. Reveillaud, I., et al., *Expression of bovine superoxide dismutase in Drosophila melanogaster augments resistance of oxidative stress*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(2): p. 632-40.
34. Orr, W.C. and R.S. Sohal, *Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression of life span and resistance to oxidative stress in transgenic Drosophila melanogaster*. Arch Biochem Biophys, 1993. **301**(1): p. 34-40.
35. Orr, W.C. and R.S. Sohal, *Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster*. Science, 1994. **263**(5150): p. 1128-30.
36. Orr, W.C., et al., *Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in Drosophila melanogaster*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26418-22.
37. Charlton, H.M., *Mouse mutants as models in endocrine research*. Q J Exp Physiol, 1984. **69**(4): p. 655-76.

38. Steger, R.W., A. Bartke, and M. Cecim, *Premature ageing in transgenic mice expressing different growth hormone genes*. J Reprod Fertil Suppl, 1993. **46**: p. 61-75.
39. Dominici, F.P., et al., *Increased insulin sensitivity and upregulation of insulin receptor, insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in liver of Ames dwarf mice*. J Endocrinol, 2002. **173**(1): p. 81-94.
40. Liu, J.P., et al., *Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)*. Cell, 1993. **75**(1): p. 59-72.
41. Accili, D., et al., *Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene*. Nat Genet, 1996. **12**(1): p. 106-9.
42. Holzenberger, M., et al., *IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice*. Nature, 2003. **421**(6919): p. 182-7.
43. Hsieh, C.C., et al., *Effects of the Pit1 mutation on the insulin signaling pathway: implications on the longevity of the long-lived Snell dwarf mouse*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(9): p. 1245-55.
44. Bluher, M., et al., *Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance*. Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 25-38.
45. Katic, M. and C.R. Kahn, *The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(3): p. 320-43.
46. 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.
47. Houtkooper, R.H., et al., *The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways*. Endocr Rev, 2010. **31**(2): p. 194-223.
48. Canto, C. and J. Auwerx, *Caloric restriction, SIRT1 and longevity*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(7): p. 325-31.
49. Rutanen, J., et al., *SIRT1 mRNA expression may be associated with energy expenditure and insulin sensitivity*. Diabetes, 2010. **59**(4): p. 829-35.
50. Herranz, D., et al., *Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer*. Nat Commun, 2010. **1**: p. 3.
51. Kuro-o, M., et al., *Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing*. Nature, 1997. **390**(6655): p. 45-51.
52. Olauson, H., et al., *New insights into the FGF23-Klotho axis*. Semin Nephrol, 2014. **34**(6): p. 586-97.
53. Kuro-o, M., *Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism*. Nat Rev Nephrol, 2013. **9**(11): p. 650-60.
54. Kurosu, H., et al., *Suppression of aging in mice by the hormone Klotho*. Science, 2005. **309**(5742): p. 1829-33.
55. Bartke, A., *Long-lived Klotho mice: new insights into the roles of IGF-1 and insulin in aging*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(2): p. 33-5.
56. Yamamoto, M., et al., *Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 38029-34.

57. Ikushima, M., et al., *Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **339**(3): p. 827-32.
58. Kurosu, H., et al., *Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(10): p. 6120-3.
59. Razzaque, M.S., et al., *Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process*. *FASEB J*, 2006. **20**(6): p. 720-2.
60. Chang, Q., et al., *The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel*. *Science*, 2005. **310**(5747): p. 490-3.
61. Garry, P.J., *Aging successfully: a genetic perspective*. *Nutr Rev*, 2001. **59**(8 Pt 2): p. S93-101.
62. Rothschild, H. and S.M. Jazwinski, *Human longevity determinant genes*. *J La State Med Soc*, 1998. **150**(6): p. 272-4.
63. Heijmans, B.T., R.G. Westendorp, and P.E. Slagboom, *Common gene variants, mortality and extreme longevity in humans*. *Exp Gerontol*, 2000. **35**(6-7): p. 865-77.
64. Smith, J.D., *Apolipoproteins and aging: emerging mechanisms*. *Ageing Res Rev*, 2002. **1**(3): p. 345-65.
65. Ang, L.S., et al., *Apolipoprotein E, an important player in longevity and age-related diseases*. *Exp Gerontol*, 2008. **43**(7): p. 615-22.
66. Seripa, D., et al., *The genetics of the human APOE polymorphism*. *Rejuvenation Res*, 2011. **14**(5): p. 491-500.
67. McKay, G.J., et al., *Variations in apolipoprotein E frequency with age in a pooled analysis of a large group of older people*. *Am J Epidemiol*, 2011. **173**(12): p. 1357-64.
68. Beekman, M., et al., *Chromosome 4q25, microsomal transfer protein gene, and human longevity: novel data and a meta-analysis of association studies*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006. **61**(4): p. 355-62.
69. Huffman, D.M., et al., *Distinguishing between longevity and buffered-deleterious genotypes for exceptional human longevity: the case of the MTP gene*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012. **67**(11): p. 1153-60.
70. Sadahira, Y., et al., *WRN protein as a novel erythroblast immunohistochemical marker with applications for the diagnosis of Werner syndrome*. *Virchows Arch*, 2015. **466**(3): p. 343-50.
71. van Leerdam, L.E., et al., *[Herlyn-Werner-Wunderlich syndrome]*. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2014. **158**: p. A7886.
72. Kitano, K., *Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM*. *Front Genet*, 2014. **5**: p. 366.
73. Chu, Y., et al., *Hutchinson-Gilford progeria syndrome caused by an LMNA mutation: a case report*. *Pediatr Dermatol*, 2015. **32**(2): p. 271-5.
74. Dominici, S., et al., *Different prelamin A forms accumulate in human fibroblasts: a study in experimental models and progeria*. *Eur J Histochem*, 2009. **53**(1): p. 43-52.
75. *American College of Sports Medicine Position Stand. Exercise and physical activity for older adults*. *Med Sci Sports Exerc*, 1998. **30**(6): p. 992-1008.

76. Rydwick, E., et al., *Effects of physical training on aerobic capacity in frail elderly people (75+ years). Influence of lung capacity, cardiovascular disease and medical drug treatment: a randomized controlled pilot trial.* Aging Clin Exp Res, 2010. **22**(1): p. 85-94.
77. McCarter, R.J., *Role of caloric restriction in the prolongation of life.* Clin Geriatr Med, 1995. **11**(4): p. 553-65.
78. Masoro, E.J., *Possible mechanisms underlying the antiaging actions of caloric restriction.* Toxicol Pathol, 1996. **24**(6): p. 738-41.
79. Monti, D., et al., *Caloric restriction modulates aging rate and sensitivity to oxygen free radical damage in rats.* Aging (Milano), 1991. **3**(4): p. 410-2.
80. Colman, R.J., et al., *Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 3557.
81. Everitt, A.V., B.D. Porter, and J.R. Wyndham, *Effects of caloric intake and dietary composition on the development of proteinuria, age-associated renal disease and longevity in the male rat.* Gerontology, 1982. **28**(3): p. 168-75.
82. Davis, T.A., C.W. Bales, and R.E. Beauchene, *Differential effects of dietary caloric and protein restriction in the aging rat.* Exp Gerontol, 1983. **18**(6): p. 427-35.
83. Allison, D.B., et al., *Genetic variability in responses to caloric restriction in animals and in regulation of metabolism and obesity in humans.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001. **56 Spec No 1**: p. 55-65.
84. Lorenzini, A., *How Much Should We Weigh for a Long and Healthy Life Span? The Need to Reconcile Caloric Restriction versus Longevity with Body Mass Index versus Mortality Data.* Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 121.
85. Dutra, M.F., et al., *Effects of chronic caloric restriction on kidney and heart redox status and antioxidant enzyme activities in Wistar rats.* BMB Rep, 2012. **45**(11): p. 671-6.
86. Lopez-Torres, M., et al., *Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria.* Free Radic Biol Med, 2002. **32**(9): p. 882-9.
87. Messaoudi, I., et al., *Optimal window of caloric restriction onset limits its beneficial impact on T-cell senescence in primates.* Aging Cell, 2008. **7**(6): p. 908-19.
88. Sohal, R.S. and M.J. Forster, *Caloric restriction and the aging process: a critique.* Free Radic Biol Med, 2014. **73**: p. 366-82.
89. Liao, C.Y., et al., *Genetic variation in the murine lifespan response to dietary restriction: from life extension to life shortening.* Aging Cell, 2010. **9**(1): p. 92-5.
90. Rebrin, I., M.J. Forster, and R.S. Sohal, *Association between life-span extension by caloric restriction and thiol redox state in two different strains of mice.* Free Radic Biol Med, 2011. **51**(1): p. 225-33.
91. Turturro, A., et al., *Growth curves and survival characteristics of the animals used in the Biomarkers of Aging Program.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1999. **54**(11): p. B492-501.

