



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD: ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y
NEUROCIENCIAS

**“Efecto del ejercicio a corto y a largo plazo en la
neurogénesis hipocampal”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B Fany Ieraldini Gutiérrez Jasso

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Neurobiología Celular y Molecular

Directora de la Tesis: Dra. María del Carmen Vivar Estudillo

Ciudad de México

Diciembre, 2017

“Mientras nuestro cerebro sea un arcano, el Universo, reflejo de su estructura, será también un misterio”

— Santiago Ramón y Cajal

Agradecimientos

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por el apoyo para asistencia a congresos que me permitió presentar mi proyecto en el LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C., en Monterrey, Nuevo León, así como el apoyo para la obtención de grado.

Al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV.

Al CONACyT por la beca de posgrado 587986 otorgada.

A la Dra. María del Carmen Vivar Estudillo por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto de investigación en su laboratorio de Neurogénesis y Neuroplasticidad; por su tiempo, dedicación y enseñanzas académicas.

A la M. en C. Socorro Islas Mendoza por su orientación profesional durante mi estancia de investigación en el laboratorio de Neurogénesis y Neuroplasticidad.

A Armando Sandoval por el apoyo profesional.

A la UPEAL, por el apoyo con el protocolo de investigación relacionado con la ciencia de los animales de laboratorio. Así mismo, al MVZ. Rafael Leyva Muñoz y al MVZ. Benjamín Chávez Álvarez por su apoyo profesional.

Al Dr. Jorge Aceves Ruíz y al Dr. José Segovia Vila por formar parte de mi comité tutorial y por sus valiosas contribuciones para la realización de esta tesis.

Agradecimientos a título personal

A Kat, por su constante e incondicional apoyo, que hace posible alcanzar mis metas.

A Ingrid, por su apoyo moral y por creer en mí.

Al Dr. Ismael, a la Dra. Malu y a la Dra. Francis por toda la confianza, el cariño y sus valiosos consejos que influyeron en mi persona.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Gerardo, Ernesto, Vero, Ana, Cris, Belén, Víctor, Shan, Carmen, Vlad y Gaby, por su apoyo académico y anímico sin el cual hubiese sido más difícil concluir con este trabajo.

Índice

Abreviaturas.....	7
Resumen.....	8
Abstract.....	9
1. Introducción.....	10
1.1 Envejecimiento poblacional.....	10
1.1.2 Patologías aunadas al envejecimiento.....	11
1.2 Efecto del ejercicio para contrarrestar el deterioro cognitivo.....	13
1.3 Efecto del ejercicio en el hipocampo.....	14
1.4 Estructura y función del hipocampo.....	15
1.4.1 Neurogénesis hipocampal.....	17
1.4.2 Métodos para medir la neurogénesis.....	19
1.4.3 Fase de proliferación.....	22
1.4.4 Fase de diferenciación y fase de migración.....	22
1.4.5 Fase de sobrevivencia.....	23
1.4.6 Fase de maduración.....	23
1.5 Neurogénesis hipocampal y ejercicio.....	25
1.6 Neurogénesis hipocampal y envejecimiento.....	26
1.7 Justificación.....	28
2. Hipótesis.....	29
3. Objetivo general.....	29
4. Metodología.....	30
4.1 Animales y condiciones de habituación.....	30
4.2 Inyección de BrdU.....	30
4.3 Perfusión.....	30

4.4 Inmunohistoquímica.....	31
4.5 Inmunofluorescencia.....	31
4.6 Análisis morfológico de células diferenciadas que expresan doblecortina	32
4.7 Análisis estadístico	32
5. Resultados.....	33
5.1 Los ratones de la cepa C57Bl/6 corren por periodos prolongados de tiempo.....	33
5.2 El ejercicio evita el incremento del peso corporal.	35
5.3 El ejercicio no modifica el volumen cerebral pero sí la proporción cerebro – peso corporal.....	37
5.4 La diferenciación celular inducida por el ejercicio a largo plazo es menor que el inducido por el ejercicio a corto plazo.	39
5.5.1 El ejercicio incrementa los niveles de neurogénesis, sin embargo, estos niveles no se mantienen a través de periodos largos de ejercicio.	43
5.5.2 El efecto neurogénico del ejercicio es en la región dorsal, aunque no en la misma magnitud entre periodos cortos y largos de ejercicio. ...	47
5.6 El ejercicio incrementa el porcentaje de células nuevas con fenotipo neuronal.....	49
5.7 El incremento de la neurogénesis es independiente de la distancia....	50
6. Discusión.....	52
7. Conclusión.....	59
8. Perspectivas a futuro.....	60
9. Bibliografía.....	61

Abreviaturas

ADN Ácido desoxirribonucleico	GFP Proteína verde fluorescente
BDNF Factor neurotrófico derivado del cerebro	IGF-1 Factor de crecimiento insulínico tipo 1
BMP Proteínas morfogénicas del hueso	IL-6 Interleucina 6
BO Bulbo olfatorio	LTP Potenciación a largo plazo
BrdU 5-bromo-2-desoxiuridina	NeuN Proteína nuclear neuro-específica
CCG Capa de células granulares	NGF Factor de crecimiento nervioso
CE Corteza entorrinal	NSPCs Células progenitoras neurales
DAB 3,3-Diaminobencidina	PSA-NCAM Molécula de adhesión celular neural en su forma embrionica polisialilada
DAPI 4',6-diamino-2-fenilindol	PSD-95 Proteína de densidad post-sináptica 95
DCX Doble cortina	Shh Sonic hedgehog
EA Enfermedad de Alzheimer	SNC Sistema Nervioso Central
EGF Factor de crecimiento epidermal	TNFα Factor de necrosis tumoral alfa
FGF-2 Factor de crecimiento fibroblástico de tipo 2	VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular
GABA Ácido gamma-amino-butírico	VMR Vía migratoria rostral
GD Giro dentado	ZSG Zona subgranular
GFAP Proteína ácida de glía fibrilar	ZSV Zona subventricular

Resumen

La producción de nuevas neuronas en el hipocampo adulto, el volumen hipocampal, las habilidades cognitivas y el peso corporal son algunos de los factores que se ven afectados por el envejecimiento. Estudios han mostrado que el ejercicio puede ayudar a prevenir o revertir estos efectos. Específicamente, se ha mostrado que el ejercicio incrementa la proliferación, diferenciación y maduración de las nuevas neuronas del hipocampo adulto, mejora la memoria y el aprendizaje y retrasa el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento. La mayoría de los estudios se han enfocado a estudiar los efectos que induce el ejercicio durante un periodo corto de tiempo (1 mes). Sin embargo, aún no se conoce cuál es el impacto del ejercicio en la neurogénesis hipocampal cuando el sujeto se ha ejercitado la mayor parte de su vida adulta (7 meses). En este trabajo de investigación mostramos que el ejercicio, tanto a corto como a largo plazo, tiene un impacto importante en el mantenimiento del peso corporal y un efecto diferencial en la neurogénesis. Específicamente, nosotros evaluamos la influencia del ejercicio en el peso corporal, el volumen cerebral, la diferenciación celular, mediante el marcador de migración neuronal doblecortina (DCX) y la maduración celular mediante el marcador 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) y el antígeno nuclear neuronal (NeuN). Nuestros resultados mostraron que si bien los ratones se mantienen corriendo de forma voluntaria por periodos prolongados de tiempo, el incremento en los niveles de diferenciación y maduración celular no es mantenido por periodos prolongados de ejercicio (7 meses). Esto sugiere que los mecanismos que median la plasticidad neuronal, incluida la neurogénesis y la conectividad sináptica, son modificados dependiendo del tiempo que el sujeto ha sido expuesto a condiciones de ejercicio. Estos resultados ayudarán a entender cómo el ejercicio ayuda a prevenir o revertir el deterioro cognitivo inducidos por el envejecimiento.

Abstract

The production of new neurons in the adult hippocampus, the hippocampal volume, cognitive abilities and body weight are some of the factors that are affected by aging. Studies have shown that exercise may either prevent or reverse these effects. Specifically, it has been shown that exercise increases proliferation, differentiation and maturation of new neurons in the adult hippocampus, improves memory and learning and delays the cognitive decline associated with aging. Most of the studies have focused on studying the exercise effects induced by a short period of time (1 month). However, the impact of the exercise on neurogenesis when the subject has exercised most of his adult life, is still unknown. Here we show that exercise, either short or long term, has an important impact on the maintenance of body weight and a differential effect on neurogenesis. Specifically, we evaluated the influence of exercise on body weight, brain volume, cell differentiation using the neuronal migration marker doublecortin (DCX) and cell maturation using the 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) marker and the neuronal nuclear antigen (NeuN). Our results indicate that although the mice are kept running voluntarily for long periods of time, the increase in cellular differentiation and maturation levels is not maintained by long term exercise (7 months). This suggests that the mechanisms that mediate neuronal plasticity, including neurogenesis and synaptic connectivity, are modified differentially depending on the time the subject has been exposed to exercise conditions. This result will help to understand how exercise prevent or reverse the cognitive decline induced by aging.

1. Introducción

1.1 Envejecimiento poblacional

La población mundial está envejeciendo de manera acelerada, entre el 2015 y 2050, la proporción de la población mundial con más de 60 años de edad pasará de 900 millones hasta 2,000 millones, lo que representa un aumento del 12% al 22% (“OMS|Envejecimiento y ciclo de vida”).

El envejecimiento en México, es sin duda uno de los retos más importantes al que se enfrenta el país. Se estima que la población envejecida (65 años o más) crecerá de manera sostenida conforme avanzan los años. Se prevé que para el año 2030 la población envejecida alcanzará el 12.5% y llegará hasta un 22.5% para el 2050, mientras que la población joven presenta un fenómeno contrario al representar un porcentaje cada vez menor conforme avanzan los años (Fig. 1).

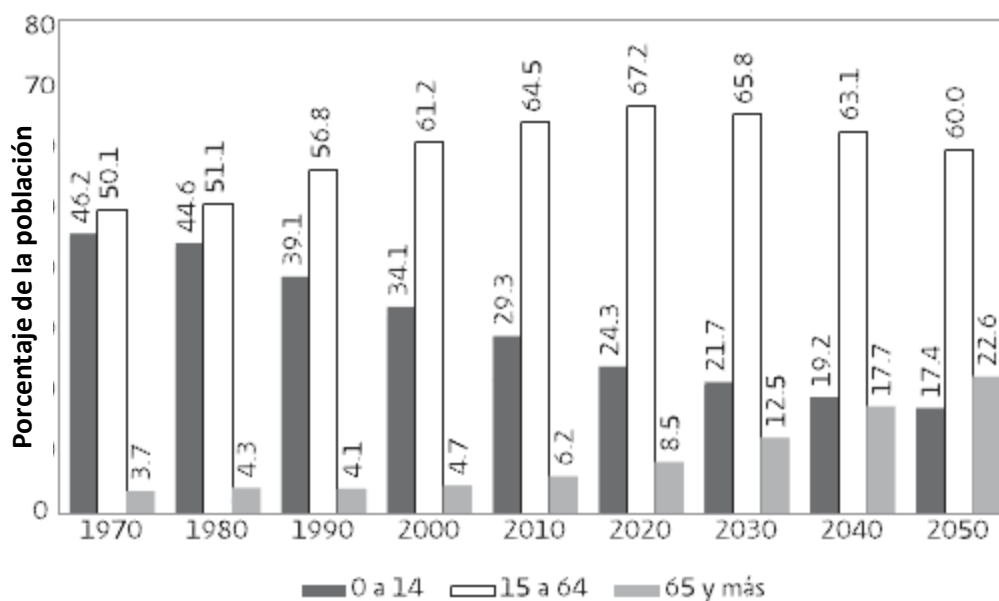


Figura 1. Distribución porcentual de la población por grupos de edad en México. Tomado de “Diagnóstico socio-demográfico del envejecimiento en México” | Consejo Nacional de Población CONAPO.

1.1.2 Patologías aunadas al envejecimiento

Una de las características que conlleva el envejecimiento de manera normal es la aparición de padecimientos crónicos, incurables y progresivos, que van dentro de un síndrome que culmina en un deterioro funcional, mala calidad de vida, demanda de atención médica y necesidad de cuidados a largo plazo (“Diagnóstico socio-demográfico del envejecimiento en México” | Consejo Nacional de Población CONAPO). Aunado al envejecimiento, las personas presentan un deterioro cognitivo (Craik, 1994). Las alteraciones cognitivas ocurren de manera normal a lo largo de la vida (Erickson y Barnes, 2003). Se ha encontrado al menos tres patrones de cambio relacionados con la edad en el comportamiento cognitivo: 1) disminuciones a lo largo de la vida, 2) disminuciones que ocurren de manera tardía en la vida y 3) estabilidad relativa durante la vida (Salthouse y Ferrer-Caja, 2003). Estudios con individuos de diferentes edades (20 años a 80 años), con un nivel de educación similar, han demostrado que a partir de los 30 años hay una disminución de algunos de los procesos cognitivos como la orientación espacial, la velocidad perceptual, la memoria verbal y el razonamiento (Fig. 2) (Craik, 1994).

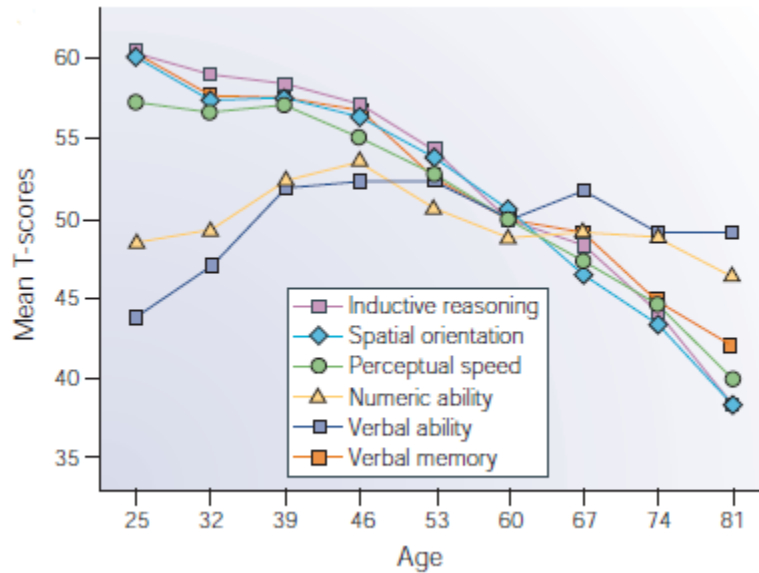


Figura 2. Cambios cognitivos con respecto a la edad. *Tomada de Hedden y Gabrieli, 2004.*

Las funciones cognitivas básicas más afectadas por la edad son la atención y la memoria. La percepción también muestra disminuciones significativas relacionadas con la edad, atribuibles principalmente a la disminución de las capacidades sensoriales. Las funciones cognitivas de alto nivel, como el procesamiento del lenguaje y toma de decisiones, también pueden verse afectadas por la edad (Glisky, 2007). Existen patologías que afectan la cognición relacionadas con el envejecimiento como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson. La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las enfermedades más alarmantes que conduce a la pérdida de la identidad personal y a una dependencia de cuidadores personales. Además del envejecimiento normal, el hábito de fumar, padecer hipertensión arterial, hipercolesterolemia, diabetes, depresión y una inactividad física son factores que contribuyen significativamente a un alto riesgo de padecer un deterioro cognitivo que puede agravarse hasta llegar a demencia o a EA (Aging, 2012; Cicconetti et al., 2004).

Desafortunadamente, los fármacos no han tenido éxito en la prevención o el tratamiento de la demencia, lo que conduce a la búsqueda de otros tratamientos no farmacológicos.

1.2 Efecto del ejercicio para contrarrestar el deterioro cognitivo

Dentro de los factores de riesgo, la inactividad física es uno de los factores que promueven el padecimiento de la EA. Hasta el 2010, cerca de 33,9 millones de personas a nivel mundial presentaban EA, de las cuales cerca del 13% de los casos son atribuidos a inactividad física. Una reducción en un 10 - 25% de este factor podría prevenir la EA hasta en 3 millones de casos a nivel mundial (Barnes y Yaffe, 2011).

La actividad física reduce el riesgo de padecer la EA (Larson et al., 2006) y reduce el decremento cognitivo relacionado con la edad. Adicionalmente, se ha observado que el ejercicio físico tiene efectos positivos a nivel cognitivo y emocional. Estudios en modelos murinos han demostrado que el ejercicio mejora la memoria espacial (Fordyce y Farrar, 1991) y el patrón de separación (Creer et al., 2010), y en humanos, el ejercicio tiene efecto terapéutico y preventivo en la depresión, la cual está ligada a un declive cognitivo (Strawbridge et al., 2002), tanto en jóvenes (Nabkasorn et al., 2006) como en adultos (Blumenthal et al., 1999; Singh et al., 2005). Estudios de neuroimagen sugieren que la actividad física reduce el riesgo de un deterioro cognitivo aumentando el tamaño de áreas cerebrales involucradas con la formación de la memoria e incrementando la actividad funcional en el hipocampo (Erickson et al., 2012). Adicionalmente, se ha sugerido que el ejercicio tiene un efecto neuroprotector ante un daño cerebral debido a accidentes cerebrovasculares (Rabadi, 2007).

A nivel periférico, el ejercicio incrementa la secreción de catepsina-B del músculo esquelético, proteína que se ha sugerido podría ser mediadora del incremento en la función cognitiva (Moon et al., 2016).

1.3 Efecto del ejercicio en el hipocampo

La gran mayoría de los cambios inducidos por el ejercicio se observan en el hipocampo, área importante para el aprendizaje y la memoria. Estudios en roedores muestran que el ejercicio voluntario mejora el rendimiento en tareas de aprendizaje dependiente del hipocampo, como la memoria espacial (Anderson et al., 2000; van Praag et al., 1999b) y el condicionamiento contextual del miedo (Baruch et al., 2004), y facilita la potenciación a largo plazo (LTP) en las sinapsis de la vía perforante al giro dentado (GD) (van Praag et al., 1999a).