92. Rikke, B.A., et al., *Genetic dissection of dietary restriction in mice supports the metabolic efficiency model of life extension*. *Exp Gerontol*, 2010. **45**(9): p. 691-701.
93. Bishop, N.A., T. Lu, and B.A. Yankner, *Neural mechanisms of ageing and cognitive decline*. *Nature*, 2010. **464**(7288): p. 529-35.
94. GS, F.C.a.R., *Biochemistry of aging in Basic Neurochemistry*. 1999.
95. Coleman, P.D. and D.G. Flood, *Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 1987. **8**(6): p. 521-45.
96. Brizzee, K.R., *Neurons numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 1987. **8**(6): p. 579-80.
97. Haug, H., et al., *The significance of morphometric procedures in the investigation of age changes in cytoarchitectonic structures of human brain*. *J Hirnforsch*, 1984. **25**(4): p. 353-74.
98. Landfield, P.W., et al., *Mechanisms of neuronal death in brain aging and Alzheimer's disease: role of endocrine-mediated calcium dyshomeostasis*. *J Neurobiol*, 1992. **23**(9): p. 1247-60.
99. Meaney, M.J., et al., *Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus*. *Science*, 1988. **239**(4841 Pt 1): p. 766-8.
100. Yankner, B.A., T. Lu, and P. Loerch, *The aging brain*. *Annu Rev Pathol*, 2008. **3**: p. 41-66.
101. Gallagher, M. and P.R. Rapp, *The use of animal models to study the effects of aging on cognition*. *Annu Rev Psychol*, 1997. **48**: p. 339-70.
102. Grill, J.D. and D.R. Riddle, *Age-related and laminar-specific dendritic changes in the medial frontal cortex of the rat*. *Brain Res*, 2002. **937**(1-2): p. 8-21.
103. Magnone, M.C., et al., *Neurochemical parameters of the main neurotransmission systems in aging mice*. *Arch Gerontol Geriatr*, 2000. **30**(3): p. 269-279.
104. Strong, R., et al., *Age-related alterations in the rodent brain cholinergic system and behavior*. *Neurobiol Aging*, 1980. **1**(1): p. 59-63.
105. Colombo, P.J. and M. Gallagher, *Individual differences in spatial memory and striatal ChAT activity among young and aged rats*. *Neurobiol Learn Mem*, 1998. **70**(3): p. 314-27.
106. Bhaskaran, D. and E. Radha, *Monoamine levels and monoamine oxidase activity in different regions of rat brain as a function of age*. *Mech Ageing Dev*, 1983. **23**(2): p. 151-60.
107. Jouvett, M., et al., *[Noradrenaline and cerebral aging]*. *Encephale*, 1991. **17**(3): p. 187-95.
108. Rodriguez, J.J., H.N. Noristani, and A. Verkhatsky, *The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease*. *Prog Neurobiol*, 2012. **99**(1): p. 15-41.
109. Magnusson, K.R. and C.W. Cotman, *Age-related changes in excitatory amino acid receptors in two mouse strains*. *Neurobiol Aging*, 1993. **14**(3): p. 197-206.
110. Dorszewska, J., *Cell biology of normal brain aging: synaptic plasticity-cell death*. *Aging Clin Exp Res*, 2013. **25**(1): p. 25-34.
111. Bliss, T.V. and G.L. Collingridge, *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus*. *Nature*, 1993. **361**(6407): p. 31-9.

112. Musgrave, M.A., B.A. Ballyk, and J.W. Goh, *Coactivation of metabotropic and NMDA receptors is required for LTP induction*. Neuroreport, 1993. **4**(2): p. 171-4.
113. Lister, J.P. and C.A. Barnes, *Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging*. Arch Neurol, 2009. **66**(7): p. 829-33.
114. Yirmiya, R. and I. Goshen, *Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis*. Brain Behav Immun, 2011. **25**(2): p. 181-213.
115. Finch, C.E., *Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging*. Neurobiol Aging, 2003. **24 Suppl 1**: p. S123-7; discussion S131.
116. Glorioso, C. and E. Sibille, *Between destiny and disease: genetics and molecular pathways of human central nervous system aging*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(2): p. 165-81.
117. Ball, M.J., *Alzheimer's disease: a challenging enigma*. Arch Pathol Lab Med, 1982. **106**(4): p. 157-62.
118. Blass, J.P., L. Ko, and H.M. Wisniewski, *Pathology of Alzheimer's disease*. Psychiatr Clin North Am, 1991. **14**(2): p. 397-420.
119. Leszek, J., *[Amyloid protein--cause or effect of Alzheimer's disease]*. Postepy Hig Med Dosw, 1994. **48**(1): p. 1-18.
120. Eisele, Y.S., *From soluble abeta to progressive abeta aggregation: could prion-like templated misfolding play a role?* Brain Pathol, 2013. **23**(3): p. 333-41.
121. Chhangani, D. and A. Mishra, *Protein quality control system in neurodegeneration: a healing company hard to beat but failure is fatal*. Mol Neurobiol, 2013. **48**(1): p. 141-56.
122. Morawe, T., et al., *Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease*. Mol Neurobiol, 2012. **46**(1): p. 41-54.
123. Wang, X., et al., *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(8): p. 1240-7.
124. Terry, R.D. and P. Davies, *Dementia of the Alzheimer type*. Annu Rev Neurosci, 1980. **3**: p. 77-95.
125. Waldemar, G., et al., *Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline*. Eur J Neurol, 2007. **14**(1): p. e1-26.
126. Sperling, R., E. Mormino, and K. Johnson, *The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials*. Neuron, 2014. **84**(3): p. 608-22.
127. Riege, W.H. and E.J. Metter, *Cognitive and brain imaging measures of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1988. **9**(1): p. 69-86.
128. Tabert, M.H., et al., *A 10-item smell identification scale related to risk for Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 2005. **58**(1): p. 155-60.
129. Gomez-Isla, T., et al., *Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease*. J Neurosci, 1996. **16**(14): p. 4491-500.
130. Price, J.L., et al., *Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2001. **58**(9): p. 1395-402.

131. Small, S.A., et al., *Imaging hippocampal function across the human life span: is memory decline normal or not?* Ann Neurol, 2002. **51**(3): p. 290-5.
132. Desgranges, B., G. Kalpouzos, and F. Eustache, [*Cerebral imaging in healthy aging: contrast with Alzheimer disease*]. Rev Neurol (Paris), 2008. **164 Suppl 3**: p. S102-7.
133. Andrews-Hanna, J.R., et al., *Disruption of large-scale brain systems in advanced aging*. Neuron, 2007. **56**(5): p. 924-35.
134. Rombouts, S.A., et al., *Altered resting state networks in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease: an fMRI study*. Hum Brain Mapp, 2005. **26**(4): p. 231-9.
135. Loerch, P.M., et al., *Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3329.
136. Anand, R., K.D. Gill, and A.A. Mahdi, *Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future*. Neuropharmacology, 2014. **76 Pt A**: p. 27-50.
137. Summers, W.K., et al., *Long-term hepatotoxicity of tacrine*. Lancet, 1989. **1**(8640): p. 729.
138. Shinagawa, S. and M. Shigeta, [*Acetylcholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease*]. Brain Nerve, 2014. **66**(5): p. 507-16.
139. Kovacs, T., [*Therapy of Alzheimer disease*]. Neuropsychopharmacol Hung, 2009. **11**(1): p. 27-33.
140. Street, J.S., et al., *Olanzapine treatment of psychotic and behavioral symptoms in patients with Alzheimer disease in nursing care facilities: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. The HGEU Study Group*. Arch Gen Psychiatry, 2000. **57**(10): p. 968-76.
141. Johnson, M.K. and L. Hasher, *Human learning and memory*. Annu Rev Psychol, 1987. **38**: p. 631-68.
142. Matthies, H., *Neurobiological aspects of learning and memory*. Annu Rev Psychol, 1989. **40**: p. 381-404.
143. Rolls, E.T., *Memory systems in the brain*. Annu Rev Psychol, 2000. **51**: p. 599-630.
144. Jaffard, R., et al., *Experimental dissociation of memory systems in mice: behavioral and neurochemical aspects*. Arch Gerontol Geriatr Suppl, 1989. **1**: p. 55-70.
145. Rendeiro, C., et al., *The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: from behaviour to underlying hippocampal mechanisms*. Genes Nutr, 2009. **4**(4): p. 251-70.
146. Dunn, A.J., *Neurochemistry of learning and memory: an evaluation of recent data*. Annu Rev Psychol, 1980. **31**: p. 343-90.
147. Sweatt, J.D., *Neuroscience. Epigenetics and cognitive aging*. Science, 2010. **328**(5979): p. 701-2.
148. Teyler, T.J. and P. DiScenna, *The role of hippocampus in memory: a hypothesis*. Neurosci Biobehav Rev, 1985. **9**(3): p. 377-89.
149. M., D., *How the brain works*. 2002, Massachusetts: Blackwell Sciences.
150. Nusbaum, N.J., *Aging and sensory senescence*. South Med J, 1999. **92**(3): p. 267-75.
151. Shaffer, S.W. and A.L. Harrison, *Aging of the somatosensory system: a translational perspective*. Phys Ther, 2007. **87**(2): p. 193-207.

152. Gkikas, I., D. Petratou, and N. Tavernarakis, *Longevity pathways and memory aging*. Front Genet, 2014. **5**: p. 155.
153. Kodama, E., et al., *Insulin-like signaling and the neural circuit for integrative behavior in C. elegans*. Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 2955-60.
154. Murakami, S., *Caenorhabditis elegans as a model system to study aging of learning and memory*. Mol Neurobiol, 2007. **35**(1): p. 85-94.
155. Murakami, H., et al., *Aging-dependent and -independent modulation of associative learning behavior by insulin/insulin-like growth factor-1 signal in Caenorhabditis elegans*. J Neurosci, 2005. **25**(47): p. 10894-904.
156. Kauffman, A.L., et al., *Insulin signaling and dietary restriction differentially influence the decline of learning and memory with age*. PLoS Biol, 2010. **8**(5): p. e1000372.
157. Mattison, J.A., et al., *Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 318-21.
158. Colman, R.J., et al., *Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys*. Science, 2009. **325**(5937): p. 201-4.
159. Adams, M.M., et al., *Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability*. Exp Neurol, 2008. **211**(1): p. 141-9.
160. Stein, G.M. and C.T. Murphy, *The Intersection of Aging, Longevity Pathways, and Learning and Memory in C. elegans*. Front Genet, 2012. **3**: p. 259.
161. Copeland, J.M., et al., *Extension of Drosophila life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain*. Curr Biol, 2009. **19**(19): p. 1591-8.
162. Ardiel, E.L. and C.H. Rankin, *An elegant mind: learning and memory in Caenorhabditis elegans*. Learn Mem, 2010. **17**(4): p. 191-201.
163. Lionaki, E., M. Markaki, and N. Tavernarakis, *Autophagy and ageing: insights from invertebrate model organisms*. Ageing Res Rev, 2013. **12**(1): p. 413-28.
164. Simonsen, A., et al., *Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult Drosophila*. Autophagy, 2008. **4**(2): p. 176-84.
165. Gupta, V.K., et al., *Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner*. Nat Neurosci, 2013. **16**(10): p. 1453-60.
166. 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.
167. 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.
168. Kenyon, C., et al., *A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type*. Nature, 1993. **366**(6454): p. 461-4.

169. 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.
170. Powers, R.W., 3rd, et al., *Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling*. *Genes Dev*, 2006. **20**(2): p. 174-84.
171. Huang, W., et al., *mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory*. *Nat Neurosci*, 2013. **16**(4): p. 441-8.
172. Kolosova, N.G., et al., *Rapamycin suppresses brain aging in senescence-accelerated OXYS rats*. *Aging (Albany NY)*, 2013. **5**(6): p. 474-84.
173. Halloran, J., et al., *Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin modulates cognitive and non-cognitive components of behavior throughout lifespan in mice*. *Neuroscience*, 2012. **223**: p. 102-13.
174. Lanni, C., et al., *Cognition enhancers between treating and doping the mind*. *Pharmacol Res*, 2008. **57**(3): p. 196-213.
175. Linssen, A.M., et al., *Cognitive effects of methylphenidate in healthy volunteers: a review of single dose studies*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014. **17**(6): p. 961-77.
176. Molino, I., et al., *Efficacy of memantine, donepezil, or their association in moderate-severe Alzheimer's disease: a review of clinical trials*. *ScientificWorldJournal*, 2013. **2013**: p. 925702.
177. Onofrj, M., et al., *Acetyl-L-carnitine: from a biological curiosity to a drug for the peripheral nervous system and beyond*. *Expert Rev Neurother*, 2013. **13**(8): p. 925-36.
178. Forstl, H., *[Neuro-enhancement. Brain doping]*. *Nervenarzt*, 2009. **80**(7): p. 840-6.
179. Wood, S., et al., *Psychostimulants and cognition: a continuum of behavioral and cognitive activation*. *Pharmacol Rev*, 2014. **66**(1): p. 193-221.
180. Mereu, M., et al., *The neurobiology of modafinil as an enhancer of cognitive performance and a potential treatment for substance use disorders*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013. **229**(3): p. 415-34.
181. Loke, W.H., *Effects of caffeine on mood and memory*. *Physiol Behav*, 1988. **44**(3): p. 367-72.
182. Hasenfratz, M. and K. Battig, *Acute dose-effect relationships of caffeine and mental performance, EEG, cardiovascular and subjective parameters*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1994. **114**(2): p. 281-7.
183. Oei, A. and L.R. Hartley, *The effects of caffeine and expectancy on attention and memory*. *Hum Psychopharmacol*, 2005. **20**(3): p. 193-202.
184. Potter, A.S. and P.A. Newhouse, *Acute nicotine improves cognitive deficits in young adults with attention-deficit/hyperactivity disorder*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008. **88**(4): p. 407-17.
185. Gomez-Pinilla, F. and K. Kostenkova, *The influence of diet and physical activity on brain repair and neurosurgical outcome*. *Surg Neurol*, 2008. **70**(4): p. 333-5; discussion 335-6.
186. Cao, D., et al., *Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function*. *J Neurochem*, 2009. **111**(2): p. 510-21.

187. Koshida, S., et al., *Stabilizing effects of eicosapentaenoic acid on Kv1.5 channel protein expressed in mammalian cells*. Eur J Pharmacol, 2009. **604**(1-3): p. 93-102.
188. Vines, A., et al., *The role of 5-HT(1)A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism*. Neuropharmacology, 2012. **62**(1): p. 184-91.
189. McNamara, R.K., et al., *Omega-3 fatty acid deficiency augments amphetamine-induced behavioral sensitization in adult DBA/2J mice: relationship with ventral striatum dopamine concentrations*. Synapse, 2008. **62**(10): p. 725-35.
190. Ramassamy, C., *Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets*. Eur J Pharmacol, 2006. **545**(1): p. 51-64.
191. Kim, Y.C., *Neuroprotective phenolics in medicinal plants*. Arch Pharm Res, 2010. **33**(10): p. 1611-32.
192. Kim, J., H.J. Lee, and K.W. Lee, *Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2010. **112**(6): p. 1415-30.
193. Perry, E. and M.J. Howes, *Medicinal plants and dementia therapy: herbal hopes for brain aging?* CNS Neurosci Ther, 2011. **17**(6): p. 683-98.
194. Solfrizzi, V., et al., *Diet and Alzheimer's disease risk factors or prevention: the current evidence*. Expert Rev Neurother, 2011. **11**(5): p. 677-708.
195. Liang, J., et al., *Neurocognitive correlates of obesity and obesity-related behaviors in children and adolescents*. Int J Obes (Lond), 2014. **38**(4): p. 494-506.
196. Burkhalter, T.M. and C.H. Hillman, *A narrative review of physical activity, nutrition, and obesity to cognition and scholastic performance across the human lifespan*. Adv Nutr, 2011. **2**(2): p. 201S-6S.
197. Elias, M.F., A.L. Goodell, and S.R. Waldstein, *Obesity, cognitive functioning and dementia: back to the future*. J Alzheimers Dis, 2012. **30 Suppl 2**: p. S113-25.
198. Lee, Y., et al., *Systematic review of health behavioral risks and cognitive health in older adults*. Int Psychogeriatr, 2010. **22**(2): p. 174-87.
199. Minor, R.K., J.W. Chang, and R. de Cabo, *Hungry for life: How the arcuate nucleus and neuropeptide Y may play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **299**(1): p. 79-88.
200. Fontan-Lozano, A., et al., *Caloric restriction increases learning consolidation and facilitates synaptic plasticity through mechanisms dependent on NR2B subunits of the NMDA receptor*. J Neurosci, 2007. **27**(38): p. 10185-95.
201. Stranahan, A.M., et al., *Pharmacomimetics of exercise: novel approaches for hippocampally-targeted neuroprotective agents*. Curr Med Chem, 2009. **16**(35): p. 4668-78.
202. Isaacs, K.R., et al., *Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning*. J Cereb Blood Flow Metab, 1992. **12**(1): p. 110-9.
203. Uda, M., et al., *Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat*. Brain Res, 2006. **1104**(1): p. 64-72.