Adicionalmente, el ejercicio voluntario incrementa en el hipocampo los niveles de algunos factores neurotróficos como el factor de crecimiento fibroblástico de tipo 2 (FGF-2, por sus siglas en inglés) (Gómez-Pinilla et al., 1997), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína presente en las células endoteliales que promueve la angiogénesis (Krum et al., 2002) y el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Neeper et al., 1996). Además, el ejercicio estimula la recaptura del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Trejo et al., 2001) y de manera importante, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual es una proteína que juega un papel importante en la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje (Vaynman et al., 2004).

Más aún, el ejercicio voluntario induce cambios morfológicos en el hipocampo y corteza entorrinal (CE). Específicamente, el ejercicio incrementa la longitud y complejidad dendrítica, así como la densidad de espinas dendríticas de las células granulares del GD (Eadie et al., 2005; Redila y Christie, 2006). El ejercicio (2 meses) no sólo modifica la morfología de las células del GD, sino también la morfología de las células piramidales del área CA1 del hipocampo y de las neuronas piramidales de la capa III de la CE (Stranahan et al., 2007). Aunado a los cambios morfológicos, el ejercicio incrementa de forma selectiva la densidad de los vasos sanguíneos en el GD y el estriado (Clark et al., 2009). Estudios de Imagen por Resonancia

Magnética (MRI por sus siglas en inglés) en humanos, han demostrado que el ejercicio voluntario por un periodo de 6 semanas incrementa el volumen sanguíneo cerebral (VSC) de manera selectiva en el GD (con un pico en la semana 4), lo cual correlaciona con un incremento en la neurogénesis del GD (Pereira et al., 2007).

El ejercicio incrementa en el GD, el estriado y en la corteza frontal medial la expresión de c-fos, un gen temprano expresado en respuesta a una estimulación neuronal que refleja la actividad neuronal (Rhodes et al., 2003). En conjunto, todas estas investigaciones sugieren que los cambios inducidos por el ejercicio en el hipocampo podrían mediar la mejora en el aprendizaje y la memoria.

1.4 Estructura y función del hipocampo

El hipocampo es una estructura del lóbulo temporal medial que participa de manera crítica en la memoria episódica y la navegación espacial (Scoville y Milner, 1957). La formación hipocampal es un conjunto de estructuras conformada por el subículo, el cuerno de ammon (cornu ammonis), el cual está dividido en tres áreas, de CA1 a CA3 y el giro dentado (Amaral, 1993; Lorente de Nó, 1934). Su forma larga y curva está presente en todas las órdenes de mamíferos y se extiende a lo largo de un eje dorsal (septal) a ventral (temporal) en roedores, que corresponde a un eje de posterior a anterior en humanos (Strange et al., 2014) (Fig. 3).

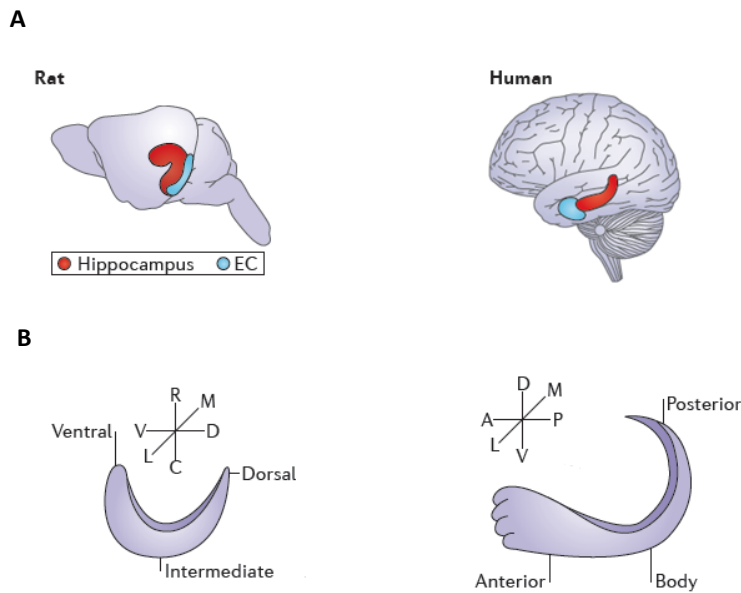


Figura 3. Comparación entre mamíferos de la anatomía hipocampal. (A) Ilustraciones esquematizadas del hipocampo en cerebro de rata y humano. Hipocampo (rojo) y corteza entorrinal (azul). (B) El eje longitudinal es descrito como dorsoventral en roedores y como anteroposterior en humanos. A: anterior, C: caudal, D: dorsal, L: lateral, M: medial, P: posterior, R: rostral, V: ventral. Editada de Strange et al., 2014.

El giro dentado está constituido por tres capas: la molecular, ocupada principalmente por las fibras de la vía perforante que se originan en la corteza entorrinal, la capa de células granulares, compuesta de células densamente empaquetadas con un grosor que va de 4 a 8 neuronas ó 60 μm . Esta capa además, encierra una región celular denominada capa celular polimórfica o hilus, en la cual predominan los axones de las células granulares, denominados fibras musgosas; ésta constituye la última capa del giro dentado.

El hipocampo se divide en tres áreas: CA3, CA2 y CA1. En estas áreas, la principal capa celular es la de células piramidales. Debajo de la capa de células piramidales se encuentra el *stratum oriens* y superficial a la capa de células piramidales se encuentran el *stratum lucidum*, *stratum radiatum* y *stratum lacunosum-moleculare*. Las áreas CA2 y CA1 tienen las mismas capas que CA3 excepto por el *stratum lucidum* (Amaral et al., 2007).

1.4.1 Neurogénesis hipocámpal

Dentro del hipocampo, el área que sufre mayores modificaciones por el ejercicio es el giro dentado. El giro dentado es una de las dos estructuras cerebrales que produce nuevas neuronas durante toda la vida. Este proceso es denominado “Neurogénesis del cerebro adulto”. En este proceso, las nuevas neuronas se generan a partir de células progenitoras neurales (SNPCs), las cuales están localizadas en la zona subgranular (ZSG) del GD (Ming and Song, 2011). Estas nuevas neuronas son funcionales y se integran a la red neuronal hipocámpal ya establecida, a través de un proceso de maduración que toma aproximadamente un mes, en el cual la célula alcanza la morfología de una célula granular, aunque su maduración completa puede llevar varios meses (Vivar y van Praag, 2013; Zhao et al., 2006). Las células granulares recién nacidas reciben aferentes de interneuronas, células musgosas, células colinérgicas septales y principalmente de células de la corteza entorrinal lateral para su integración en el giro dentado (Fig. 4) (Vivar et al., 2012).

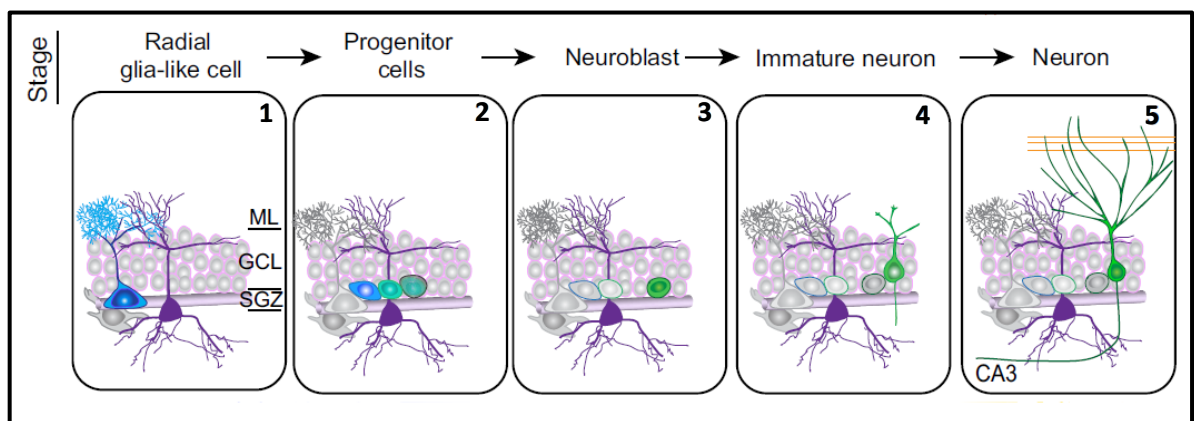
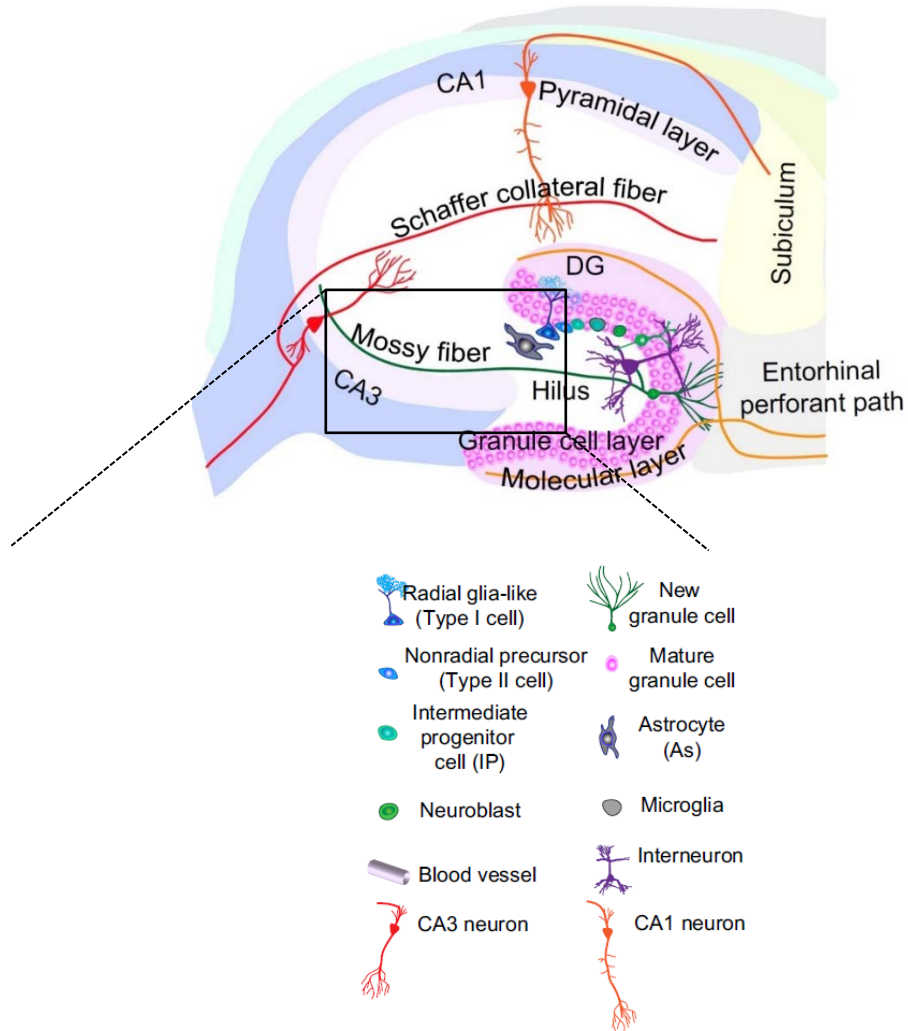


Figura 4. Neurogénesis del cerebro adulto en el giro dentado del hipocampo. (1) Activación de la célula quiescente radial en la zona subgranular (SGZ); (2) Proliferación de progenitores intermedios; (3) Generación de neuroblastos; (4) Integrición de las neuronas inmaduras; y (5) Maduración de la nueva neurona en la capa de células granulares (GCL). DG: Giro

dentado; ML: Capa molecular; CGL: Capa de células granulares; SGZ: Zona subgranular. Tomada de Ming y Song, 2011.

1.4.2 Métodos para medir la neurogénesis

Conforme avanzan los años, el campo de la neurogénesis adulta ha sido estudiado con diversos enfoques tecnológicos para poder distinguir a la nuevas neuronas de miles de millones existentes en el cerebro. Esto ha permitido rastrear el nacimiento de las nuevas neuronas, con lo cual se ha podido determinar su proceso de maduración y las modificaciones que este tiene ante diferentes estímulos intrínsecos (hormonas, péptidos, factores de crecimiento) y extrínsecos (ejercicio, ambiente enriquecido, estrés). Para ello se han utilizado principalmente tres métodos.

Análisis basado en la incorporación de análogos de nucleótidos durante la división celular.

Dos diferentes análogos pueden ser utilizados para medir la longitud del ciclo celular. Durante la fase S (síntesis) de la replicación de ADN (ácido desoxirribonucleico), nucleótidos exógenos como la Timidina-[H^3] o el BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina) y sus derivados como el IdU (5-yodo-2'-desoxiuridina) y el CldU (5-cloro-2'-desoxiuridina) son incorporados dentro del nuevo ADN sintetizado y de esta manera pasa a la nueva progenie celular. El BrdU puede ser detectado por inmunohistoquímica, usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra una cadena simple de ADN que contiene BrdU (Grazner, 1982) (Fig. 5A). El BrdU tiene la capacidad de cruzar la barrera hemato-encefálica, por ello, puede ser entregado por inyección vía intravenosa (i.v), intraperitoneal (i.p), intracerebroventricular (i.c.v) u oralmente.

Análisis basado en marcaje genético con retrovirus.

Los análogos mencionados anteriormente, BrdU y timidina-[H³] son utilizados para marcar células en división, pero estos métodos requieren procesamiento del tejido y únicamente marcan el soma. En roedores, el marcaje retroviral y el uso de modelos animales transgénicos proveen estrategias alternativas y complementarias para el estudio de la neurogénesis (Yamaguchi et al., 2000). Después de la infección, el genoma retroviral es integrado en el ADN cromosomal permitiendo que el genoma retroviral pase a toda la progenie celular a medida que pasa por su proceso de maduración. El uso de retrovirus que carecen de mecanismos de importación nuclear, como lo es el virus de la leucemia murina de Muloney hace que la integración viral sólo ocurra cuando se rompe la membrana nuclear durante la mitosis, lo que lo hace un buen indicador de la división celular (Lewis y Emerman, 1994). La expresión de un reportero como la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) permite la visualización directa y el análisis de las neuronas recién nacidas por microscopía fluorescente (van Praag et al., 2002). Este método requiere de un procedimiento quirúrgico invasivo llamado cirugía estereotáxica para poder administrar el virus dentro de regiones específicas del cerebro. Gracias a este método se ha podido identificar distintos estadios morfológicos de las nuevas neuronas en el GD del cerebro adulto de ratón, siguiendo el crecimiento dendrítico y axonal (Zhao et al., 2006) (Fig. 5B).

Análisis basado en la expresión de marcadores específicos.

Durante el proceso de maduración, las nuevas neuronas generadas a partir de células progenitoras migran hacia la capa de células granulares, se diferencian, expanden sus axones y expresan marcadores neuronales específicos (Cameron et al., 1993; Kempermann et al., 2004). En cada una de estas etapas, las nuevas neuronas pueden ser identificadas por la presencia de marcadores del ciclo celular de neuronas inmaduras (Ej. Doblecortina,

DCX) y la ausencia o presencia de marcadores de neuronas maduras (Ej, Proteína nuclear neuro-específica, NeuN).

Adicional a estas metodologías, se han diseñado ratones transgénicos que expresan proteínas reporteras bajo promotores específicos. Por ejemplo, para estudiar las células progenitoras neurales se utilizan animales transgénicos que expresan nestina-GFP (Mignone et al., 2004) (Fig. 5C).

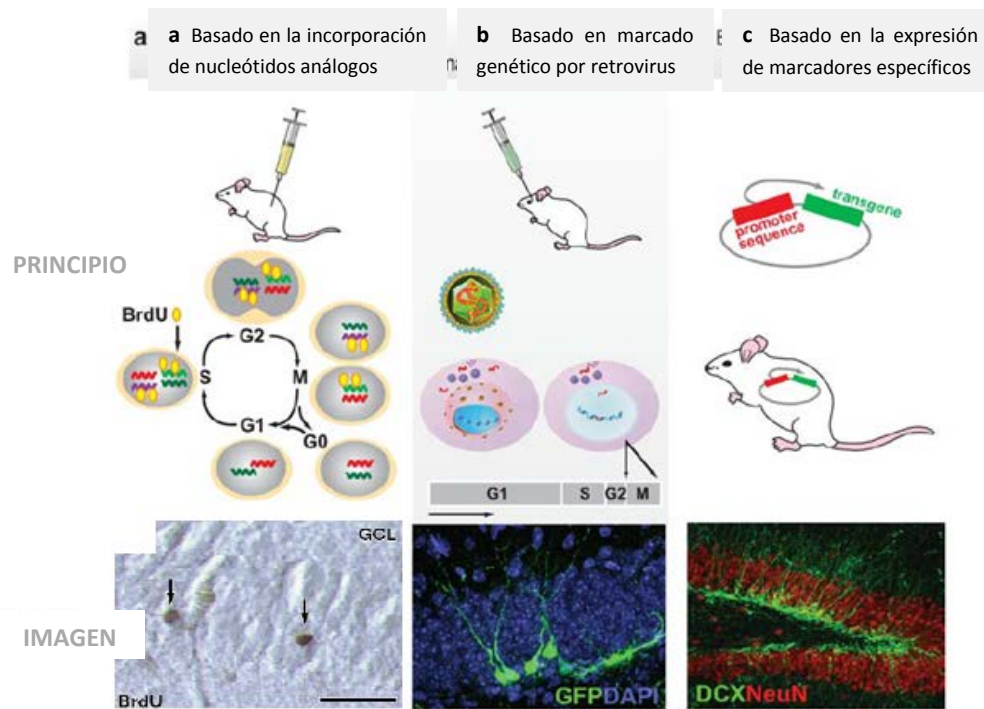


Figura 5. Métodos para el análisis de la neurogénesis adulta in vivo. A) Análisis basado en la incorporación de análogos de timidina durante la fase S de replicación del ADN del ciclo celular. La imagen muestra un análisis inmunohistoquímico de una tinción de BrdU con DAB (Diaminobencidina). B) Análisis basado en marcadores retrovirales. La imagen muestra la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en células nuevas dos semanas después de la inyección del retrovirus por cirugía estereotáxica dentro de la región del hilus del hipocampo de un ratón adulto. C) Análisis basado en la expresión de marcadores específicos. Utilizando ratones transgénicos se pueden expresar proteínas reporteras bajo promotores específicos. La imagen muestra la expresión de un marcador de neuronas inmaduras (DCX) y neuronas maduras (NeuN) en el giro dentado del ratón adulto. *Editada de Ming y Song, 2005.*

Todas estas metodologías combinadas con técnicas de microscopía electrónica y electrofisiología han permitido identificar la secuencia del proceso de maduración de las nuevas neuronas del hipocampo.

La neurogénesis hipocampal adulta se da a través de varios procesos que pueden ser divididos en cinco estadios diferentes:

1.4.3 Fase de proliferación

Las células progenitoras neurales quiescentes (NSPCs), localizadas en el nicho neurogénico del GD, expresan la proteína acídica fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés) y nestina (Filippov et al., 2003) (Fig. 7). Estos precursores comparten características con las células embrionarias de la glía radial, las cuales actúan como progenitores neurales durante el desarrollo embrionario y como guía de la migración neuronal (Hartfuss et al., 2001; Levitt y Rakic, 1980). Cuando la población quiescente de NSPCs es activada, generan a través de una división asimétrica la población de progenitores neurales de amplificación, las cuales proliferan en la ZSG a través de una serie de rondas de división simétrica (las células en esta fase son nestina-positiva pero GFAP-negativas y altamente proliferativas) y dan lugar a los neuroblastos de tipo 1 (Encinas et al., 2006).

1.4.4 Fase de diferenciación y fase de migración

En fase de diferenciación los progenitores neurales de amplificación se diferencian en neuroblastos dentro de la ZSG. Estos pueden ser subclasificados en Tipo 1 y Tipo 2 por la co-expresión del marcador neuronal temprano DCX. Las células que se encuentran en los últimos puntos de la etapa de diferenciación dejan de expresar nestina de manera transitoria y comienzan a expresar DCX, así como la molécula de adhesión celular neural

en su forma embrionica polisialilada (PSA-NCAM) (Kronenberg et al., 2003). Entre los mecanismos moleculares implicados en la migración tangencial el PSA-NCAM parece ser crucial (Fig. 7).

1.4.5 Fase de sobrevivencia

En esta fase las neuronas inmaduras envían sus dendritas hacia la capa molecular del GD y extienden sus proyecciones axonales hacia la capa de células piramidales de CA3. Estas neuronas inmaduras todavía expresan DCX y PSA-NCAM (Kempermann et al., 2004) y comienzan a ser neuronas post-mitóticas que transitoriamente expresan la proteína calretinina de unión a calcio y el marcador neuronal NeuN (Brandt et al., 2003). Una fracción sustancial de las nuevas neuronas muere antes de la fase de maduración (Biebl et al., 2000; Kempermann et al., 2003) y las que sobreviven lo hacen de una manera dependiente de actividad a través de la activación de receptores glutamatérgicos NMDA (Tashiro et al., 2006).

1.4.6 Fase de maduración

Durante esta fase, las nuevas células granulares establecen contactos sinápticos para recibir aferencias desde la corteza entorrinal y para enviar sus eferencias hacia CA3 y el hilus, desarrollan extensas ramificaciones y envían largos axones que forman las fibras musgosas (Encinas et al., 2006). Después de 2 semanas aproximadamente, de que se han convertido en post-mitóticas la calretinina es regulada hacia abajo, mientras que la calbindina es regulada hacia arriba (Brandt et al., 2003; Kempermann et al., 2004) y comienzan a ser neuronas funcionalmente integradas en el hipocampo que expresan el marcador NeuN (van Praag et al., 2002) (Fig. 6).

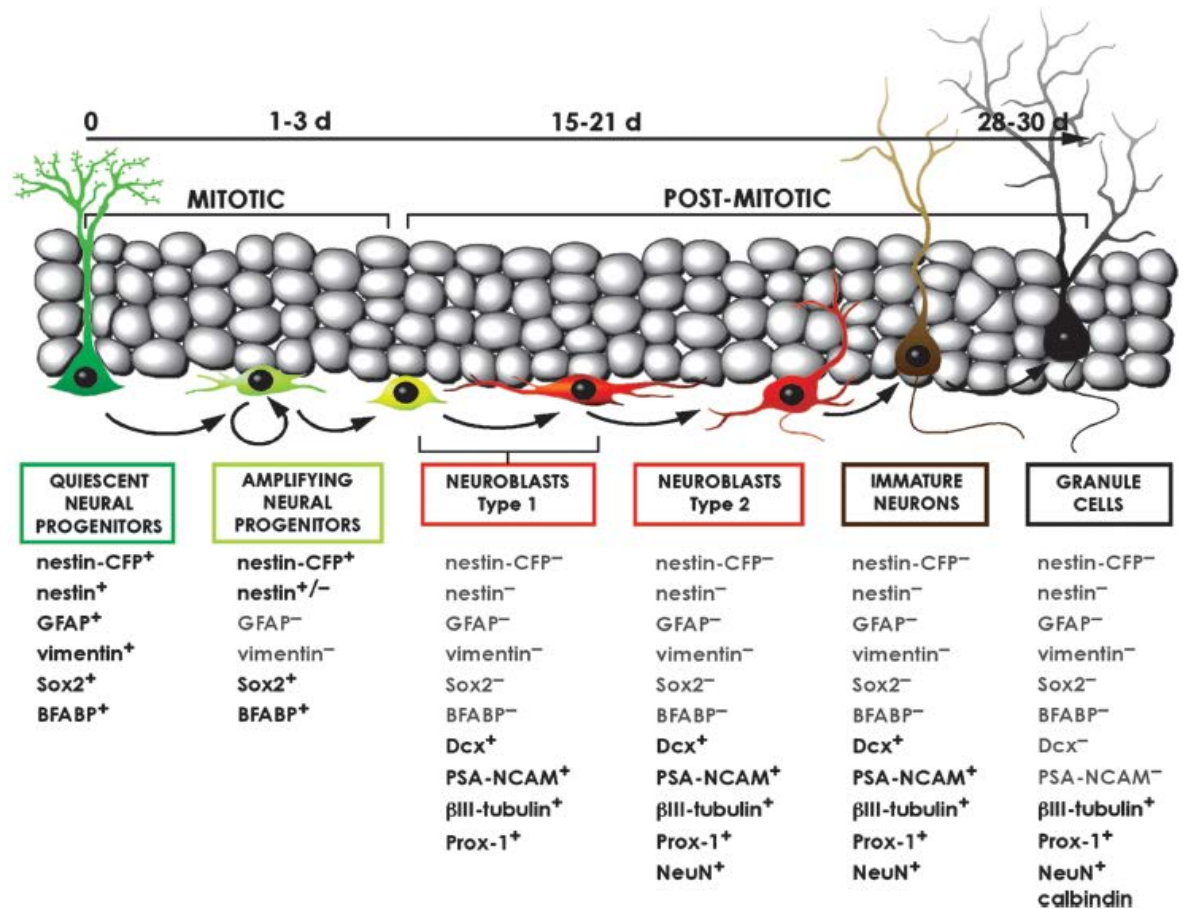


Figura 6. Cascada de diferenciación neuronal durante la neurogénesis adulta en el giro dentado y patrones de expresión de marcadores específicos. *Tomada de Encinas et al., 2006.*

Cada paso del proceso neurogénico es dependiente del microambiente, conocido como nicho neurogénico y de mecanismos intrínsecos que aseguran los niveles apropiados de proliferación de las células transitoriamente amplificadas, la diferenciación, la migración y la integración de las nuevas neuronas. En el microambiente de la ZSG están los astrocitos, oligodendrocitos y otros tipos de neuronas. Los astrocitos promueven la diferenciación neuronal de las NSPCs (Song et al., 2002). Entre los reguladores transcripcionales de la neurogénesis en el GD se encuentran Sox2, Pax6, NeuroD1, Ascl1, Sp8, Prox1 y Gsx2. Uno de los mecanismos epigenéticos que controlan los niveles de neurogénesis es el reconocimiento

de modificaciones de histonas por MBD1. Además de estos reguladores intrínsecos, diversos morfógenos, neurotransmisores, factores de crecimiento y citocinas están implicados en la diferenciación neuronal, los cuales incluyen al ácido γ -aminobutírico (GABA), glutamato, BDNF, el factor de crecimiento epidermal (EGF), FGF-2, Wingless (Wnt), sonic hedgehog (Shh), proteínas morfogénicas del hueso (BMP), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), entre otros (Zhao et al., 2008).

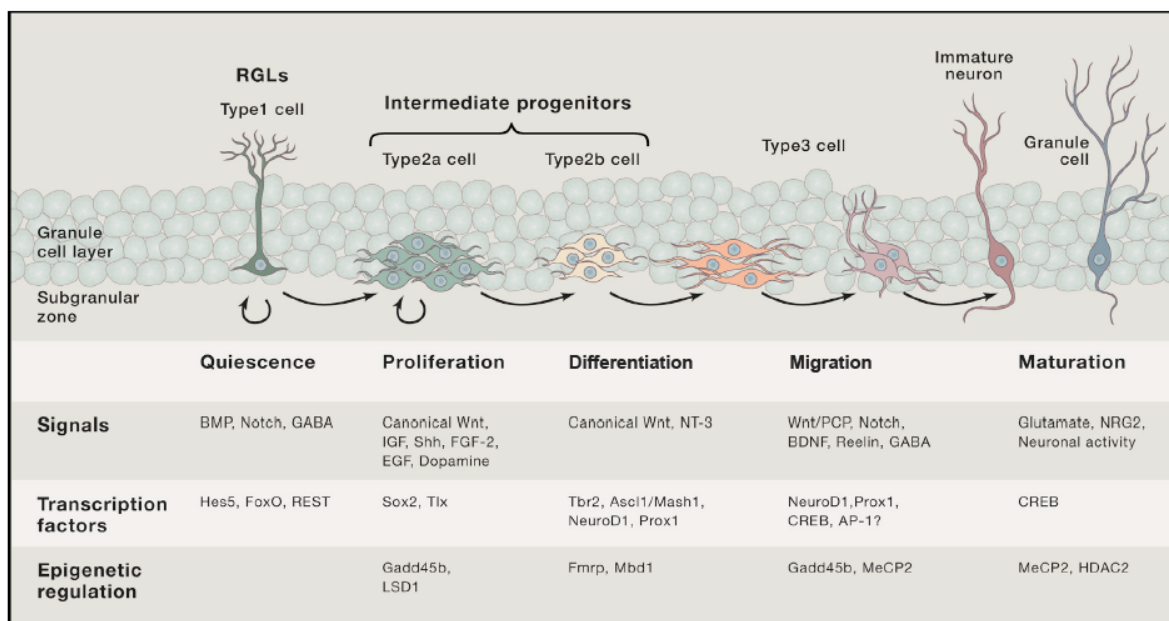


Figura 7. Mecanismos moleculares que regulan la neurogénesis hipocámpica adulta en el giro dentado. Tomada de Gonçalves et al., 2016.

1.5 Neurogénesis hipocámpica y ejercicio

En 1999, van Praag y colaboradores demostraron por primera vez que el ejercicio voluntario incrementa la proliferación, sobrevivencia y maduración de las nuevas neuronas en el GD y mejora la plasticidad sináptica que resulta en un mejor rendimiento en las tareas dependientes del hipocampo en el ratón adulto (van Praag et al., 1999a, b). Estudios posteriores han demostrado que

el ejercicio reduce la disminución de la neurogénesis ocasionada por la edad, lo cual correlaciona con la disminución del declive cognitivo (Kobilo et al., 2011; Kronenberg et al., 2006; Marlatt et al., 2012; van Praag et al., 2005).

Adicionalmente, el ejercicio revierte la disminución en la neurogénesis ocasionada por la EA (Rodríguez et al., 2011). Interesantemente, se ha observado que el efecto neurogénico del ejercicio no es homogéneo, ya que la neurogénesis solo se incrementa (hasta 3 veces del nivel de los animales control) en la parte dorsal del giro dentado, no así en la parte ventral (Vivar et al., 2016).

A nivel morfológico, el ejercicio modifica la morfología de las nuevas neuronas. Específicamente, el ejercicio modifica la longitud dendrítica, el número de puntos de ramificación y la densidad de espinas, este efecto es independiente de la edad ya que estos cambios son observados tanto en ratones adultos jóvenes como envejecidos (van Praag et al., 2005). Sin embargo, se ha demostrado que los ratones envejecidos necesitan de un periodo de hasta 6 meses de ejercicio para observar cambios en la neurogénesis (Marlatt et al., 2012). Este incremento en la densidad dendrítica podría ser el resultado de las modificaciones que el ejercicio induce al circuito neuronal de las nuevas neuronas. De hecho, recientemente se demostró que el ejercicio modifica las conexiones de las entradas sinápticas sobre las nuevas neuronas. Específicamente, el ejercicio incrementa la entrada sináptica de la corteza entorrinal, principalmente de la corteza entorrinal caudomedial y lateral, así como del septum y del núcleo mamilar (Vivar et al., 2016).

1.6 Neurogénesis hipocampal y envejecimiento

Interesantemente, de todos los factores fisiológicos que inducen modificaciones en la neurogénesis, el envejecimiento es uno de los que mayor impacto presenta, ya que es considerado un factor negativo de la

neurogénesis hipocampal. Este se caracteriza por presentar neurodegeneración, la cual repercute en una pérdida neuronal que conlleva a una degradación en los circuitos y sinapsis neuronal, la cual podría estar relacionado con un declive cognitivo. Además, durante el envejecimiento existe un declive progresivo de la expresión de diversos factores que promueven la proliferación celular durante la neurogénesis, entre los que se encuentran factores neurotróficos, factores de crecimiento, como el IGF-1 y cambios en la liberación de neurotransmisores (Cameron et al., 1998; Shetty et al., 2005). Se ha demostrado que el humano y otros mamíferos tienen la capacidad de seguir generando nuevas neuronas a lo largo de la vida, y de hecho, se ha propuesto que este proceso de neurogénesis adulta podría ser un mecanismo que contribuye a mantener la reserva neural mediante mecanismos de plasticidad que permiten la compensación en situaciones de pérdida funcional como el envejecimiento normal (Klempin y Kempermann, 2007).

Se ha demostrado que la neurogénesis en ratones envejecidos (18 meses), medida a través del marcaje con BrdU, disminuye ~40% con respecto a ratones adultos (6 meses) y un ~76% con respecto a ratones adultos jóvenes (3 meses)(Kempermann et al., 1998). Esta disminución en la neurogénesis ocasionada por la edad es atribuida a un decremento en la actividad proliferativa de las células progenitoras neurales y una disminución en el número de células progenitoras (Encinas et al., 2011; Kuhn et al., 1996). Este mismo efecto se observa tanto en diferentes cepas de roedores como en diferentes especies (Amrein et al., 2011). El mecanismo por el que las células progenitoras pierden su capacidad proliferativa durante el envejecimiento aún no está bien descrito.

1.7 Justificación

El ejercicio mejora la memoria y el aprendizaje y retrasa el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento. Correr durante 3 días hasta 2 meses (corto plazo) incrementa la proliferación, la diferenciación y la neurogénesis en el hipocampo adulto. En la gran mayoría de los estudios, el efecto del ejercicio en la neurogénesis se ha estudiado realizando la inyección de BrdU al inicio del periodo del ejercicio y se evalúan las diferentes etapas de la neurogénesis 7, 15, 30 días o meses después. Sin embargo, aún no se conoce cuál es el impacto del ejercicio en la neurogénesis después de un periodo de ejercicio a largo plazo (ej. 7 meses después), cuando el sujeto se ha ejercitado la mayor parte de su vida adulta. Nosotros nos preguntamos si los niveles de neurogénesis se mantienen iguales a los observados con el ejercicio a corto plazo, o habrá a un mecanismo de homeostasis en donde ya no es necesario un incremento de nuevas neuronas, sino que más bien, se están llevando a cabo modificaciones a nivel de morfología, como lo es un incremento en la densidad sináptica o la complejidad dendrítica o en la conectividad de los circuitos neuronales. Estos estudios nos ayudarán a dilucidar las modificaciones y los mecanismos por los que el ejercicio induce su efecto benéfico en el cerebro.

2. Hipótesis

El ejercicio a largo plazo (7 meses) no mantiene un incremento sostenido de la neurogénesis hipocampal.

3. Objetivo general

Determinar los niveles de neurogénesis inducidos por el ejercicio a corto y a largo plazo.

3.1 Objetivos particulares

1. Determinar si ratones de la cepa C57Bl/6 corren voluntariamente durante periodos prologados de tiempo.
2. Determinar los cambios en el peso corporal inducidos por el ejercicio a corto y largo plazo.
3. Determinar si el ejercicio induce modificaciones en la masa cerebral.
4. Determinar los niveles de diferenciación celular inducidos por el ejercicio a corto y a largo plazo a través del eje dorso-ventral.
5. Determinar los niveles de neurogénesis inducidos por el ejercicio a corto y a largo plazo a través del eje dorso-ventral.