204. 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.
205. Lindvall, O., et al., *Neurotrophins and brain insults*. Trends Neurosci, 1994. **17**(11): p. 490-6.
206. Bolton, M.M., A.J. Pittman, and D.C. Lo, *Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures*. J Neurosci, 2000. **20**(9): p. 3221-32.
207. Lo, D.C., *Neurotrophic factors and synaptic plasticity*. Neuron, 1995. **15**(5): p. 979-81.
208. Neeper, S.A., et al., *Exercise and brain neurotrophins*. Nature, 1995. **373**(6510): p. 109.
209. Garza, A.A., et al., *Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain*. Pharmacol Biochem Behav, 2004. **77**(2): p. 209-20.
210. Carro, E., et al., *Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain*. J Neurosci, 2000. **20**(8): p. 2926-33.
211. 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.
212. 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.
213. Blomstrand, E., et al., *Effect of sustained exercise on plasma amino acid concentrations and on 5-hydroxytryptamine metabolism in six different brain regions in the rat*. Acta Physiol Scand, 1989. **136**(3): p. 473-81.
214. Soares, J., et al., *Brain noradrenergic responses to footshock after chronic activity-wheel running*. Behav Neurosci, 1999. **113**(3): p. 558-66.
215. MacRae, P.G., et al., *Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolites in presenescent older rats*. Psychopharmacology (Berl), 1987. **92**(2): p. 236-40.
216. Fordyce, D.E. and R.P. Farrar, *Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning*. Behav Brain Res, 1991. **46**(2): p. 123-33.
217. Vaynman, S., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla, *Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity*. Neuroscience, 2003. **122**(3): p. 647-57.
218. Fernandez-Teruel, A., et al., *Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms?* Pharmacol Biochem Behav, 2002. **73**(1): p. 233-45.
219. van Praag, H., G. Kempermann, and F.H. Gage, *Neural consequences of environmental enrichment*. Nat Rev Neurosci, 2000. **1**(3): p. 191-8.

220. Sale, A., N. Berardi, and L. Maffei, *Enrich the environment to empower the brain*. Trends Neurosci, 2009. **32**(4): p. 233-9.
221. Rampon, C., et al., *Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12880-4.
222. Arnaiz, S.L., et al., *Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition*. Mol Aspects Med, 2004. **25**(1-2): p. 91-101.
223. Lores-Arnaiz, S., et al., *Extensive enriched environments protect old rats from the aging dependent impairment of spatial cognition, synaptic plasticity and nitric oxide production*. Behav Brain Res, 2006. **169**(2): p. 294-302.
224. Costa, D.A., et al., *Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms*. Neurobiol Aging, 2007. **28**(6): p. 831-44.
225. Miller, L.S., et al., *Environmental enrichment may protect against hippocampal atrophy in the chronic stages of traumatic brain injury*. Front Hum Neurosci, 2013. **7**: p. 506.
226. Sapolsky, R.M., *Potential behavioral modification of glucocorticoid damage to the hippocampus*. Behav Brain Res, 1993. **57**(2): p. 175-82.
227. Vogel, W., K.J. Kun, and E. Meshorer, *Effects of environmental enrichment and environmental deprivation on cognitive functioning in institutionalized retardates*. J Consult Psychol, 1967. **31**(6): p. 570-6.
228. Mandolesi, L., et al., *Environmental enrichment provides a cognitive reserve to be spent in the case of brain lesion*. J Alzheimers Dis, 2008. **15**(1): p. 11-28.
229. Wang, Y. and Z. Sun, *Current understanding of klotho*. Ageing Res Rev, 2009. **8**(1): p. 43-51.
230. Manya, H., K. Akasaka-Manya, and T. Endo, *Klotho protein deficiency and aging*. Geriatr Gerontol Int, 2010. **10 Suppl 1**: p. S80-7.
231. Martin, G.M., *Genetic syndromes in man with potential relevance to the pathobiology of aging*. Birth Defects Orig Artic Ser, 1978. **14**(1): p. 5-39.
232. Arking, D.E., et al., *Association of human aging with a functional variant of klotho*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 856-61.
233. Majumdar, V., D. Nagaraja, and R. Christopher, *Association of the functional KL-VS variant of Klotho gene with early-onset ischemic stroke*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **403**(3-4): p. 412-6.
234. Freathy, R.M., et al., *The functional "KL-VS" variant of KLOTHO is not associated with type 2 diabetes in 5028 UK Caucasians*. BMC Med Genet, 2006. **7**: p. 51.
235. Arking, D.E., et al., *Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity*. Circ Res, 2005. **96**(4): p. 412-8.
236. Invidia, L., et al., *The frequency of Klotho KL-VS polymorphism in a large Italian population, from young subjects to centenarians, suggests the presence of specific time windows for its effect*. Biogerontology, 2010. **11**(1): p. 67-73.

237. Nabeshima, Y., *Toward a better understanding of Klotho*. Sci Aging Knowledge Environ, 2006. **2006**(8): p. pe11.
238. Kamemori, M., et al., *Expression of Klotho protein in the inner ear*. Hear Res, 2002. **171**(1-2): p. 103-110.
239. Nabeshima, Y., *[Ectopic calcification in Klotho mice]*. Clin Calcium, 2002. **12**(8): p. 1114-7.
240. Duce, J.A., et al., *Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey*. Glia, 2008. **56**(1): p. 106-17.
241. Xiao, N.M., et al., *Klotho is a serum factor related to human aging*. Chin Med J (Engl), 2004. **117**(5): p. 742-7.
242. Aizawa, H., et al., *Downregulation of the Klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(3): p. 865-71.
243. Nagai, R., et al., *Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(5): p. 738-46.
244. Koh, N., et al., *Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(4): p. 1015-20.
245. Yamagishi, T., et al., *Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors*. Hypertens Res, 2001. **24**(6): p. 705-9.
246. Mitobe, M., et al., *Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line*. Nephron Exp Nephrol, 2005. **101**(2): p. e67-74.
247. Lanske, B. and M.S. Razzaque, *Premature aging in klotho mutant mice: cause or consequence?* Ageing Res Rev, 2007. **6**(1): p. 73-9.
248. Kuro-o, M., *Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence*. Biol Chem, 2008. **389**(3): p. 233-41.
249. Masuda, H., et al., *Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible klotho gene expression in klotho mutant mice*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(12): p. 1274-83.
250. Wang, Y., M. Kuro-o, and Z. Sun, *Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway*. Aging Cell, 2012. **11**(3): p. 410-7.
251. Li, B.S., et al., *[Klotho gene attenuates the progression of hypertension and heart damage in spontaneous hypertensive rats]*. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2012. **29**(6): p. 662-8.
252. Semba, R.D., et al., *Plasma klotho and cardiovascular disease in adults*. J Am Geriatr Soc, 2011. **59**(9): p. 1596-601.
253. Saito, Y., et al., *In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(2): p. 767-72.

254. Vadakke Madathil, S., et al., *Klotho deficiency disrupts hematopoietic stem cell development and erythropoiesis*. Am J Pathol, 2014. **184**(3): p. 827-41.
255. Nolan, V.G., et al., *Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia*. Br J Haematol, 2005. **128**(2): p. 266-72.
256. Wolf, I., et al., *Alteration in serum klotho levels in anorexia nervosa patients*. Clin Nutr, 2015.
257. Deng, M., et al., *Klotho gene delivery ameliorates renal hypertrophy and fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats by suppressing the Rho-associated coiled-coil kinase signaling pathway*. Mol Med Rep, 2015. **12**(1): p. 45-54.
258. Lin, Y. and Z. Sun, *In vivo pancreatic beta-cell-specific expression of antiaging gene Klotho: a novel approach for preserving beta-cells in type 2 diabetes*. Diabetes, 2015. **64**(4): p. 1444-58.
259. Fukumoto, S., *[Hormones and osteoporosis update. FGF23/Klotho and bone metabolism]*. Clin Calcium, 2009. **19**(7): p. 945-50.
260. Suzuki, H., et al., *Histological and elemental analyses of impaired bone mineralization in klotho-deficient mice*. J Anat, 2008. **212**(3): p. 275-85.
261. Hu, M.C., et al., *Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective*. Kidney Int, 2010. **78**(12): p. 1240-51.
262. Aiello, S. and M. Noris, *Klotho in acute kidney injury: biomarker, therapy, or a bit of both?* Kidney Int, 2010. **78**(12): p. 1208-10.
263. Shimamura, Y., et al., *Serum levels of soluble secreted alpha-Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis*. Clin Exp Nephrol, 2012. **16**(5): p. 722-9.
264. Castellano, G., et al., *Complement Modulation of Anti-Aging Factor Klotho in Ischemia/Reperfusion Injury and Delayed Graft Function*. Am J Transplant, 2015.
265. Zhu, Y., et al., *Klotho suppresses tumor progression via inhibiting PI3K/Akt/GSK3beta/Snail signaling in renal cell carcinoma*. Cancer Sci, 2013. **104**(6): p. 663-71.
266. Ko, G.J., et al., *The association of Klotho polymorphism with disease progression and mortality in IgA nephropathy*. Kidney Blood Press Res, 2012. **36**(1): p. 191-9.
267. Wang, L., et al., *Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer*. Am J Cancer Res, 2011. **1**(1): p. 111-119.
268. Xie, B., et al., *Restoration of klotho gene expression induces apoptosis and autophagy in gastric cancer cells: tumor suppressive role of klotho in gastric cancer*. Cancer Cell Int, 2013. **13**(1): p. 18.
269. Tang, X., et al., *Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/beta-catenin pathway in human hepatocellular carcinoma*. Lab Invest, 2015.
270. Shin, I.S., et al., *Role of Klotho, an antiaging protein, in pulmonary fibrosis*. Arch Toxicol, 2015. **89**(5): p. 785-95.
271. Lee, J., et al., *The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 109.