4. Metodología

4.1 Animales y condiciones de habituación

Ratones macho C57Bl6 de 4-6 semanas de edad (n = 28) fueron divididos al azar en grupo control y de ejercicio. Los animales control fueron colocados individualmente en cajas estándar, mientras que los ratones del grupo de ejercicio fueron colocados en cajas estándar modificada con una rueda adaptada para correr (diámetro = 12 cm). La distancia recorrida fue registrada con un odómetro (SD-548B). Los animales tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*, con un periodo de luz/oscuridad de 12 horas. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a los protocolos de la UPEAL-Cinvestav.

4.2 Inyección de BrdU

Los ratones del grupo a corto plazo (CP, CON, n = 7; RUN, n = 7) fueron inyectados intraperitonealmente (i.p) durante 5 días con BrdU (Bromodeoxiuridina, 50mg/kg), disuelto en solución salina (NaCl) al 0.9% estéril y filtrado, 3 días después de haber sido colocados en sus respectivas condiciones experimentales; y los ratones del grupo a largo plazo (LP, CON, n = 8, RUN, n = 6) fueron inyectados i.p (con BrdU durante 5 días) 6 meses después de haber sido colocados en sus respectivas condiciones.

4.3 Perfusión

Un mes después de la última inyección de BrdU, todos los ratones de ambos grupos experimentales (ejercicio a corto y a largo plazo) fueron anestesiados con Isoflorano y perfundidos transcárdialmente con solución de NaCl al 0.9% filtrada, y con paraformaldehído (PFA) al 4%. Se realizó la extracción del cerebro, el cual fue post-fijado con PFA al 4% durante 24 horas para su posterior criopreservación en una solución de sacarosa al 30% y

finalmente se obtuvieron rebanadas de 40µm de grosor con el microtomo Leica SM2010 R.

4.4 Inmunohistoquímica

Para determinar la tasa de neurogénesis que se genera después de un periodo corto o largo de ejercicio se realizó inmunohistoquímica para BrdU (anti-BrdU policlonal de rata, 1:100, Accurate Chemical). Para determinar la diferenciación neuronal se utilizó doblecortina (DCX, anti-DCX policlonal de cabra, 1:200), un marcador de neuroblastos tipo 1 y 2, los cuales fueron diferenciados por morfología. Todas las inmunohistoquímicas se llevaron a cabo en cortes horizontales (1:6, 240 µm de distancia entre cada corte) con el método de peroxidasa, sistema ABC (Complejo Avidina Biotina peroxidasa) utilizando como anticuerpo secundario burro anti-rata biotilado (1:250) para BrdU y burro anti-cabra biotilado (1:250) para DCX. Se utilizó diaminoabencidina (DAB) como cromogéno. Posteriormente, se adquirieron fotografías de los cortes horizontales en el microscopio óptico (Nikon Diaphot 300) a una amplificación de 4x. Después de la reconstrucción de la rebanada usando CorelDraw, las imágenes reconstruidas fueron emparejadas con el atlas de cerebro de ratón (Paxinos y Franklin, 2007) para determinar el nivel dorso-ventral de la rebanada. Finalmente, se adquirieron fotomicrografías del GD a una amplificación 10x las cuales fueron analizadas con el programa ImageJ para el conteo celular.

4.5 Inmunofluorescencia

Para determinar la tasa de maduración se utilizó un doble marcaje con BrdU-NeuN, un marcador de células maduras. En todos los casos se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos derivados de burro (anti-BrdU policlonal de rata, 1:100, Accurate Chemical y anti-NeuN). Finalmente, se montaron las rebanadas y se protegieron de la luz para posteriormente adquirir imágenes en el microscopio confocal (Leica TCS SP8, acoplado a microscopio invertido Leica DMI6000 B).

4.6 Análisis morfológico de células diferenciadas que expresan doblecortina

Para diferenciar los neuroblastos tipo 1, tipo 2 y neuronas inmaduras, se evaluó la orientación axónica de aquellas células marcadas con DCX y se realizó el conteo celular con el programa Image J.

4.7 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 6 y fueron representados como media \pm EEM (error estándar de la media). Se utilizó una prueba de ANOVA de dos vías seguido de un análisis post-test Bonferroni para comparaciones entre grupos (edad x ejercicio). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5. Resultados

5.1 Los ratones de la cepa C57Bl/6 corren por periodos prolongados de tiempo.

Para determinar si los ratones de la cepa C57Bl/6 se mantenían corriendo voluntariamente durante periodos largos de tiempo se midió la distancia diaria corrida desde el comienzo de cada uno de los protocolos (ejercicio a corto plazo: 1 mes y ejercicio a largo plazo: 7 meses) hasta el final de los mismos.

El análisis de los datos mostró que los ratones corren en promedio 14.247 ± 0.67 km/día durante el primer mes. El análisis de la distancia promedio por semana durante el primer mes de ejercicio mostró que durante las dos primeras semanas de ejercicio hay un incremento paulatino en la distancia corrida (1er semana: 72.613 ± 8.26 km; 2da semana: 109.636 ± 8.75 km). A partir de la tercera semana, se alcanza una meseta en la distancia semanal corrida (3er semana: 111.529 ± 5.84 km; Fig. 9). La distancia total que los ratones corrieron durante el primer mes fue de 521.8 ± 31 km.

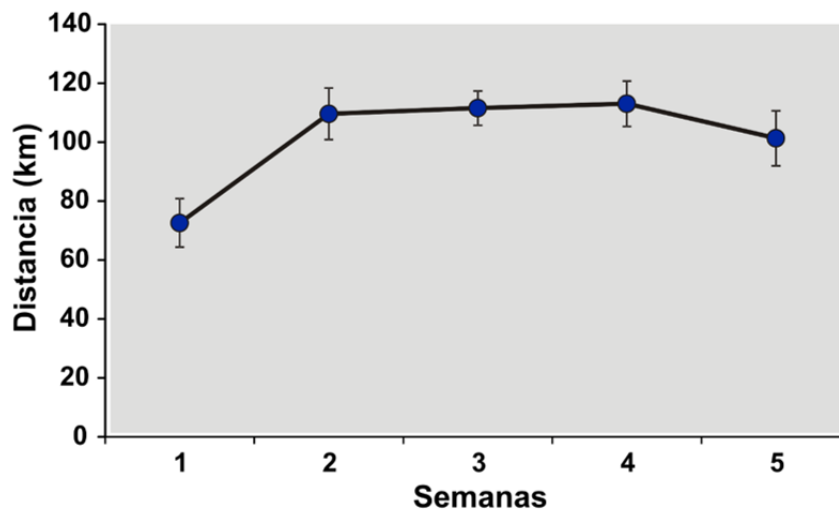


Figura 9. Distancia promedio semanal durante el 1er mes. Gráfica que muestra la distancia promedio semanal que los ratones corren durante el 1er mes de ejercicio. Durante las dos primeras semanas de ejercicio hay un incremento paulatino en la distancia corrida, a partir de la tercera semana, se alcanza una meseta en la distancia semanal corrida.

Los ratones del grupo de ejercicio a largo plazo se mantuvieron corriendo de forma voluntaria durante los 7 meses de duración del protocolo de experimentación. El análisis de la distancia promedio semanal mostró que hay una disminución paulatina de la distancia corrida (Figura 10). Sin embargo, los ratones corrieron un promedio de 6.637 ± 0.22 km/día durante el último mes, alcanzando una distancia promedio total de 196.111 ± 2.56 km en el último mes. Durante los 7 meses que duró el protocolo de experimentación, los ratones corrieron una distancia total de 1888.64 ± 125.80 km, lo que indica que los ratones pueden correr de forma voluntaria durante periodos prolongados de tiempo.

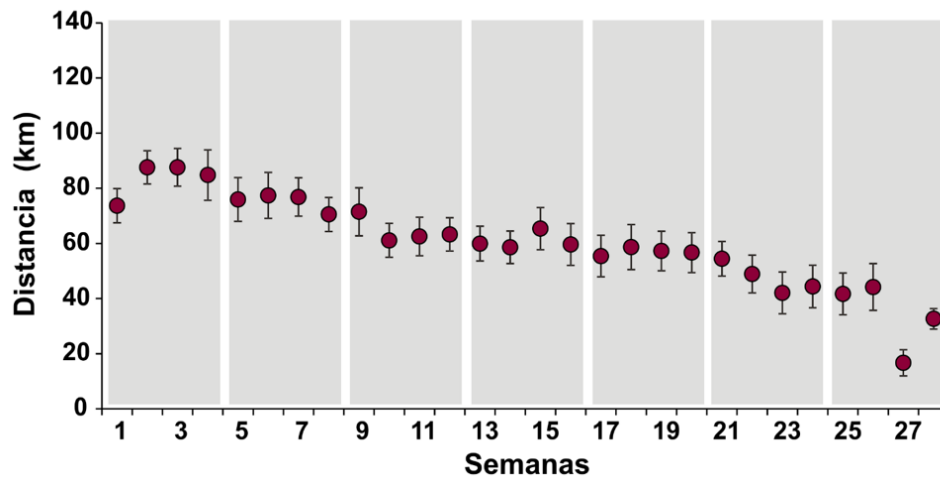


Figura 10. Distancia promedio semanal durante 7 meses. Gráfica que muestra la distancia promedio semanal que los ratones corren durante 7 meses de ejercicio. Hay una disminución paulatina de la distancia corrida conforme avanza el tiempo. Sin embargo, los ratones permanecen corriendo durante periodos prolongados.

5.2 El ejercicio evita el incremento del peso corporal.

Para determinar si el ejercicio tanto a corto plazo (CP) como a largo plazo (LP) influye en el peso corporal se midió el peso corporal de ratones control (CON) y en condición de ejercicio (RUN) al inicio y al final de cada uno de los protocolos de experimentación (CP y LP). El peso corporal inicial fue similar en todos los grupos (CP CON = 20.743 ± 1.34 g, n = 7; CP RUN = 23.456 ± 0.73 g, n = 7; LP CON = 20.834 ± 0.377 g, n = 8; LP RUN = 20.292 ± 0.83 g, n = 6; $F_{(1,24)} = 3.48$; $p > 0.05$) (Fig. 11).

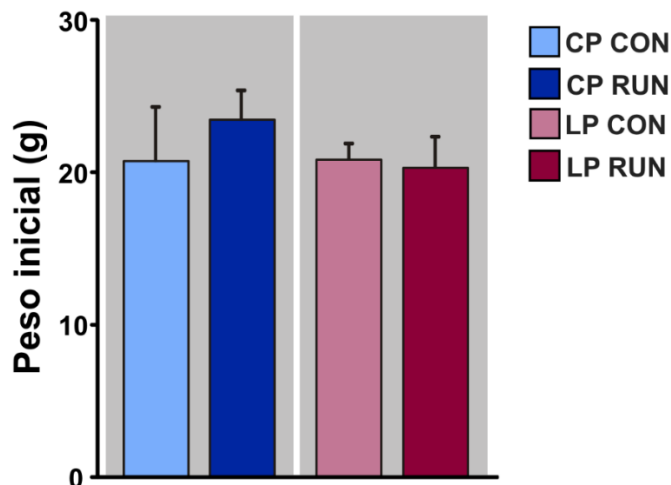


Figura 11. El peso corporal inicial de los ratones es similar en todos los grupos. Grafica que muestra el peso inicial promedio de los grupos a corto (CP) y a largo plazo (LP) en condición control (CON) y de ejercicio (RUN). El peso corporal inicial es similar en todos los grupos ($p > 0.05$).

Para determinar el efecto del ejercicio a corto y a largo plazo en el peso corporal se analizó la ganancia en peso, la cual es la diferencia entre el peso

final y el peso inicial. Los datos mostraron que la ganancia en peso es mayor en los ratones control sedentarios en comparación con aquéllos que realizaron ejercicio, tanto a CP como a LP (CP CON = 4.533 ± 0.98 g vs CP RUN = 0.976 ± 0.30 g; LP CON = 20.720 ± 2.67 g vs LP RUN = 10.770 ± 2.01 g; $F_{(1,24)} = 13.39$, $p = 0.0012$). Además, los datos mostraron que la ganancia en peso es mayor en los ratones controles y corredores del grupo de LP en comparación con el grupo de CP ($F_{(1,24)} = 49.53$, $p < 0.0001$; Fig. 12).

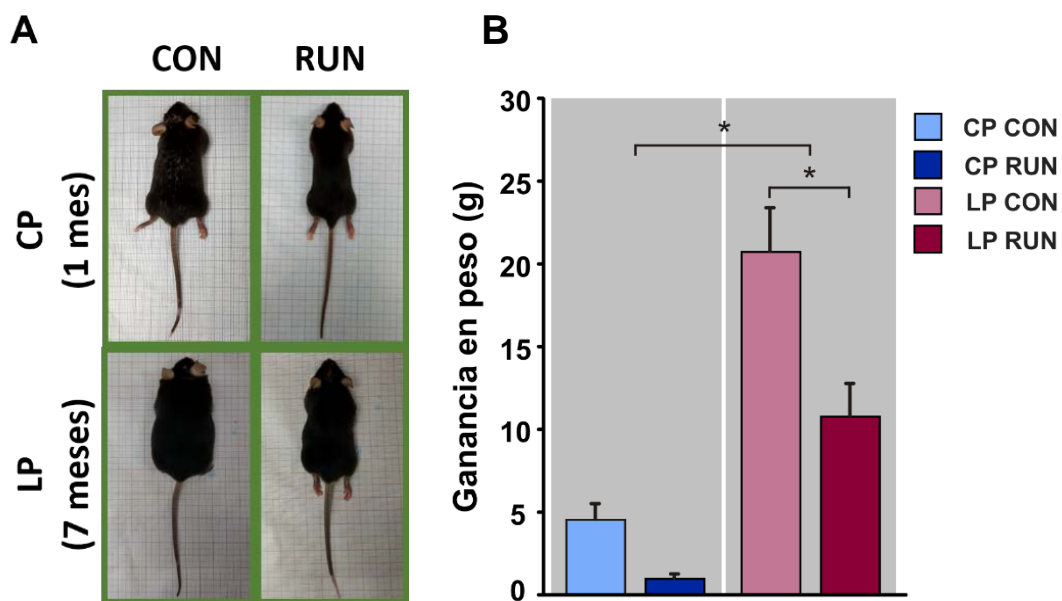


Figura 12. El ejercicio previene la ganancia de peso corporal. (A) Fotografías representativas de los ratones en condiciones de control (CON) y de ejercicio (RUN) del grupo de ejercicio a corto (CP) y a largo plazo (LP). (B) Grafica que muestra la ganancia en peso promedio de cada grupo. Los ratones sedentarios tienen una mayor ganancia en el peso corporal a comparación de los ratones que realizaron ejercicio.

5.3 El ejercicio no modifica el volumen cerebral pero sí la proporción cerebro – peso corporal.

Para determinar si el ejercicio a corto y a largo plazo inducen modificaciones en el tamaño y peso cerebral, se determinó el largo, ancho del cerebro y el peso cerebral en todos los grupos experimentales (Fig. 13 A). El análisis mostró que el ejercicio no influye en el tamaño del cerebro (largo: CP CON = 1.754 ± 0.03 mm vs CP RUN = 1.780 ± 0.02 mm; LP CON = 1.638 ± 0.06 mm vs LP RUN = 1.640 ± 0.05 mm; $F_{(1,24)} = 0.09$; $p > 0.05$. Fig. 13 C; ancho: CP CON = 1.249 ± 0.01 mm vs CP RUN = 1.247 ± 0.02 mm; LP CON = 1.277 ± 0.05 mm vs LP RUN = 1.189 ± 0.03 mm; $F_{(1,24)} = 1.84$; $p > 0.05$; Fig.13 D). Adicionalmente, el análisis mostró que tanto controles como corredores del grupo de LP tienen un menor largo cerebral en comparación con los del grupo de CP ($F_{(1,24)} = 8.1$, $p = 0.0089$; Fig. 13 C). Las diferencias en el periodo de experimentación (CP o LP), podría estar estrechamente relacionado con la edad del sujeto de experimentación al terminar el periodo de experimentación (CP 1 mes y LP 6 meses). El ejercicio no modificó el peso cerebral en los grupos CP y LP (CP CON = 0.590 ± 0.07 g vs CP RUN = 0.497 ± 0.05 g; LP CON = 0.489 ± 0.004 g vs LP RUN = 0.542 ± 0.05 g; $F_{(1,24)} = 0.18$; $p > 0.05$; Fig. 13 B).

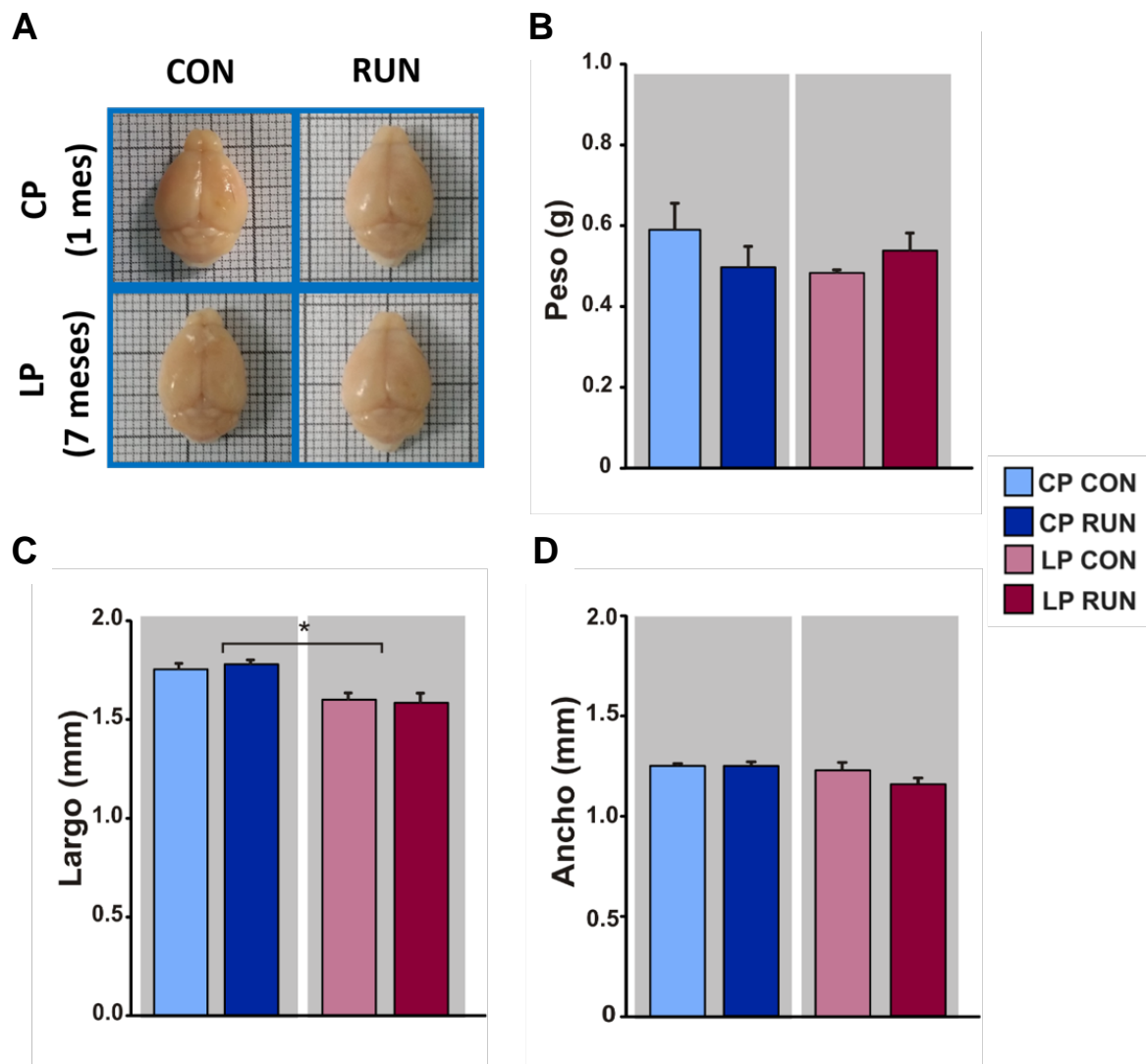


Figura 13. El ejercicio no modifica el tamaño ni el peso cerebral. (A) Fotografías representativas del cerebro de los ratones control (CON) y de ejercicio (RUN) del grupo de ejercicio a corto (CP) y largo plazo (LP). Promedios del peso (B), largo (C) y ancho (D) del cerebro de ratones control y en condición de ejercicio de los grupos de experimentación a corto y largo plazo. El ejercicio no modifica el largo del cerebro, sin embargo, el grupo de LP presenta un menor largo cerebral en comparación con el grupo de CP.

Al realizar una relación del peso cerebral con respecto al peso corporal final, el análisis mostró que, en condiciones control, la proporción cerebro – peso corporal disminuye significativamente en los ratones del grupo LP (CP CON = 0.024 ± 0.003 vs LP CON = 0.012 ± 0.001 ; $p < 0.001$). El ejercicio evitó la disminución de la proporción cerebro – peso corporal (CP CON = 0.024 ± 0.003 ; CP RUN = 0.020 ± 0.002 ; LP CON = 0.012 ± 0.001 ; LP RUN = 0.018 ± 0.002 ; $F_{(1,24)} = 0.42$; $p > 0.05$; Fig. 15).

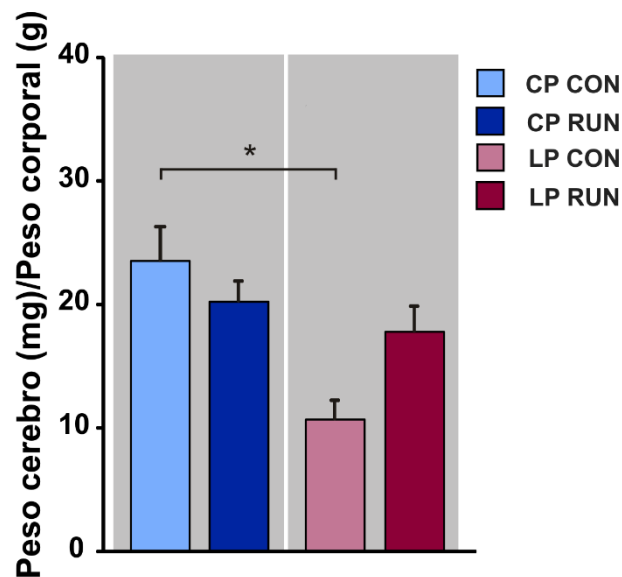
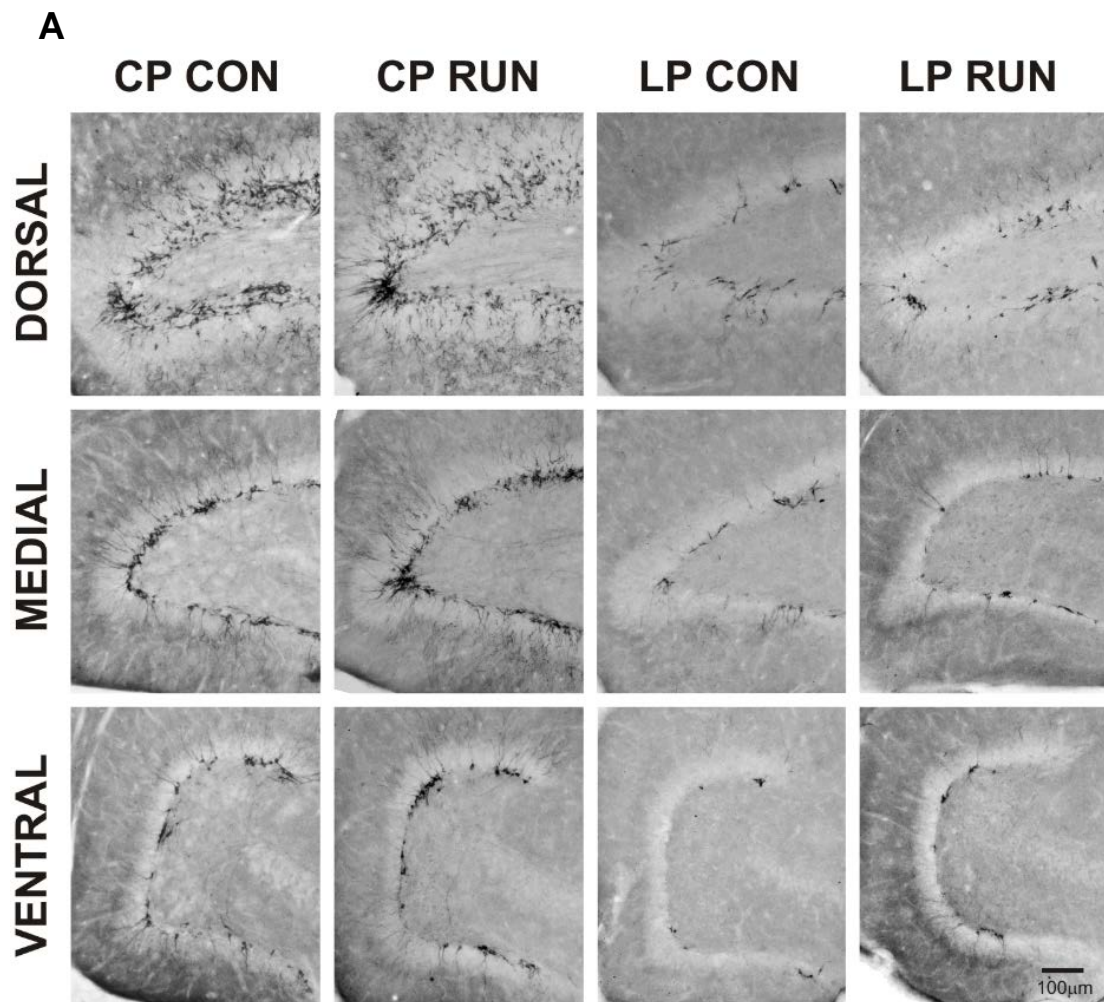


Figura 14. El ejercicio evita la disminución de la proporción cerebro – peso corporal. Grafica que muestra el promedio de la relación entre el peso del cerebro y el peso corporal final de los ratones controles (CON) y corredores (RUN) del grupo de ejercicio a corto (CP) y largo plazo (LP).

5.4 La diferenciación celular inducida por el ejercicio a largo plazo es menor que el inducido por el ejercicio a corto plazo.

Para determinar el efecto del ejercicio a corto y a largo plazo en la diferenciación celular se cuantificó el número total de células que expresan la

proteína de migración neuronal doblecortina (DCX) a través del eje dorso – ventral del giro dentado del hipocampo (Fig. 16 A). El análisis mostró que el tiempo de experimentación (CP o LP), el cual está asociado con la edad de los sujetos de experimentación, disminuye significativamente el número de células DCX positivas (DCX⁺; $F_{(1,20)} = 115.4$; $p < 0.0001$). El ejercicio incrementó el número de células DCX⁺ (CP CON = 2125 ± 187 , $n = 6$ vs CP RUN = 3067 ± 228 , $n = 6$; LP CON = 767 ± 70 , $n = 6$ vs LP RUN = 924 ± 121 , $n = 6$; $F_{(1,20)} = 11.36$, $p = 0.003$). Sin embargo, el incremento sólo fue significativo para el grupo de ejercicio a corto plazo en el número de células DCX⁺, el análisis mostro que el número de células es significativamente menor en el grupo de ejercicio a largo plazo ($p < 0.001$; Fig. 16 B).



B

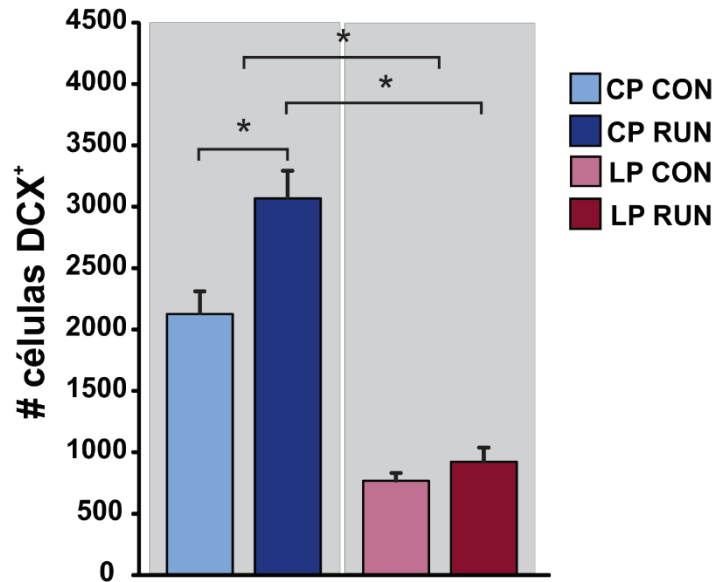
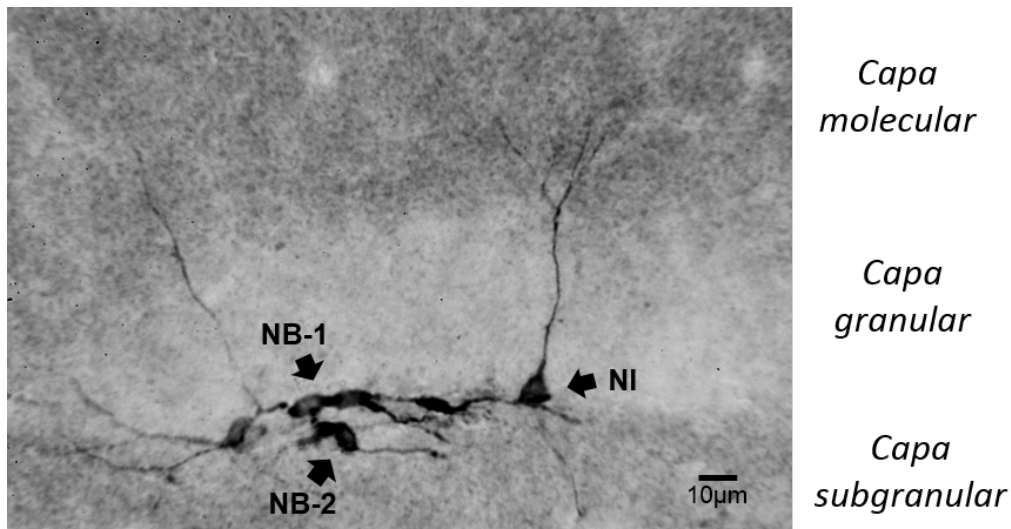


Figura 16. El ejercicio incrementa los niveles de diferenciación celular. (A) Fotomicrografías representativas de células DCX⁺ en el giro dentado a través del eje dorso-ventral en cortes horizontales de ratones control (CON) y en condición de ejercicio (RUN) de los grupos a corto y a largo plazo (CP y LP, respectivamente). Escala a 100 μ m. (B) El número de células DCX⁺ es mayor en los ratones en condiciones de ejercicio en comparación con los ratones controles. Sin embargo, el número de células DCX⁺ es menor en el grupo de LP en comparación con el grupo de CP.

La proteína de migración neuronal DCX se expresa en tres tipos de células durante el proceso de diferenciación: Neuroblastos tipo 1 (NB-1), neuroblastos tipo 2 (NB-2) y neuronas inmaduras (NI) (Fig. 7). Para determinar si había diferencias en la tasa de diferenciación se identificaron estos tres tipos celulares basados en sus características morfológicas. Los NB-1 localizados en la ZSG, donde extienden sus procesos horizontalmente, los NB-2 localizados en la ZSG donde extienden sus procesos de manera horizontal,

sin embargo, un proceso crece de manera vertical u oblicuamente y se extiende hacia la CCG, y las NI las cuales tienen su soma en la CCG y extienden un solo proceso apical vertical que ya comienza a presentar ramificaciones y un axón basal (Fig. 17 A). El análisis mostró que el ejercicio, tanto a corto como a largo plazo, no modifica la proporción de los tres tipos celulares que expresan DCX (**NB-1**: CP CON = $17.6 \pm 1.07\%$; CP RUN = $16.7 \pm 0.84\%$; LP CON = $15.3 \pm 0.81\%$, LP RUN = $13.6 \pm 1.6\%$; **NB-2**: CP CON = $31.5 \pm 0.98\%$; CP RUN = $29.5 \pm 0.78\%$; LP CON = $33.1 \pm 1.18\%$; LP RUN = $32.3 \pm 1.20\%$; **NI**: CP CON = $51 \pm 1.37\%$; CP RUN = $53.75 \pm 0.86\%$; LP CON = $51.6 \pm 1.21\%$; LP RUN = $54.1 \pm 2.54\%$; $p > 0.05$), lo que sugiere que ni el ejercicio ni la edad modifican el proceso de maduración. El porcentaje de neuronas inmaduras fue mayor con respecto al de los neuroblastos (Aprox. 50 %; Fig. 17 B).

A



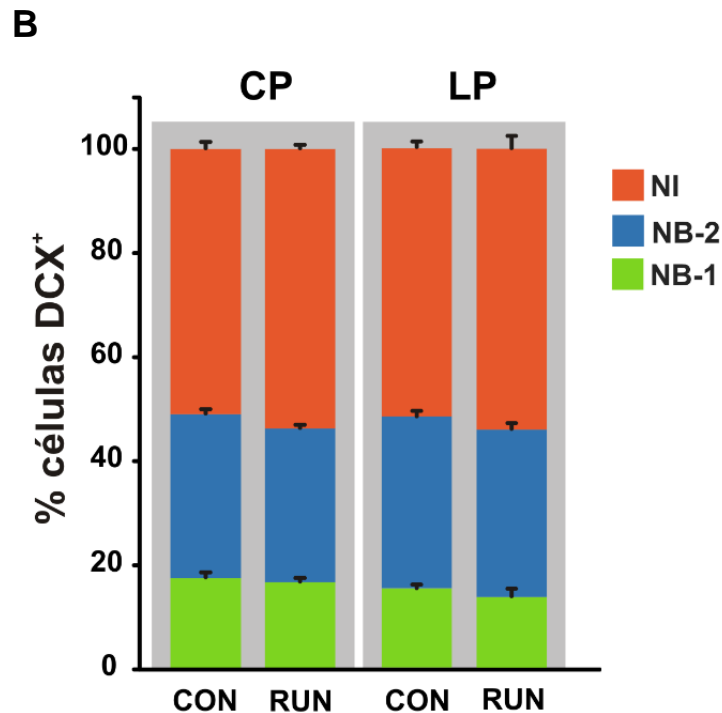


Figura 17. El ejercicio no modifica la proporción de la tasa de diferenciación. (A) Microfotografía representativa de los tres tipos celulares que expresan doblecortina (DCX⁺): Neuroblasto tipo 1 (NB-1), neuroblasto tipo 2 (NB-2) y neurona inmadura (NI) en el giro dentado del hipocampo, en un corte horizontal. Escala a 10 μ m. (B) Grafica que muestra el porcentaje de NB-1, NB-2 y NI en ratones controles (CON) y en condición de ejercicio (RUN) de los grupos a corto (CP) y largo plazo (LP). La proporción de células DCX⁺ es similar tanto en controles como en corredores en ambos grupos. La proporción de NI es mayor en comparación de los NB-1 y NB-2.

5.5.1 El ejercicio incrementa los niveles de neurogénesis, sin embargo, estos niveles no se mantienen a través de periodos largos de ejercicio.