272. Camilli, T.C., et al., *Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011. **24**(1): p. 175-86.
273. Prather, A.A., et al., *Longevity factor klotho and chronic psychological stress*. *Transl Psychiatry*, 2015. **5**: p. e585.
274. Matsumura, Y., et al., *Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **242**(3): p. 626-30.
275. Shiraki-Iida, T., et al., *Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein*. *FEBS Lett*, 1998. **424**(1-2): p. 6-10.
276. Imura, A., et al., *Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane*. *FEBS Lett*, 2004. **565**(1-3): p. 143-7.
277. Chen, C.D., et al., *Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(50): p. 19796-801.
278. Chen, B., et al., *Inhibition of lung cancer cells growth, motility and induction of apoptosis by Klotho, a novel secreted Wnt antagonist, in a dose-dependent manner*. *Cancer Biol Ther*, 2012. **13**(12): p. 1221-8.
279. Chen, C.D., et al., *Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho*. *Biochemistry*, 2014. **53**(34): p. 5579-87.
280. Hu, M.C., M. Kuro-o, and O.W. Moe, *Secreted klotho and chronic kidney disease*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **728**: p. 126-57.
281. Semba, R.D., et al., *Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease*. *Neurosci Lett*, 2014. **558**: p. 37-40.
282. Jeong, S.J., et al., *Plasma klotho levels were inversely associated with subclinical carotid atherosclerosis in HIV-infected patients receiving combined antiretroviral therapy*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2013. **29**(12): p. 1575-81.
283. Izquierdo, M.C., et al., *Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27 Suppl 4**: p. iv6-10.
284. Dermaku-Sopjani, M., et al., *Downregulation of NaPi-IIa and NaPi-IIb Na-coupled phosphate transporters by coexpression of Klotho*. *Cell Physiol Biochem*, 2011. **28**(2): p. 251-8.
285. Imai, M., et al., *Klotho protein activates the PKC pathway in the kidney and testis and suppresses 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression*. *Endocrine*, 2004. **25**(3): p. 229-34.
286. Liu, S., A. Gupta, and L.D. Quarles, *Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone-kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2007. **16**(4): p. 329-35.
287. Stubbs, J., S. Liu, and L.D. Quarles, *Role of fibroblast growth factor 23 in phosphate homeostasis and pathogenesis of disordered mineral metabolism in chronic kidney disease*. *Semin Dial*, 2007. **20**(4): p. 302-8.

288. Quarles, L.D., *Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease*. Exp Cell Res, 2012. **318**(9): p. 1040-8.
289. Shimada, T., et al., *Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism*. J Clin Invest, 2004. **113**(4): p. 561-8.
290. Sitara, D., et al., *Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in Phex-deficient mice*. Matrix Biol, 2004. **23**(7): p. 421-32.
291. Tsujikawa, H., et al., *Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(12): p. 2393-403.
292. Yoshida, T., T. Fujimori, and Y. Nabeshima, *Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene*. Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 683-9.
293. Nabeshima, Y., *[Discovery of alpha-Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis]*. Clin Calcium, 2008. **18**(7): p. 923-34.
294. Hu, M.C., et al., *Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule*. FASEB J, 2010. **24**(9): p. 3438-50.
295. Kuro-o, M., *Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2006. **15**(4): p. 437-41.
296. Osuka, S. and M.S. Razzaque, *Can features of phosphate toxicity appear in normophosphatemia?* J Bone Miner Metab, 2012. **30**(1): p. 10-8.
297. Dermaku-Sopjani, M., et al., *Significance of the anti-aging protein Klotho*. Mol Membr Biol, 2013. **30**(8): p. 369-85.
298. Saito, Y., et al., *Klotho protein protects against endothelial dysfunction*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(2): p. 324-9.
299. Mitani, H., et al., *In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage*. Hypertension, 2002. **39**(4): p. 838-43.
300. Cha, S.K., et al., *Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(28): p. 9805-10.
301. Huang, C.L., *Regulation of ion channels by secreted Klotho*. Adv Exp Med Biol, 2012. **728**: p. 100-6.
302. Sopjani, M., et al., *Regulation of the Na⁺/K⁺ ATPase by Klotho*. FEBS Lett, 2011. **585**(12): p. 1759-64.
303. Zeldich, E., et al., *The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system*. J Biol Chem, 2014. **289**(35): p. 24700-15.
304. Reish, N.J., et al., *The age-regulating protein klotho is vital to sustain retinal function*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(10): p. 6675-85.
305. Utsugi, T., et al., *Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging*. Metabolism, 2000. **49**(9): p. 1118-23.

306. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
307. Chiribau, C.B., et al., *FOXO3A regulates peroxiredoxin III expression in human cardiac fibroblasts*. J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8211-7.
308. Russell, S.J. and C.R. Kahn, *Endocrine regulation of ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 681-91.
309. Shimada, T., et al., *Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse*. Circulation, 2004. **110**(9): p. 1148-55.
310. Tohyama, O., et al., *Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9777-84.
311. Liu, H., et al., *Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging*. Science, 2007. **317**(5839): p. 803-6.
312. Kirstetter, P., et al., *Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block*. Nat Immunol, 2006. **7**(10): p. 1048-56.
313. Nagai, T., et al., *[Cognition impairment in the klotho gene mutant mice and oxidative stress]*. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi, 2003. **23**(5): p. 211-7.
314. Clinton, S.M., et al., *Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood*. Brain Res, 2013. **1527**: p. 1-14.
315. Nabeshima, Y. and H. Imura, *alpha-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis*. Am J Nephrol, 2008. **28**(3): p. 455-64.
316. Allen Institute for Brain Science. [cited agost 2015].
317. Nagai, T., et al., *Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress*. FASEB J, 2003. **17**(1): p. 50-2.
318. Wang, C.J., et al., *Protective effect of selaginellin on glutamate-induced cytotoxicity and apoptosis in differentiated PC12 cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2010. **381**(1): p. 73-81.
319. Teocchi, M.A., et al., *Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 53.
320. Banerjee, S., et al., *Klotho ameliorates chemically induced endoplasmic reticulum (ER) stress signaling*. Cell Physiol Biochem, 2013. **31**(4-5): p. 659-72.
321. Kuang, X., et al., *Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide in an Alzheimer's disease mouse model*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(1): p. 169-78.
322. Park, S.J., et al., *Inactivation of JAK2/STAT3 signaling axis and downregulation of M1 mAChR cause cognitive impairment in klotho mutant mice, a genetic model of aging*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(8): p. 1426-37.
323. Tata, A.M., et al., *Cholinergic system dysfunction and neurodegenerative diseases: cause or effect?* CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014. **13**(7): p. 1294-303.
324. Kosakai, A., et al., *Degeneration of mesencephalic dopaminergic neurons in klotho mouse related to vitamin D exposure*. Brain Res, 2011. **1382**: p. 109-17.