Para determinar si el incremento en la neurogénesis hipocampal se mantiene durante periodos largos de tiempo, ratones macho de la cepa C57Bl/6 recibieron una inyección intraperitoneal de BrdU (50 mg/kg/día) durante 5 días. Los ratones del grupo a corto plazo (CON y RUN) recibieron la primera inyección 3 días después de haber sido colocados en su respectiva

condición experimental (Fig. 18 A). Los ratones del grupo a largo plazo (CON y RUN) recibieron la primera inyección 6 meses después de haber sido colocados en su respectiva condición experimental (Fig. 18 B). Los ratones fueron sacrificados 1 mes después de la primera inyección de BrdU. Las células BrdU⁺ presentes en la capa de células granulares del giro dentado fueron cuantificadas a través del eje dorso-ventral (Fig. 19 A). El análisis mostró que, al igual que las células DCX⁺, el tiempo de experimentación (CP o LP), el cual está asociado con la edad de los ratones, disminuye significativamente el número de células BrdU⁺ ($F_{(1,20)} = 63.97$; $p < 0.0001$). El ejercicio incrementó significativamente el número de células BrdU⁺ (CP CON = 1304 ± 102 vs CP RUN = 2892 ± 348 ; LP CON = 367 ± 65 vs LP RUN = 591 ± 70 ; $F_{(1,22)} = 20.01$, $p = 0.0002$). Sin embargo, el incremento sólo fue significativo en el grupo de ejercicio a corto plazo ($p < 0.001$). Al comparar el incremento en el número de células BrdU⁺ entre ratones en condición de ejercicio a corto y largo plazo el análisis mostró que éste fue significativamente menor en el grupo de ejercicio a largo plazo ($p < 0.0001$, Fig. 19 B). Este incremento corresponde a un 221.71% para el ejercicio a CP y a un 160.82% para el ejercicio a LP, respecto a la condición sedentaria.

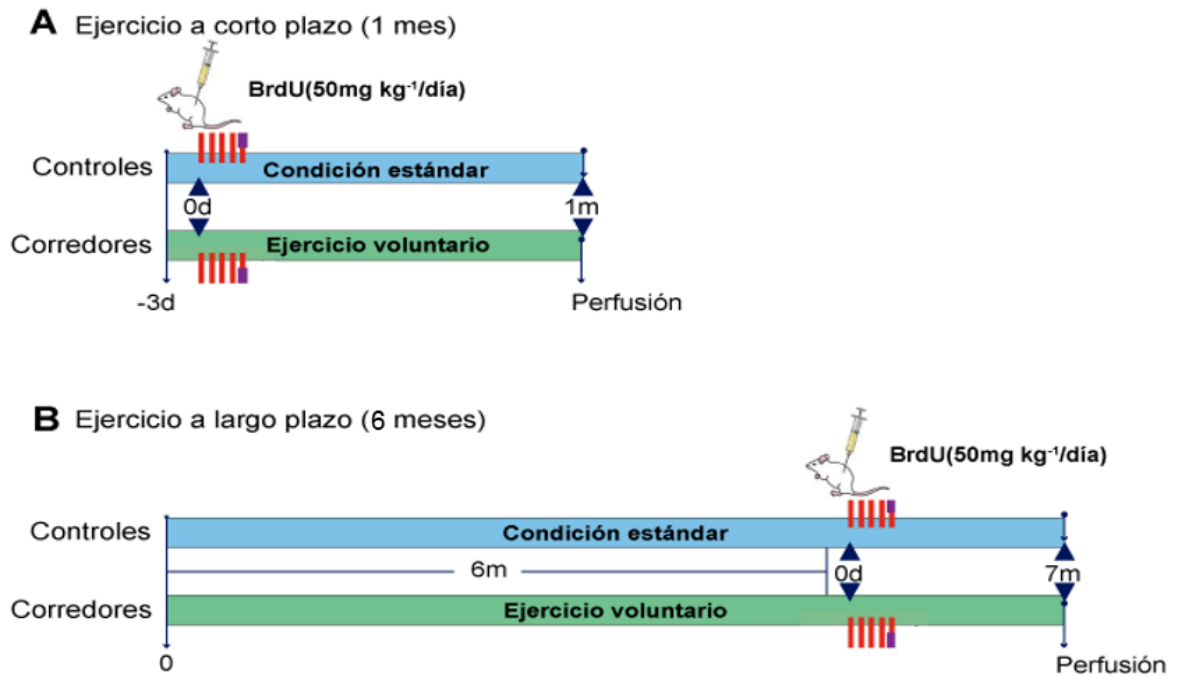
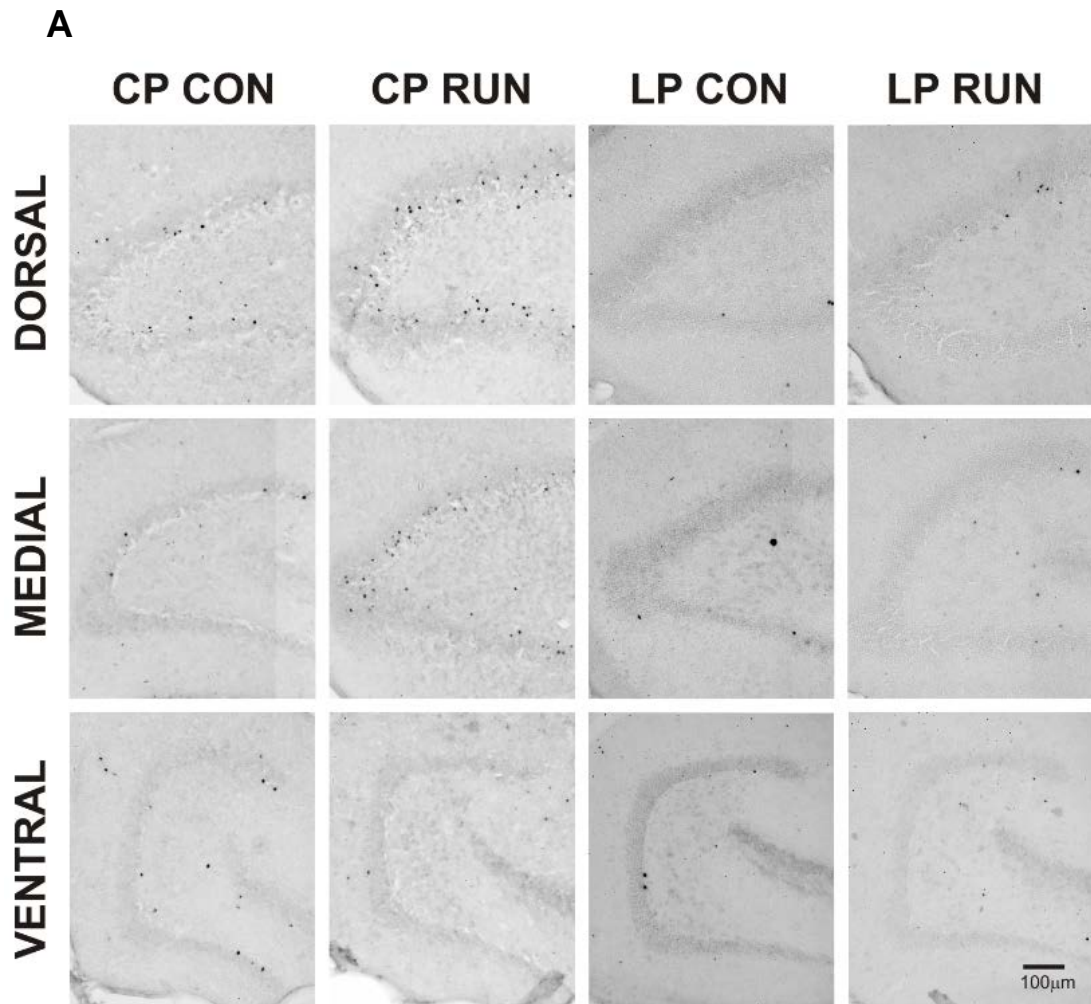


Figura 18. Cronograma del diseño experimental para determinar el efecto del ejercicio en la neurogénesis hipocampal. (A) Diseño experimental para determinar el efecto del ejercicio a corto plazo. Ratones controles y corredores fueron inyectados i.p con BrdU (50 mg kg⁻¹/ día) durante 5 días. La inyección se inició 3 días después de haberse colocado en su respectiva condición experimental y fueron perfundidos 1 mes después. (B) Diseño experimental para determinar el efecto del ejercicio a largo plazo. Ratones controles y corredores fueron inyectados i.p con BrdU (50 mg kg⁻¹/ día) durante 5 días. La inyección se inició 6 meses después de haber sido colocados en su respectiva condición experimental y fueron perfundidos 1 mes después.



B

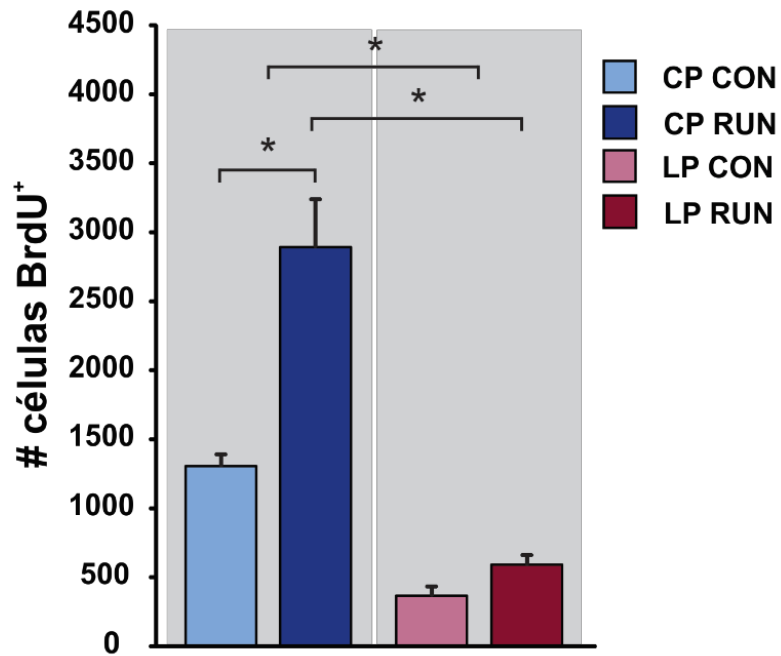


Figura 19. El ejercicio a largo plazo no incrementa los niveles de neurogénesis en la misma proporción que el ejercicio a corto plazo. (A) Fotomicrografías representativas de células BrdU⁺ en el giro dentado a través del eje dorso-ventral en cortes horizontales de ratones control (CON) y condición de ejercicio (RUN) de los grupos a corto plazo (CP) y largo plazo (LP). Escala a 100 μ m. (B) El número de células DCX⁺ es mayor en los ratones en condiciones de ejercicio en comparación con los ratones controles. Sin embargo, el número de células DCX⁺ es menor en el grupo de LP en comparación con el grupo de CP.

5.5.2 El efecto neurogénico del ejercicio es en la región dorsal, aunque no en la misma magnitud entre periodos cortos y largos de ejercicio.

Para determinar si el efecto neurogénico del ejercicio es homogéneo a través del eje dorso-ventral del hipocampo, el hipocampo fue dividido en región dorsal, media y ventral. El análisis mostró que el tiempo de experimentación, el cual está estrechamente relacionado con la edad de los ratones, disminuye

el número de células BrdU⁺ en la región dorsal, media y ventral del hipocampo (Dorsal: CP CON = 1486 ± 118 vs CP RUN = 2565 ± 336; LP CON = 291 ± 63 vs LP RUN = 471 ± 47; $F_{(1,22)} = 69.1$, $p < 0.0001$; Medial: CP CON = 192 ± 43 vs CP RUN = 207 ± 33; LP CON = 44 ± 7 vs LP RUN = 72 ± 20; $F_{(1,22)} = 24.6$, $p < 0.0001$; Ventral: CP CON = 158 ± 21 vs CP RUN = 121 ± 20; LP CON = 33 ± 7 vs LP RUN = 48 ± 12; $F_{(1,22)} = 36.2$, $p < 0.0001$). Sin embargo, el efecto neurogénico del ejercicio se observa en la región dorsal ($F_{(1,22)} = 10.13$, $p = 0.0043$). Sin embargo, este efecto solo fue significativo en el ejercicio a corto plazo ($p < 0.001$). En esta región, el número de células BrdU⁺ es significativamente menor en el grupo de ejercicio a largo plazo ($p < 0.001$; Fig. 20).

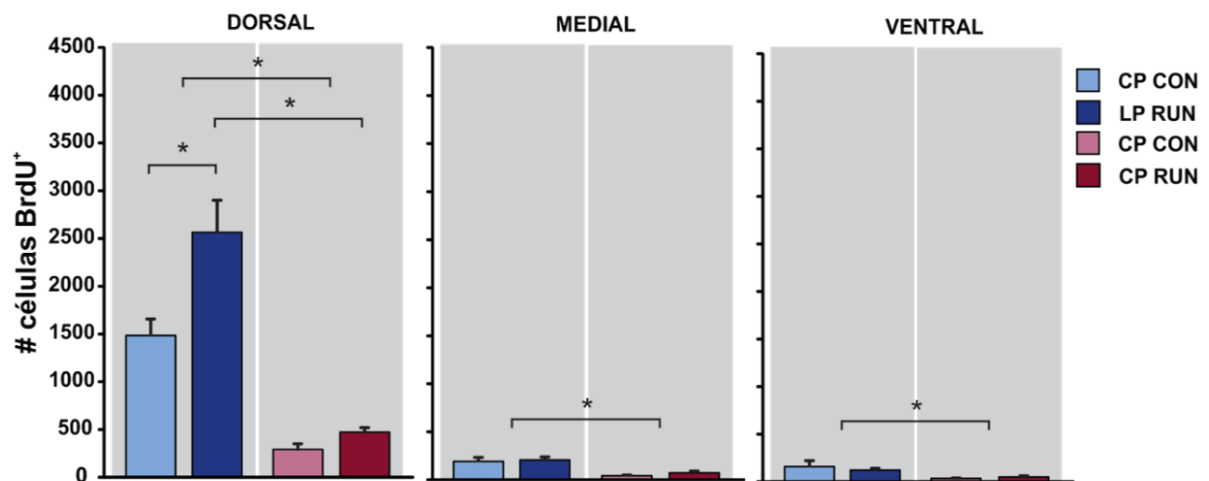


Figura 20. El efecto neurogénico del ejercicio ocurre en la región dorsal del hipocampo.

El número de células BrdU⁺ es significativamente menor en el grupo de ejercicio a largo plazo (LP) tanto en controles (CON) como en corredores (RUN) a diferencia del grupo de ejercicio a corto plazo (CP). Además el incremento en el número de células BrdU⁺ generado por el ejercicio es mayor en la región dorsal en comparación con la región medial y ventral. Así mismo, el efecto neurogénico generado por el ejercicio a largo plazo no es de la misma magnitud que el generado por el ejercicio a corto plazo.

5.6 El ejercicio incrementa el porcentaje de células nuevas con fenotipo neuronal

Para determinar el fenotipo neuronal de las células BrdU⁺ se realizó un doble marcaje por inmunofluorescencia para BrdU y el marcador neuronal NeuN. El análisis mostró que en condiciones control, el tiempo de experimentación (CP o LP), el cual está asociado con la edad de los sujetos de experimentación, disminuye significativamente el porcentaje de células con doble marcaje BrdU⁺/NeuN⁺ ($p < 0.05$). El ejercicio incrementó significativamente el número de células BrdU⁺/NeuN⁺ tanto para la condición de ejercicio a corto plazo, como para la condición de ejercicio a largo plazo ($F_{(1,12)} = 37.32$; $p < 0.05$; Fig. 21), en ambas condiciones el incremento es a niveles similares (75.13% y 70.32%, respectivamente). En conjunto, los datos muestran que si bien el número de células BrdU⁺ es similar entre las condiciones control y de ejercicio a largo plazo, el ejercicio si incrementa el número de células nuevas con fenotipo neuronal, lo que sugiere que el ejercicio a largo plazo incrementa la neurogénesis, aunque no en los niveles observados al inicio de un periodo de ejercicio.

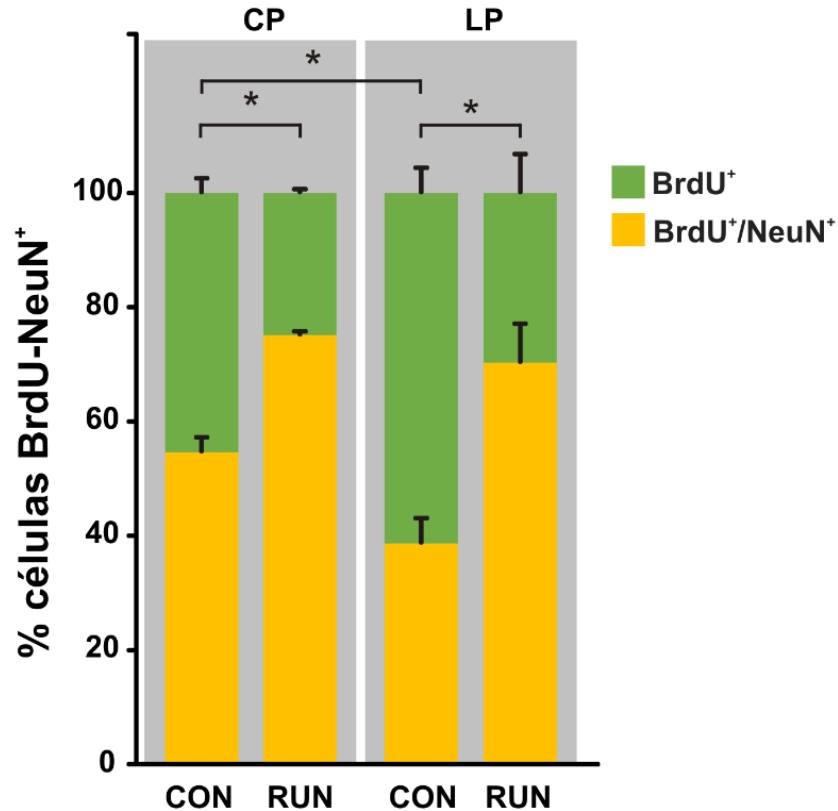


Figura 21. El ejercicio incrementa los niveles de maduración celular. El porcentaje de células BrdU⁺ es mayor en los ratones control del grupo LP en comparación con los ratones control del grupo CP; en condiciones de ejercicio el porcentaje de células BrdU⁺/NeuN⁺ incrementa significativamente.