325. de Lau, L.M. and M.M. Breteler, *Epidemiology of Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2006. **5**(6): p. 525-35.
326. Stark, A.K. and B. Pakkenberg, *Histological changes of the dopaminergic nigrostriatal system in aging*. *Cell Tissue Res*, 2004. **318**(1): p. 81-92.
327. Almilaji, A., et al., *Klotho sensitivity of the neuronal excitatory amino acid transporters EAAT3 and EAAT4*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e70988.
328. Nieoullon, A., et al., *The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse?* *J Neurochem*, 2006. **98**(4): p. 1007-18.
329. Huang, Y.H., et al., *Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons*. *J Neurosci*, 2004. **24**(19): p. 4551-9.
330. Takayasu, Y., et al., *Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell synapses*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009. **197**(1): p. 1-12.
331. Huerta, I., et al., *Expression of excitatory amino acid transporter interacting protein transcripts in the thalamus in schizophrenia*. *Synapse*, 2006. **59**(7): p. 394-402.
332. Meldrum, B.S., M.T. Akbar, and A.G. Chapman, *Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy*. *Epilepsy Res*, 1999. **36**(2-3): p. 189-204.
333. Gold, P.W., J. Licinio, and M.G. Pavlatou, *Pathological parainflammation and endoplasmic reticulum stress in depression: potential translational targets through the CNS insulin, klotho and PPAR-gamma systems*. *Mol Psychiatry*, 2013. **18**(2): p. 154-65.
334. Hinman, J.D. and C.R. Abraham, *What's behind the decline? The role of white matter in brain aging*. *Neurochem Res*, 2007. **32**(12): p. 2023-31.
335. Chen, C.D., et al., *The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS*. *J Neurosci*, 2013. **33**(5): p. 1927-39.
336. Deary, I.J., et al., *KLOTHO genotype and cognitive ability in childhood and old age in the same individuals*. *Neurosci Lett*, 2005. **378**(1): p. 22-7.
337. Dubal, D.B., et al., *Life extension factor klotho enhances cognition*. *Cell Rep*, 2014. **7**(4): p. 1065-76.
338. Chateau, M.T., et al., *Klotho interferes with a novel FGF-signalling pathway and insulin/Igf-like signalling to improve longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans**. *Aging (Albany NY)*, 2010. **2**(9): p. 567-81.
339. Nomura, T., et al., *Prolongation of life span in the accelerated aging klotho mouse model, by low-dose-rate continuous gamma irradiation*. *Radiat Res*, 2013. **179**(6): p. 717-24.
340. Tucker Zhou, T.B., et al., *Biochemical and functional characterization of the klotho-VS polymorphism implicated in aging and disease risk*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(51): p. 36302-11.
341. Hsieh, C.C., et al., *The ASK1-Signalosome regulates p38 MAPK activity in response to levels of endogenous oxidative stress in the Klotho mouse models of aging*. *Aging (Albany NY)*, 2010. **2**(9): p. 597-611.

342. Tataranni, T., et al., *Rapamycin-induced hypophosphatemia and insulin resistance are associated with mTORC2 activation and Klotho expression*. Am J Transplant, 2011. **11**(8): p. 1656-64.
343. Bove, J., M. Martinez-Vicente, and M. Vila, *Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(8): p. 437-52.
344. Kay, M.A., *State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(5): p. 316-28.
345. Berns, K.I. and C. Giraud, *Biology of adeno-associated virus*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **218**: p. 1-23.
346. Kocot, F.J., et al., *Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(1): p. 215-9.
347. Berns, K.I., *Parvovirus replication*. Microbiol Rev, 1990. **54**(3): p. 316-29.
348. Ni, T.H., et al., *Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2777-87.
349. Linden, R.M. and K.I. Berns, *Molecular biology of adeno-associated viruses*. Contrib Microbiol, 2000. **4**: p. 68-84.
350. Blacklow, N.R., M.D. Hoggan, and W.P. Rowe, *Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses*. J Natl Cancer Inst, 1968. **40**(2): p. 319-27.
351. Samulski, R.J., et al., *Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 2077-81.
352. Laughlin, C.A., et al., *Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids*. Gene, 1983. **23**(1): p. 65-73.
353. Wright, J.F., et al., *Recombinant adeno-associated virus: formulation challenges and strategies for a gene therapy vector*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003. **6**(2): p. 174-8.
354. Masat, E., G. Pavani, and F. Mingozzi, *Humoral immunity to AAV vectors in gene therapy: challenges and potential solutions*. Discov Med, 2013. **15**(85): p. 379-89.
355. Nakai, H., et al., *AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice*. Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 297-302.
356. Mori, S., et al., *Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein*. Virology, 2004. **330**(2): p. 375-83.
357. Bartlett, J.S., R.J. Samulski, and T.J. McCown, *Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(8): p. 1181-6.
358. Fischer, A.C., et al., *Successful transgene expression with serial doses of aerosolized rAAV2 vectors in rhesus macaques*. Mol Ther, 2003. **8**(6): p. 918-26.
359. Nicklin, S.A., et al., *Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells*. Mol Ther, 2001. **4**(3): p. 174-81.
360. Shi, W. and J.S. Bartlett, *RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism*. Mol Ther, 2003. **7**(4): p. 515-25.

361. Manno, C.S., et al., *AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B*. *Blood*, 2003. **101**(8): p. 2963-72.
362. Richter, M., et al., *Adeno-associated virus vector transduction of vascular smooth muscle cells in vivo*. *Physiol Genomics*, 2000. **2**(3): p. 117-27.
363. Koeberl, D.D., et al., *Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(4): p. 1426-31.
364. Halbert, C.L., J.M. Allen, and A.D. Miller, *Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors*. *J Virol*, 2001. **75**(14): p. 6615-24.
365. Chen, S., et al., *Efficient transduction of vascular endothelial cells with recombinant adeno-associated virus serotype 1 and 5 vectors*. *Hum Gene Ther*, 2005. **16**(2): p. 235-47.
366. Conlon, T.J., et al., *Efficient hepatic delivery and expression from a recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped alpha1-antitrypsin vector*. *Mol Ther*, 2005. **12**(5): p. 867-75.
367. Bell, P., et al., *Evaluation of adeno-associated viral vectors for liver-directed gene transfer in dogs*. *Hum Gene Ther*, 2011. **22**(8): p. 985-97.
368. Wang, L., et al., *AAV8-mediated hepatic gene transfer in infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)*. *Mol Ther*, 2011. **19**(11): p. 2012-20.
369. Ortinski, P.I., et al., *Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(5): p. 584-91.
370. Kaludov, N., et al., *Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity*. *J Virol*, 2001. **75**(15): p. 6884-93.
371. Di Pasquale, G., et al., *Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction*. *Nat Med*, 2003. **9**(10): p. 1306-12.
372. Zincarelli, C., et al., *Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection*. *Mol Ther*, 2008. **16**(6): p. 1073-80.
373. Lipshutz, G.S., et al., *In utero delivery of adeno-associated viral vectors: intraperitoneal gene transfer produces long-term expression*. *Mol Ther*, 2001. **3**(3): p. 284-92.
374. Wu, P., et al., *Adeno-associated virus vector-mediated transgene integration into neurons and other nondividing cell targets*. *J Virol*, 1998. **72**(7): p. 5919-26.
375. Wang, C., et al., *Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain*. *Gene Ther*, 2003. **10**(17): p. 1528-34.
376. Davidson, B.L., et al., *Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(7): p. 3428-32.

377. McCarty, D.M., et al., *Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIB mice*. Gene Ther, 2009. **16**(11): p. 1340-52.
378. Nguyen, J.B., et al., *Convection-enhanced delivery of AAV-2 combined with heparin increases TK gene transfer in the rat brain*. Neuroreport, 2001. **12**(9): p. 1961-4.
379. Cearley, C.N. and J.H. Wolfe, *Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain*. Mol Ther, 2006. **13**(3): p. 528-37.
380. Murlidharan, G., R.J. Samulski, and A. Asokan, *Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system*. Front Mol Neurosci, 2014. **7**: p. 76.
381. McCown, T.J., et al., *Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector*. Brain Res, 1996. **713**(1-2): p. 99-107.
382. Shevtsova, Z., et al., *Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo*. Exp Physiol, 2005. **90**(1): p. 53-9.
383. Klein, R.L., et al., *Dose and promoter effects of adeno-associated viral vector for green fluorescent protein expression in the rat brain*. Exp Neurol, 2002. **176**(1): p. 66-74.
384. Klein, R.L., et al., *Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors*. Exp Neurol, 1998. **150**(2): p. 183-94.
385. Peel, A.L. and R.L. Klein, *Adeno-associated virus vectors: activity and applications in the CNS*. J Neurosci Methods, 2000. **98**(2): p. 95-104.
386. Klein, R.L., et al., *AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method*. Mol Ther, 2008. **16**(1): p. 89-96.
387. Parra-Damas, A., et al., *Crtc1 activates a transcriptional program deregulated at early Alzheimer's disease-related stages*. J Neurosci, 2014. **34**(17): p. 5776-87.
388. Yang, B., et al., *Global CNS transduction of adult mice by intravenously delivered rAAVrh.8 and rAAVrh.10 and nonhuman primates by rAAVrh.10*. Mol Ther, 2014. **22**(7): p. 1299-309.
389. Thwaite, R., et al., *AAVrh.10 immunogenicity in mice and humans. Relevance of antibody cross-reactivity in human gene therapy*. Gene Ther, 2015. **22**(2): p. 196-201.
390. Chiuchiolo, M.J., et al., *Intraleural administration of an AAVrh.10 vector coding for human alpha1-antitrypsin for the treatment of alpha1-antitrypsin deficiency*. Hum Gene Ther Clin Dev, 2013. **24**(4): p. 161-73.
391. Calcedo, R., et al., *Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents*. Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(9): p. 1586-8.
392. Sondhi, D., et al., *Enhanced survival of the LINCL mouse following CLN2 gene transfer using the rh.10 rhesus macaque-derived adeno-associated virus vector*. Mol Ther, 2007. **15**(3): p. 481-91.
393. Riviere, C., O. Danos, and A.M. Douar, *Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice*. Gene Ther, 2006. **13**(17): p. 1300-8.