5.7 El incremento de la neurogénesis es independiente de la distancia.

Para determinar si el efecto neurogénico del ejercicio es dependiente de la distancia corrida se realizó una correlación entre el número de células BrdU⁺ y la distancia total corrida (km). El análisis de la regresión lineal entre ambos parámetros mostró que no existe una correlación para ninguna de las condiciones de ejercicio (CP: $r = 0.08$, $p = 0.54$; LP: $r = 0.17$, $p = 0.42$) (Fig. 22).

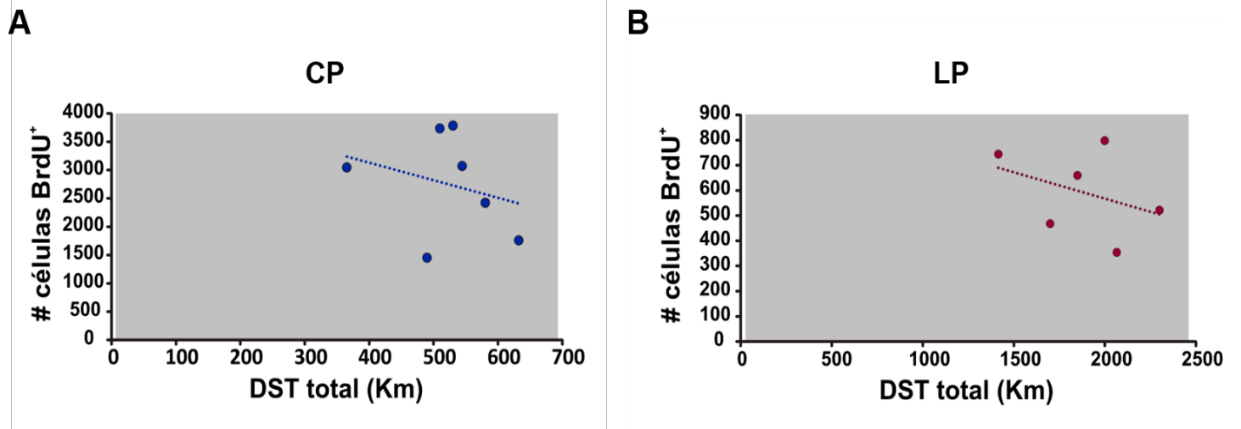


Figura 22. El efecto neurogénico del ejercicio no depende de la distancia corrida.

Correlación de los niveles de neurogénesis con la distancia total recorrida en kilómetros durante un periodo de ejercicio a corto plazo (CP) y a largo plazo (LP).

6. Discusión

El presente trabajo muestra que el ejercicio, tanto a corto como a largo plazo, tiene un impacto importante en el mantenimiento del peso corporal. A nivel cerebral, el efecto del ejercicio en la neurogénesis del GD es diferencial, el cual depende del tiempo en que el sujeto ha sido expuesto a condiciones de ejercicio. Específicamente, nuestros resultados mostraron que si bien los ratones se mantienen corriendo de forma voluntaria por periodos prolongados de tiempo (7 meses), el incremento en los niveles de diferenciación y maduración celular no es mantenido por periodos prolongados de ejercicio (7 meses). Esto sugiere que los mecanismos que median la plasticidad neuronal, incluida la neurogénesis y la conectividad sináptica, sean diferentes dependiendo del tiempo que el sujeto ha sido expuesto a condiciones de ejercicio. Es probable que un mecanismo de homeostasis se lleve a cabo, en donde ya no es necesario un incremento de nuevas neuronas, sino que más bien, se lleven a cabo modificaciones a nivel morfológico, como un incremento en la densidad sináptica o la complejidad dendrítica, o en la conectividad de los circuitos neuronales, los cuales sean los mecanismos involucrados en prevenir o revertir el deterioro cognitivo inducido por el envejecimiento.

Previos estudios han mostrado que los ratones de la cepa C57Bl/6 pueden correr de forma voluntaria en una rueda de ejercicio por periodos de 1 a 2 meses (Clark et al., 2011; van Praag et al., 1999a). Nuestros resultados mostraron que estos ratones pueden correr de forma voluntaria por periodos aún más largos de tiempo (7 meses). Si bien hubo una disminución paulatina en la distancia promedio diaria corrida durante los 7 meses de ejercicio, los ratones permanecieron corriendo un promedio de 5 km/día. Esta disminución en la distancia diaria corrida podría estar asociada al envejecimiento de los animales. De hecho, se ha reportado que ratones de esta misma cepa con 9 meses de edad, corren en promedio 4.0 ± 0.5 km/día en una rueda similar a la

utilizada en nuestro modelo (Marlatt et al., 2012), lo que sugiere que esta disminución en la distancia podría estar asociada a la edad de los ratones.

El ejercicio es una actividad que incrementa el gasto de energía y ayuda a ajustar el balance de energía para la pérdida de peso y el mantenimiento de este (Donnelly et al., 2004). En diversos estudios se ha reportado que roedores bajo condiciones normales tienden a incrementar su peso corporal conforme avanza la edad. Sin embargo, cuando los ratones son sometidos a un periodo corto (2 meses) de ejercicio estos pierden peso corporal de manera significativa y son capaces de disminuir la expresión de biomarcadores inflamatorios que se presentan durante la obesidad en comparación con los ratones sedentarios (Carpenter et al., 2012; Patten et al., 2013). Para determinar el efecto del ejercicio a corto y a largo plazo en el peso corporal, evaluamos el peso al inicio y al final de cada protocolo de experimentación. Nuestros resultados mostraron que tanto el ejercicio a corto como a largo plazo tienen un efecto positivo en la prevención de la ganancia de peso corporal, lo que confirma la importancia del ejercicio en el mantenimiento del peso corporal.

Conforme avanza la edad, el cerebro de los individuos produce cambios importantes. Una de estas características es la pérdida del volumen hipocampal (Reichel et al., 2017). En humanos, se ha demostrado que el ejercicio es capaz de incrementar el tamaño del hipocampo hasta un 2%, revirtiendo de manera efectiva la pérdida del volumen de hasta por 2 años (Erickson et al., 2011). Para determinar si el ejercicio a corto y a largo plazo tenía impacto en el volumen cerebral del ratón, evaluamos el volumen total cerebral y el peso cerebral total. Nuestros resultados mostraron que el peso cerebral total y el ancho del cerebro no fueron modificados ni por la edad, ni por el ejercicio. Sin embargo, el largo cerebral es menor en el grupo a largo plazo (LP), esta disminución podría estar relacionada con la edad. Desafortunadamente, nuestro procedimiento experimental no nos permitió determinar los cambios específicos inducidos por el ejercicio en el tamaño del

hipocampo, por lo que la determinación del volumen total podría estar enmascarando estas modificaciones.

Estudios previos han mostrado que el envejecimiento disminuye los niveles de neurogénesis (Kuhn et al., 1996) y que esta disminución pudiera contribuir al deterioro cognitivo (Erickson y Barnes, 2003). Nuestros resultados mostraron que en condiciones control, los niveles de diferenciación celular, medida por la expresión de DCX, y de maduración, medido por el número total de células BrdU⁺, disminuyeron en el grupo control a largo plazo. Esta disminución podría estar relacionada con el envejecimiento de los roedores (Corto plazo: 1 mes de edad; largo plazo: 7 meses de edad). En ratones transgénicos que presentan una depleción de la ciclina D2 (los cuales simulan una pérdida de la neurogénesis hipocampal), se presenta de igual forma, un bajo número de células DCX⁺ (Jaholkowski et al., 2009). Se ha sugerido que la disminución en la neurogénesis durante el envejecimiento podría estar relacionado con la disminución gradual del número de células madre neurales parecidas a la glía radial (NSCs o NSPCs, por sus siglas en inglés), responsables de mantener el linaje neuronal (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). En la ZSG del giro dentado del hipocampo adulto, las NSCs al salir de su estado quiescente (estado de activación), desencadenan una serie de divisiones asimétricas, lo que conlleva a un agotamiento de la progenie a través de la diferenciación a astrocitos maduros, por lo que nunca regresan de nuevo a su estado quiescente. Esto sugiere que el agotamiento continuo del conjunto de NSCs, como consecuencia de su división, contribuyen a un decremento de la neurogénesis hipocampal y un incremento en el número de células gliales durante el envejecimiento (Encinas et al., 2011).

Investigaciones en humanos y modelos animales han mostrado que el ejercicio beneficia el aprendizaje y la memoria, reduce el riesgo de enfermedades neurodegenerativas y retarda el deterioro cognitivo relacionado con el envejecimiento (Vivar et al., 2012; Voss et al., 2013). La mejora en el aprendizaje y la memoria inducida por el ejercicio ha sido correlacionada con

un aumento en la neurogénesis hipocampal y un incremento en la plasticidad sináptica dependiente de actividad (Vivar et al., 2012). Las investigaciones han mostrado que el ejercicio voluntario durante un periodo corto de tiempo (1 mes) es capaz de incrementar la proliferación, diferenciación y maduración de las nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo. Específicamente, se ha reportado que 1 mes de ejercicio incrementa ~160% la diferenciación celular, medida a través de la expresión de DCX, con respecto a su control (Garrett et al., 2012). De forma similar, el ejercicio incrementa ~201% el número total de células BrdU⁺ que alcanzaron la maduración, de las cuales el 80% tiene un fenotipo neuronal (van Praag et al., 1999b). De manera interesante, diversos enfoques para marcar a las nuevas células, incluyendo el marcaje con BrdU y el marcaje con retrovirus, han demostrado que el incremento de las nuevas células ocurre principalmente en la región dorsal del giro dentado, incluso hasta tres veces más que en la región ventral, tanto en condiciones control como de ejercicio (Lowe et al., 2015; Snyder et al., 2009; Vivar et al., 2016). Esta regulación diferencial de la neurogénesis a lo largo del eje dorso-ventral puede reflejar diferencias funcionales entre las nuevas neuronas que nacen específicamente en la región dorsal y ventral. De hecho, se ha sugerido que la región dorsal contribuye para el procesamiento y la memoria espacial, mientras que la región ventral se considera relevante para la regulación de las emociones (Bannerman et al., 2014; Fanselow and Dong, 2010), esta idea se encuentra soportada por un reciente estudio en el que se ha determinado que el ejercicio, el cual mejora la memoria y el aprendizaje, incrementa el número de entradas aferentes desde la corteza entorrinal hacia el giro dentado, específicamente en la región dorsal, sugiriendo una mayor inervación y una mayor conectividad aunada a su funcionalidad (Vivar et al., 2016).

Hasta el momento la mayoría de las investigaciones se han limitado a determinar los efectos del ejercicio en la neurogénesis durante un periodo corto de tiempo (1 mes). Interesantemente, en estos experimentos se ha determinado el efecto del ejercicio en células que proliferan al inicio del periodo del ejercicio, las cuales pasan por el proceso de desarrollo hasta alcanzar la

maduración e integración a los circuitos neuronales hipocampales (1 mes). Si bien el ejercicio es benéfico y ayuda a reducir el riesgo de enfermedades neurodegenerativas y a retardar el deterioro cognitivo inducido por el envejecimiento, poco se conoce del efecto del ejercicio en la neurogénesis cuando el sujeto se ha mantenido ejercitándose la mayor parte de su vida adulta (7 meses).

Nuestros resultados mostraron que 1 mes de ejercicio (corto plazo) incrementó los niveles de diferenciación (expresión de DCX) y maduración celular (células BrdU⁺), en la región dorsal del GD, con un fenotipo neuronal (BrdU⁺/NeuN⁺) en comparación con el grupo control, lo cual coincide con datos previamente reportados en otros estudios (Garrett et al., 2012; van Praag et al., 1999b; Vivar et al., 2016). Sin embargo, el ejercicio a largo plazo (7 meses) no mantuvo este incremento en los niveles de diferenciación celular (expresión de DCX). Si bien el incremento en el número de células BrdU⁺ observado con 1 mes de ejercicio no fue mantenido durante un periodo mucho mayor de ejercicio (7 meses), el ejercicio si incrementó el número de células nuevas con fenotipo neuronal con respecto a su control, lo que sugiere que el ejercicio a largo plazo incrementó la neurogénesis, aunque no en los niveles observados al inicio de un periodo de ejercicio.

Una posible explicación a la reducción en los niveles de células BrdU⁺, aun cuando los ratones estuvieron en condición de ejercicio por un periodo prolongado de tiempo, es que la edad sea un factor limitante en el mantenimiento de niveles elevados de neurogénesis. Sin embargo, Marlatt y colaboradores (2012) mostraron que 2 meses de ejercicio en ratones de 9 meses de edad es capaz de incrementar los niveles de neurogénesis a los mismos niveles que los observados en ratones jóvenes, lo que nos indica que la edad no es un factor limitante en el efecto neurogénico del ejercicio (Marlatt et al., 2012). Cabe destacar que la determinación de la neurogénesis en el estudio de Marlatt y colaboradores se llevó a cabo inyectando BrdU al inicio del periodo de ejercicio, como lo han hecho los estudios previos donde se han

observado un incremento de hasta un 200% en los niveles de neurogénesis. Es probable que el incremento en la neurogénesis solo sea necesaria al inicio del periodo del ejercicio, probablemente para restablecer la perdida neuronal por nuevas neuronas funcionales e incrementar la plasticidad en el giro dentado. Sin embargo, a periodos prolongados de ejercicio ya no se necesita un incremento tan marcado en la neurogénesis del giro dentado, sino que sean otros los mecanismos involucrados, como un incremento en la plasticidad sináptica en los circuitos neuronales del hipocampo y de otras estructuras del cerebro. Estudios previos han mostrado que 1 mes de ejercicio sólo induce cambios en el giro dentado, pero no en otras áreas del hipocampo (Farmer et al., 2004; van Praag et al., 1999a). Específicamente, 1 mes de ejercicio incrementa la plasticidad sináptica, medida a través de la potenciación a largo plazo (LTP), incrementa los niveles de BDNF y ARNm de la subunidad NR2B del receptor NMDA en el giro dentado pero no en el área CA1. Interesantemente, un tiempo mayor de ejercicio (2 meses) induce plasticidad sináptica en otras áreas del cerebro involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria, como lo son la corteza entorrinal y el área CA1 del hipocampo (Stranahan et al., 2007). Estos cambios en la plasticidad sináptica podrían llevarse a cabo de manera paulatina, iniciando en el circuito hipocampal local (Sah et al., 2017) y expandiéndose a otras áreas como la corteza, cuerpos mamilares y septum (Vivar y van Praag, 2017). De hecho, de manera más reciente Vivar y colaboradores mostraron que 1 mes de ejercicio modifica los circuitos neuronales de las nuevas neuronas, lo cuales incluyen cambios en la conectividad de la corteza entorrinal, el septum y los cuerpos mamilares con las nuevas neuronas del giro dentado (Vivar et al., 2016). Todos estos hallazgos nos dan pauta para plantear la siguiente hipótesis sobre del efecto del ejercicio en el cerebro adulto (Fig.23):

Durante el envejecimiento la neurogénesis hipocampal (verde) disminuye paulatinamente, la cual se asocia con un deterioro cognitivo. Si el ejercicio es incluido tiene un efecto positivo en los procesos cognitivos. Es probable que al inicio del periodo de ejercicio se requiera un incremento sustancial en el

número de nuevas neuronas, posiblemente para reestablecer la pérdida neuronal. Al mismo tiempo se inician procesos que ayuden a incrementar la plasticidad sináptica local (hipocampo) como un incremento en la LTP, expresión de receptores, conectividad neuronal y factores neurotróficos. Si el sujeto se mantiene ejercitándose por un periodo mayor de tiempo es probable que ya no sea necesario un incremento tan marcado de la neurogénesis hipocampal (rojo), el cual pudiera ser reducido a través de un mecanismo de homeostasis. Simultáneamente, mecanismos que incrementen la plasticidad sináptica (morado punteado) o en la conectividad neuronal (azul discontinua), que involucren otras áreas del cerebro, se podrían estar llevando a cabo, lo cual ayudará a prevenir o revertir un deterioro cognitivo.

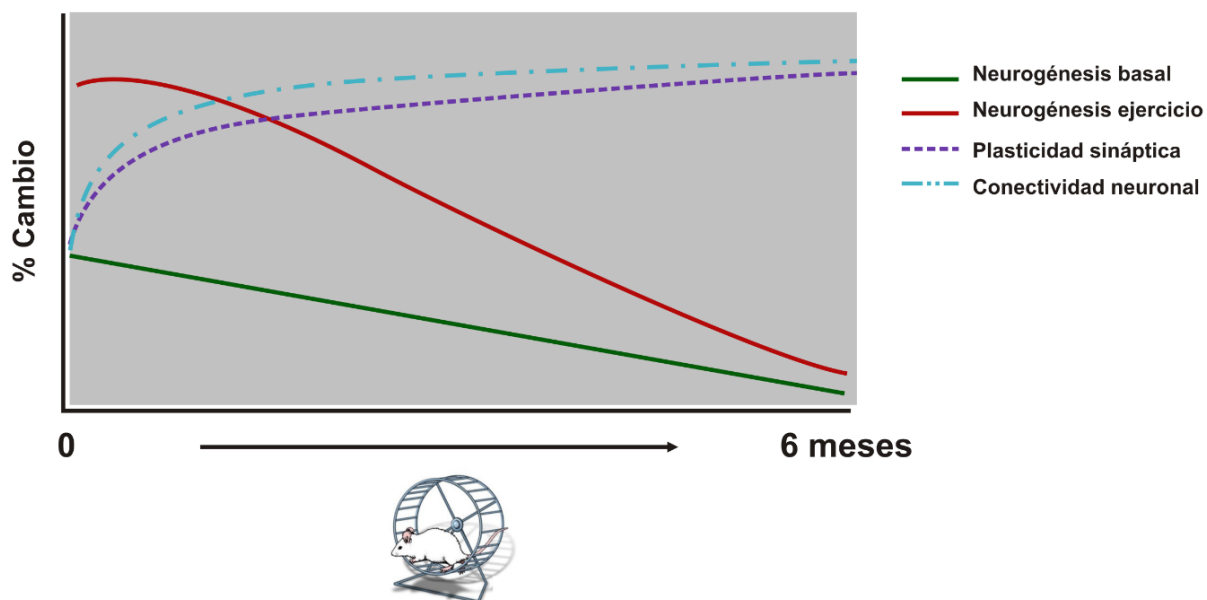


Figura 23. Hipótesis del efecto del ejercicio en el hipocampo del cerebro adulto.