394. University, W.M.C.o.C. *AAVRh.10 Administered to Children With Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis With Uncommon Genotypes or Moderate/Severe Impairment*. 2015 [cited 2015].
395. Vines, D.J. and M.J. Warburton, *Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase I*. FEBS Lett, 1999. **443**(2): p. 131-5.
396. Passini, M.A., et al., *Intracranial delivery of CLN2 reduces brain pathology in a mouse model of classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis*. J Neurosci, 2006. **26**(5): p. 1334-42.
397. Grimm, D. and M.A. Kay, *RNAi and gene therapy: a mutual attraction*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007: p. 473-81.
398. Grimm, D., K. Pandey, and M.A. Kay, *Adeno-associated virus vectors for short hairpin RNA expression*. Methods Enzymol, 2005. **392**: p. 381-405.
399. McIntyre, G.J. and G.C. Fanning, *Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors*. BMC Biotechnol, 2006. **6**: p. 1.
400. Chen, C.C., et al., *Use of RNA interference to modulate liver adenoma development in a murine model transgenic for hepatitis B virus*. Gene Ther, 2012. **19**(1): p. 25-33.
401. Chen, C.C., et al., *Long-term inhibition of hepatitis B virus in transgenic mice by double-stranded adeno-associated virus 8-delivered short hairpin RNA*. Gene Ther, 2007. **14**(1): p. 11-9.
402. de Solis, C.A., et al., *Viral delivery of shRNA to amygdala neurons leads to neurotoxicity and deficits in Pavlovian fear conditioning*. Neurobiol Learn Mem, 2015. **124**: p. 34-47.
403. Mineur, Y.S., S.R. Taylor, and M.R. Picciotto, *Calcineurin downregulation in the amygdala is sufficient to induce anxiety-like and depression-like behaviors in C57BL/6J male mice*. Biol Psychiatry, 2014. **75**(12): p. 991-8.
404. Shiozaki, M., et al., *Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice*. Neuroscience, 2008. **152**(4): p. 924-41.
405. Foster, P.P., K.P. Rosenblatt, and R.O. Kuljis, *Exercise-induced cognitive plasticity, implications for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. Front Neurol, 2011. **2**: p. 28.
406. Phelps, M., et al., *Decline in muscle strength and running endurance in klotho deficient C57BL/6 mice*. Biogerontology, 2013. **14**(6): p. 729-39.
407. Stanford, S.C., *The Open Field Test: reinventing the wheel*. J Psychopharmacol, 2007. **21**(2): p. 134-5.
408. Fahlstrom, A., Q. Yu, and B. Ulfhake, *Behavioral changes in aging female C57BL/6 mice*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(10): p. 1868-80.
409. Alvarez, J.A. and E. Emory, *Executive function and the frontal lobes: a meta-analytic review*. Neuropsychol Rev, 2006. **16**(1): p. 17-42.
410. Goldman-Rakic, P.S., *Topography of cognition: parallel distributed networks in primate association cortex*. Annu Rev Neurosci, 1988. **11**: p. 137-56.
411. Middeldorp, J. and E.M. Hol, *GFAP in health and disease*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(3): p. 421-43.

412. Kennedy, B.K. and J.K. Pennypacker, *Drugs that modulate aging: the promising yet difficult path ahead*. *Transl Res*, 2014. **163**(5): p. 456-65.
413. Paul, S.L., V.K. Srikanth, and A.G. Thrift, *The large and growing burden of stroke*. *Curr Drug Targets*, 2007. **8**(7): p. 786-93.
414. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(5): p. 1047-53.
415. Bhattacharya, J., K. Choudhry, and D. Lakdawalla, *Chronic disease and severe disability among working-age populations*. *Med Care*, 2008. **46**(1): p. 92-100.
416. Christensen, K., et al., *Ageing populations: the challenges ahead*. *Lancet*, 2009. **374**(9696): p. 1196-208.
417. Ma, L., Y. Li, and M. Feng, *Positive emotion and cardiovascular disease in elderly people*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(5): p. 6682-6.
418. Joshi, S., *Vitamin Supplementation in the Elderly*. *Clin Geriatr Med*, 2015. **31**(3): p. 355-66.
419. Gradinaru, D., et al., *Oxidized LDL and NO synthesis-Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing*. *Mech Ageing Dev*, 2015.
420. Li, X., D. Song, and S.X. Leng, *Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment*. *Clin Interv Aging*, 2015. **10**: p. 549-60.
421. Cowen, T., *Selective vulnerability in adult and ageing mammalian neurons*. *Auton Neurosci*, 2002. **96**(1): p. 20-4.
422. Jiang, S., et al., *M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease*. *Neurosci Bull*, 2014. **30**(2): p. 295-307.
423. Gatzinsky, K.P., et al., *The role of NGF uptake in selective vulnerability to cell death in ageing sympathetic neurons*. *Eur J Neurosci*, 2004. **20**(11): p. 2848-56.
424. Mattson, M.P., et al., *Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **893**: p. 154-75.
425. Wolkow, C.A., *Life span: getting the signal from the nervous system*. *Trends Neurosci*, 2002. **25**(4): p. 212-6.
426. Shen, L.L., Y. Wang, and D.Y. Wang, *Involvement of genes required for synaptic function in aging control in C. elegans*. *Neurosci Bull*, 2007. **23**(1): p. 21-9.
427. Flicker, L., *Modifiable lifestyle risk factors for Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2010. **20**(3): p. 803-11.
428. Flicker, L., *Life style interventions to reduce the risk of dementia*. *Maturitas*, 2009. **63**(4): p. 319-22.
429. Fillit, H., et al., *Cardiovascular risk factors and dementia*. *Am J Geriatr Pharmacother*, 2008. **6**(2): p. 100-18.
430. Akintola, A.A. and D. van Heemst, *Insulin, aging, and the brain: mechanisms and implications*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015. **6**: p. 13.

431. 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.
432. Yehuda, S., et al., *The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(5): p. 843-53.
433. Longo, V.D., *Linking sirtuins, IGF-I signaling, and starvation*. Exp Gerontol, 2009. **44**(1-2): p. 70-4.
434. Tang, B.L. and C.E. Chua, *SIRT1 and neuronal diseases*. Mol Aspects Med, 2008. **29**(3): p. 187-200.
435. Ng, F., L. Wijaya, and B.L. Tang, *SIRT1 in the brain-connections with aging-associated disorders and lifespan*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 64.
436. Libert, S., D. Cohen, and L. Guarente, *Neurogenesis directed by Sirt1*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(4): p. 373-4.
437. Pallas, M., et al., *Modulation of sirtuins: new targets for antiageing*. Recent Pat CNS Drug Discov, 2008. **3**(1): p. 61-9.
438. Kim, D., et al., *SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis*. EMBO J, 2007. **26**(13): p. 3169-79.
439. Li, W., et al., *Sirtuin 2, a mammalian homolog of yeast silent information regulator-2 longevity regulator, is an oligodendroglial protein that decelerates cell differentiation through deacetylating alpha-tubulin*. J Neurosci, 2007. **27**(10): p. 2606-16.
440. Imura, A., et al., *alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis*. Science, 2007. **316**(5831): p. 1615-8.
441. Feng, Z. and J.T. Zhang, *[Central nervous system calcium homeostasis imbalance and brain aging]*. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 2000. **31**(2): p. 102-8.
442. Phillips, C., et al., *Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 170.
443. Bloch, L., et al., *Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase*. FEBS Lett, 2009. **583**(19): p. 3221-4.
444. Yamazaki, Y., et al., *Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **398**(3): p. 513-8.
445. Ohata, Y., et al., *Circulating levels of soluble alpha-Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(6): p. E943-7.
446. Forster, R.E., et al., *Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **414**(3): p. 557-62.
447. Lu, L., et al., *Klotho expression in epithelial ovarian cancer and its association with insulin-like growth factors and disease progression*. Cancer Invest, 2008. **26**(2): p. 185-92.
448. King, G.D., D.L. Rosene, and C.R. Abraham, *Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey*. Age (Dordr), 2012. **34**(6): p. 1405-19.

449. Luo, M., et al., *Population Difference in the Associations of KLOTH Promoter Methylation with Mild Cognitive Impairment in Xinjiang Uygur and Han Populations*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132156.
450. Kuro-o, M., *Klotho*. Pflugers Arch, 2010. **459**(2): p. 333-43.
451. Kato, Y., et al., *Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(2): p. 597-602.
452. Yokoyama, K., et al., *Serum soluble alpha-klotho in hemodialysis patients*. Clin Nephrol, 2012. **77**(5): p. 347-51.
453. Chen, C.D., et al., *The anti-aging and tumor suppressor protein Klotho enhances differentiation of a human oligodendrocytic hybrid cell line*. J Mol Neurosci, 2015. **55**(1): p. 76-90.
454. Dubal, D.B., et al., *Life extension factor klotho prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice*. J Neurosci, 2015. **35**(6): p. 2358-71.
455. Maltare, A., et al., *Development and characterization of monoclonal antibodies to detect klotho*. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 2014. **33**(6): p. 420-7.
456. Li, S.A., et al., *Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice*. Cell Struct Funct, 2004. **29**(4): p. 91-9.
457. Li, H., et al., *Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(40): p. 17362-7.
458. Oddo, S., et al., *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction*. Neuron, 2003. **39**(3): p. 409-21.
459. Barnes, J.N., *Exercise, cognitive function, and aging*. Adv Physiol Educ, 2015. **39**(2): p. 55-62.
460. Larson, E.B., et al., *Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older*. Ann Intern Med, 2006. **144**(2): p. 73-81.
461. Paillard, T., *Preventive effects of regular physical exercise against cognitive decline and the risk of dementia with age advancement*. Sports Med Open, 2015. **1**(1): p. 4.
462. Zhang, H., et al., *Klotho is a target gene of PPAR-gamma*. Kidney Int, 2008. **74**(6): p. 732-9.
463. Lim, K., et al., *Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23*. Circulation, 2012. **125**(18): p. 2243-55.
464. Kawamura, T., et al., *Regulation of skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by exercise and angiotensin-converting enzyme inhibition in fructose-fed hypertensive rats*. Hypertens Res, 2004. **27**(1): p. 61-70.
465. Ciampone, S., et al., *Long-term exercise attenuates blood pressure responsiveness and modulates kidney angiotensin II signalling and urinary sodium excretion in SHR*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2011. **12**(4): p. 394-403.
466. Asghar, M., L. George, and M.F. Lokhandwala, *Exercise decreases oxidative stress and inflammation and restores renal dopamine D1 receptor function in old rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(3): p. F914-9.

467. Matsubara, T., et al., *Aerobic exercise training increases plasma Klotho levels and reduces arterial stiffness in postmenopausal women*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **306**(3): p. H348-55.
468. Stranahan, A.M., D. Khalil, and E. Gould, *Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex*. *Hippocampus*, 2007. **17**(11): p. 1017-22.
469. Brockett, A.T., E.A. LaMarca, and E. Gould, *Physical exercise enhances cognitive flexibility as well as astrocytic and synaptic markers in the medial prefrontal cortex*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0124859.
470. Nagasu, H., et al., *Overexpression of klotho protein modulates uninephrectomy-induced compensatory renal hypertrophy by suppressing IGF-I signals*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **407**(1): p. 39-43.
471. Carpinelli, M.R., A.K. Wise, and R.A. Burt, *Vitamin D-deficient diet rescues hearing loss in Klotho mice*. *Hear Res*, 2011. **275**(1-2): p. 105-9.
472. Borst, O., et al., *1,25(OH)₂ vitamin D₃-dependent inhibition of platelet Ca²⁺ signaling and thrombus formation in klotho-deficient mice*. *FASEB J*, 2014. **28**(5): p. 2108-19.
473. Wang, Y. and Z. Sun, *Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage*. *Hypertension*, 2009. **54**(4): p. 810-7.
474. Wang, X. and Z. Sun, *RNAi silencing of brain klotho potentiates cold-induced elevation of blood pressure via the endothelin pathway*. *Physiol Genomics*, 2010. **41**(2): p. 120-6.
475. Rafi, M.A., et al., *Long-term Improvements in Lifespan and Pathology in CNS and PNS After BMT Plus One Intravenous Injection of AAVrh10-GALC in Twitcher Mice*. *Mol Ther*, 2015.
476. Hordeaux, J., et al., *Efficient central nervous system AAVrh10-mediated intrathecal gene transfer in adult and neonate rats*. *Gene Ther*, 2015. **22**(4): p. 316-24.
477. Frankland, P.W. and B. Bontempi, *The organization of recent and remote memories*. *Nat Rev Neurosci*, 2005. **6**(2): p. 119-30.
478. Wang, S.H. and R.G. Morris, *Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation*. *Annu Rev Psychol*, 2010. **61**: p. 49-79, C1-4.
479. Yashiro, K. and B.D. Philpot, *Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity*. *Neuropharmacology*, 2008. **55**(7): p. 1081-94.
480. Segawa, H., et al., *Correlation between hyperphosphatemia and type II Na-Pi cotransporter activity in klotho mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **292**(2): p. F769-79.
481. Urakawa, I., et al., *Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 770-4.
482. Shardell, M., et al., *Plasma Klotho and Cognitive Decline in Older Adults: Findings From the InCHIANTI Study*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2015.
483. Baxter, M.G. and M. Gallagher, *Neurobiological substrates of behavioral decline: models and data analytic strategies for individual differences in aging*. *Neurobiol Aging*, 1996. **17**(3): p. 491-5.
484. Markowska, A.L., et al., *Acetyl-L-carnitine. 1: Effects on mortality, pathology and sensory-motor performance in aging rats*. *Neurobiol Aging*, 1990. **11**(5): p. 491-8.

485. Barnes, C.A., et al., *Acetyl-L-carnitine. 2: Effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes*. Neurobiol Aging, 1990. **11**(5): p. 499-506.
486. Rodefer, J.S. and M.G. Baxter, *Neuropsychology of Cognitive Aging in Rodents*, in *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*, D.R. Riddle, Editor. 2007: Boca Raton (FL).
487. Amitani, M., et al., *Plasma klotho levels decrease in both anorexia nervosa and obesity*. Nutrition, 2013. **29**(9): p. 1106-9.
488. Abramovitz, L., et al., *KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4254-66.
489. Simon, P., R. Dupuis, and J. Costentin, *Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions*. Behav Brain Res, 1994. **61**(1): p. 59-64.
490. Gage, F.H., S.B. Dunnett, and A. Bjorklund, *Spatial learning and motor deficits in aged rats*. Neurobiol Aging, 1984. **5**(1): p. 43-8.
491. Lamberty, Y. and A.J. Gower, *Age-related changes in spontaneous behavior and learning in NMRI mice from middle to old age*. Physiol Behav, 1992. **51**(1): p. 81-8.
492. Lhotellier, L. and C. Cohen-Salmon, *Genetics and senescence. I. Age-related changes in activity and exploration in three inbred strains of mice*. Physiol Behav, 1989. **45**(3): p. 491-3.
493. Bryant, C., H. Jackson, and D. Ames, *The prevalence of anxiety in older adults: methodological issues and a review of the literature*. J Affect Disord, 2008. **109**(3): p. 233-50.
494. Byers, A.L., et al., *High occurrence of mood and anxiety disorders among older adults: The National Comorbidity Survey Replication*. Arch Gen Psychiatry, 2010. **67**(5): p. 489-96.
495. Frick, K.M., et al., *Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex*. Neuroscience, 2000. **95**(1): p. 293-307.
496. Gerlai, R., *Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems*. Behav Brain Res, 2001. **125**(1-2): p. 269-77.
497. Tang, Y.P., et al., *Genetic enhancement of learning and memory in mice*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 63-9.
498. Cao, X., et al., *Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(6): p. 1815-22.
499. Wang, H., et al., *A specialized NMDA receptor function in layer 5 recurrent microcircuitry of the adult rat prefrontal cortex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16791-6.
500. Wu, X., et al., *C-terminal tail of FGF19 determines its specificity toward Klotho co-receptors*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33304-9.
501. Piedra, J., et al., *Development of a rapid, robust, and universal picogreen-based method to titer adeno-associated vectors*. Hum Gene Ther Methods, 2015. **26**(1): p. 35-42.
502. Gimenez-Llort, L., et al., *Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(3): p. 547-50.