7. Conclusión

El envejecimiento es sin duda uno de los factores que más influye en la neurogénesis hipocampal. En este trabajo nosotros demostramos que los ratones de la cepa C57Bl6 corren voluntariamente durante periodos prolongados de tiempo. Además, el ejercicio voluntario tanto a corto como a largo plazo, evita el incremento de peso corporal y evita la pérdida de masa cerebral. Así mismo, el ejercicio a corto plazo incrementa los niveles de diferenciación y maduración celular con un fenotipo neuronal, sin embargo, a pesar de que el ejercicio a largo plazo no mantiene este incremento en la diferenciación y el número total de células BrdU⁺, sí incrementa el número de células nuevas con fenotipo neuronal, por lo que sugerimos que el ejercicio a largo plazo aún puede incrementar la neurogénesis aunque no en los mismos niveles que los observados con el ejercicio a corto plazo.

Nuestra hipótesis general se basa en que si bien la neurogénesis disminuye durante el envejecimiento normal, el ejercicio voluntario incrementa los niveles de neurogénesis al inicio del periodo del ejercicio, sin embargo este incremento en el número total de células BrdU⁺ ya no se observa durante un periodo de ejercicio a largo plazo, posiblemente mediado por un mecanismo de homeostasis. Nosotros proponemos que son otros los mecanismos los que median la neurogénesis, tales como un incremento en la plasticidad sináptica y una mayor conectividad neuronal, los cuales a su vez, permitan una mejora cognitiva.

8. Perspectivas a futuro

A partir de los estudios y conclusiones presentados en este proyecto de Tesis de Maestría, las perspectivas de trabajo a futuro se orientan a tres objetivos.

En un primer plano estarían los trabajos destinados a completar la hipótesis general, basados en determinar las modificaciones inducidas por el ejercicio a corto y largo plazo en la plasticidad sináptica en el giro dentado, por ejemplo, con el uso del marcador de densidad post-sináptica (PSD-95), medir los niveles de BDNF y la arborización dendrítica de las células granulares del giro dentado. En segunda estancia, estarían los trabajos destinados a determinar los cambios estructurales y morfológicos inducidos por el ejercicio a corto y a largo plazo en otras áreas del hipocampo (CA3 y CA1). Y finalmente, en un tercer punto estarían los trabajos enfocados en determinar las modificaciones a los circuitos neuronales involucrados en el procesamiento cognitivo (corteza entorrinal, septum, cuerpos mamilares y el núcleo raphe).

9. Bibliografía

- Aging, N.I. on, 2012. Testing Therapies to Treat, Delay, or Prevent Alzheimer's Disease [WWW Document]. Natl. Inst. Aging. URL <https://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/2011-2012-alzheimers-disease-progress-report/testing-therapies-treat-delay-or> (accessed 1.16.17).
- Amaral, D.G., 1993. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 225–229. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(93\)90214-J](https://doi.org/10.1016/0959-4388(93)90214-J)
- Amaral, D.G., Scharfman, H.E., Lavenex, P., 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog. Brain Res.* 163, 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Amrein, I., Isler, K., Lipp, H.-P., 2011. Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *Eur. J. Neurosci.* 34, 978–987. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07804.x>
- Anderson, B.J., Rapp, D.N., Baek, D.H., McCloskey, D.P., Coburn-Litvak, P.S., Robinson, J.K., 2000. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiol. Behav.* 70, 425–429.
- Bannerman, D.M., Sprengel, R., Sanderson, D.J., McHugh, S.B., Rawlins, J.N.P., Monyer, H., Seeburg, P.H., 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 181–192. <https://doi.org/10.1038/nrn3677>
- Barnes, D.E., Yaffe, K., 2011. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* 10, 819–828. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70072-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70072-2)
- Baruch, D.E., Swain, R.A., Helmstetter, F.J., 2004. Effects of exercise on Pavlovian fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 118, 1123–1127. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.5.1123>
- Biebl, M., Cooper, C.M., Winkler, J., Kuhn, H.G., 2000. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci. Lett.* 291, 17–20.
- Blumenthal, J.A., Babyak, M.A., Moore, K.A., Craighead, W.E., Herman, S., Khatri, P., Waugh, R., Napolitano, M.A., Forman, L.M., Appelbaum, M., Doraiswamy, P.M., Krishnan, K.R., 1999. Effects of exercise training on older patients with major depression. *Arch. Intern. Med.* 159, 2349–2356.
- Brandt, M.D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., von der Behrens, W., Kempermann, G., 2003. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 603–613.
- Cameron, H.A., Hazel, T.G., McKay, R.D., 1998. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J. Neurobiol.* 36, 287–306.
- Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., Gould, E., 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337–344.
- Carpenter, K.C., Strohacker, K., Breslin, W.L., Lowder, T.W., Agha, N.H., McFarlin, B.K., 2012. Effects of Exercise on Weight Loss and Monocytes in Obese Mice. *Comp. Med.* 62, 21–26.
- Cicconetti, P., Riolo, N., Priami, C., Tafaro, L., Ettore, E., 2004. [Risk factors for cognitive impairment]. *Recenti Prog. Med.* 95, 535–545.

- Clark, P.J., Brzezinska, W.J., Puchalski, E.K., Krone, D.A., Rhodes, J.S., 2009. Functional Analysis of Neurovascular Adaptations to Exercise in the Dentate Gyrus of Young Adult Mice Associated With Cognitive Gain. *Hippocampus* 19, 937–950. <https://doi.org/10.1002/hipo.20543>
- Clark, P.J., Kohman, R.A., Miller, D.S., Bhattacharya, T.K., Brzezinska, W.J., Rhodes, J.S., 2011. Genetic influences on exercise-induced adult hippocampal neurogenesis across 12 divergent mouse strains. *Genes Brain Behav.* 10, 345–353. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00674.x>
- Craik, F.I.M., 1994. Memory Changes in Normal Aging. *Curr. Dir. Psychol. Sci.* 3, 155–158.
- Creer, D.J., Romberg, C., Saksida, L.M., van Praag, H., Bussey, T.J., 2010. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2367–2372. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911725107>
- Diagnóstico socio-demográfico del envejecimiento en México | Consejo Nacional de Población CONAPO [WWW Document], n.d. URL http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Diagnostico_socio_demografico_del_envejecimiento_en_Mexico (accessed 11.11.16).
- Donnelly, J.E., Smith, B., Jacobsen, D.J., Kirk, E., Dubose, K., Hyder, M., Bailey, B., Washburn, R., 2004. The role of exercise for weight loss and maintenance. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 1009–1029. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2004.06.022>
- Eadie, B.D., Redila, V.A., Christie, B.R., 2005. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *J. Comp. Neurol.* 486, 39–47. <https://doi.org/10.1002/cne.20493>
- Encinas, J.M., Michurina, T.V., Peunova, N., Park, J.-H., Tordo, J., Peterson, D.A., Fishell, G., Koulakov, A., Enikolopov, G., 2011. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 8, 566–579. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
- Encinas, J.M., Vaahtokari, A., Enikolopov, G., 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8233–8238. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601992103>
- Erickson, C.A., Barnes, C.A., 2003. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp. Gerontol.* 38, 61–69.
- Erickson, K.I., Voss, M.W., Prakash, R.S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., Kim, J.S., Heo, S., Alves, H., White, S.M., Wojcicki, T.R., Mailey, E., Vieira, V.J., Martin, S.A., Pence, B.D., Woods, J.A., McAuley, E., Kramer, A.F., 2011. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3017–3022. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015950108>
- Erickson, K.I., Weinstein, A.M., Lopez, O.L., 2012. Physical activity, brain plasticity, and Alzheimer’s disease. *Arch. Med. Res.* 43, 615–621. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.09.008>
- Fanselow, M.S., Dong, H.-W., 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Farmer, J., Zhao, X., van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F.H., Christie, B.R., 2004. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience* 124, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.029>
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L.P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., Kempermann, G., 2003. Subpopulation of nestin-expressing

- progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 373–382.
- Fordyce, D.E., Farrar, R.P., 1991. Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning. *Behav. Brain Res.* 46, 123–133.
- Garrett, L., Lie, D.C., Hrabé de Angelis, M., Wurst, W., Höltter, S.M., 2012. Voluntary wheel running in mice increases the rate of neurogenesis without affecting anxiety-related behaviour in single tests. *BMC Neurosci.* 13, 61. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-61>
- Glisky, E.L., 2007. Changes in Cognitive Function in Human Aging, in: Riddle, D.R. (Ed.), *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*, Frontiers in Neuroscience. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Gómez-Pinilla, F., Dao, L., So, V., 1997. Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Res.* 764, 1–8.
- Gonçalves, J.T., Schafer, S.T., Gage, F.H., 2016. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897–914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>
- Gratzner, H.G., 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218, 474–475.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., Götz, M., 2001. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* 229, 15–30. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9962>
- Hedden, T., Gabrieli, J.D.E., 2004. Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 87–96. <https://doi.org/10.1038/nrn1323>
- Jaholkowski, P., Kiryk, A., Jedynek, P., Abdallah, N.M.B., Knapska, E., Kowalczyk, A., Piechal, A., Blecharz-Klin, K., Figiel, I., Liudyno, V., Widy-Tyszkiewicz, E., Wilczynski, G.M., Lipp, H.-P., Kaczmarek, L., Filipkowski, R.K., 2009. New hippocampal neurons are not obligatory for memory formation; cyclin D2 knockout mice with no adult brain neurogenesis show learning. *Learn. Mem.* 16, 439–451. <https://doi.org/10.1101/lm.1459709>
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., Gage, F.H., 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Dev. Camb. Engl.* 130, 391–399.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27, 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.013>
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H., 1998. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 3206–3212.
- Klempin, F., Kempermann, G., 2007. Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 257, 271–280. <https://doi.org/10.1007/s00406-007-0731-5>
- Kobilo, T., Liu, Q.-R., Gandhi, K., Mughal, M., Shaham, Y., Praag, H. van, 2011. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn. Mem.* 18, 605–609. <https://doi.org/10.1101/lm.2283011>
- Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A., 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
- Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Bunk, E., Wolf, C., Ehninger, D., Kempermann, G., 2006. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse

- dentate gyrus. *Neurobiol. Aging* 27, 1505–1513.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.016>
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M.D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., Kempermann, G., 2003. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J. Comp. Neurol.* 467, 455–463. <https://doi.org/10.1002/cne.10945>
- Krum, J.M., Mani, N., Rosenstein, J.M., 2002. Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience* 110, 589–604.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H., 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 2027–2033.
- Larson, E.B., Wang, L., Bowen, J.D., McCormick, W.C., Teri, L., Crane, P., Kukull, W., 2006. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann. Intern. Med.* 144, 73–81.
- Levitt, P., Rakic, P., 1980. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J. Comp. Neurol.* 193, 815–840. <https://doi.org/10.1002/cne.901930316>
- Lewis, P.F., Emerman, M., 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 68, 510–516.
- Lorente de Nó, R., 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex. II, II. Johann Ambrosius Barth, Leipzig.
- Lowe, A., Dalton, M., Sidhu, K., Sachdev, P., Reynolds, B., Valenzuela, M., 2015. Neurogenesis and precursor cell differences in the dorsal and ventral adult canine hippocampus. *Neurosci. Lett.* 593, 107–113.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.017>
- Marlatt, M.W., Potter, M.C., Lucassen, P.J., van Praag, H., 2012. Running throughout middle age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. *Dev. Neurobiol.* 72, 943–952.
<https://doi.org/10.1002/dneu.22009>
- Mignone, J.L., Kukekov, V., Chiang, A.-S., Steindler, D., Enikolopov, G., 2004. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 469, 311–324.
<https://doi.org/10.1002/cne.10964>
- Ming, G.-L., Song, H., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>
- Ming, G., Song, H., 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 223–250.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459>
- Moon, H.Y., Becke, A., Berron, D., Becker, B., Sah, N., Benoni, G., Janke, E., Lubejko, S.T., Greig, N.H., Mattison, J.A., Duzel, E., van Praag, H., 2016. Running-Induced Systemic Cathepsin B Secretion Is Associated with Memory Function. *Cell Metab.* 24, 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.025>
- Nabkasorn, C., Miyai, N., Sootmongkol, A., Junprasert, S., Yamamoto, H., Arita, M., Miyashita, K., 2006. Effects of physical exercise on depression, neuroendocrine stress hormones and physiological fitness in adolescent females with depressive symptoms. *Eur. J. Public Health* 16, 179–184.
<https://doi.org/10.1093/eurpub/cki159>

- Neeper, S.A., Gómez-Pinilla, F., Choi, J., Cotman, C.W., 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 726, 49–56.
- OMS | Envejecimiento y ciclo de vida [WWW Document], n.d. URL http://www.who.int/features/factfiles/ageing/ageing_facts/es/ (accessed 1.13.17).
- Patten, A.R., Sickmann, H., Hryciw, B.N., Kucharsky, T., Parton, R., Kernick, A., Christie, B.R., 2013. Long-term exercise is needed to enhance synaptic plasticity in the hippocampus. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 20, 642–647. <https://doi.org/10.1101/lm.030635.113>
- Pereira, A.C., Huddleston, D.E., Brickman, A.M., Sosunov, A.A., Hen, R., McKhann, G.M., Sloan, R., Gage, F.H., Brown, T.R., Small, S.A., 2007. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5638–5643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611721104>
- Rabadi, M.H., 2007. Randomized clinical stroke rehabilitation trials in 2005. *Neurochem. Res.* 32, 807–821. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9211-y>
- Redila, V.A., Christie, B.R., 2006. Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience* 137, 1299–1307. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.050>
- Reichel, J.M., Bedenk, B.T., Czisch, M., Wotjak, C.T., 2017. Age-related cognitive decline coincides with accelerated volume loss of the dorsal but not ventral hippocampus in mice. *Hippocampus* 27, 28–35. <https://doi.org/10.1002/hipo.22668>
- Rhodes, J.S., Garland, T., Gammie, S.C., 2003. Patterns of brain activity associated with variation in voluntary wheel-running behavior. *Behav. Neurosci.* 117, 1243–1256. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.6.1243>
- Rodríguez, J.J., Noristani, H.N., Olabarria, M., Fletcher, J., Somerville, T.D.D., Yeh, C.Y., Verkhatsky, A., 2011. Voluntary running and environmental enrichment restores impaired hippocampal neurogenesis in a triple transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Curr. Alzheimer Res.* 8, 707–717.
- Sah, N., Peterson, B.D., Lubejko, S.T., Vivar, C., van Praag, H., 2017. Running reorganizes the circuitry of one-week-old adult-born hippocampal neurons. *Sci. Rep.* 7, 10903. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11268-z>
- Salthouse, T.A., Ferrer-Caja, E., 2003. What needs to be explained to account for age-related effects on multiple cognitive variables? *Psychol. Aging* 18, 91–110.
- Scoville, W.B., Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.
- Shetty, A.K., Hattiangady, B., Shetty, G.A., 2005. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia* 51, 173–186. <https://doi.org/10.1002/glia.20187>
- Singh, N.A., Stavrinou, T.M., Scarbek, Y., Galambos, G., Liber, C., Fiatarone Singh, M.A., 2005. A randomized controlled trial of high versus low intensity weight training versus general practitioner care for clinical depression in older adults. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 60, 768–776.
- Snyder, J.S., Radik, R., Wojtowicz, J.M., Cameron, H.A., 2009. Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus* 19, 360–370. <https://doi.org/10.1002/hipo.20525>

- Song, H., Stevens, C.F., Gage, F.H., 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39–44. <https://doi.org/10.1038/417039a>
- Stranahan, A.M., Khalil, D., Gould, E., 2007. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus* 17, 1017–1022. <https://doi.org/10.1002/hipo.20348>
- Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., Moser, E.I., 2014. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Strawbridge, W.J., Deleger, S., Roberts, R.E., Kaplan, G.A., 2002. Physical activity reduces the risk of subsequent depression for older adults. *Am. J. Epidemiol.* 156, 328–334.
- Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., Gage, F.H., 2006. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442, 929–933. <https://doi.org/10.1038/nature05028>
- Trejo, J.L., Carro, E., Torres-Aleman, I., 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 1628–1634.
- van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H., 1999a. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13427–13431.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 1999b. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2, 266–270. <https://doi.org/10.1038/6368>
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030–1034. <https://doi.org/10.1038/4151030a>
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., Gage, F.H., 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 8680–8685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005>
- Vaynman, S., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2004. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2580–2590. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03720.x>
- Vivar, C., Peterson, B.D., van Praag, H., 2016. Running rewires the neuronal network of adult-born dentate granule cells. *NeuroImage* 131, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.11.031>
- Vivar, C., Potter, M.C., Choi, J., Lee, J.-Y., Stringer, T.P., Callaway, E.M., Gage, F.H., Suh, H., van Praag, H., 2012. Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nat. Commun.* 3, 1107. <https://doi.org/10.1038/ncomms2101>
- Vivar, C., van Praag, H., 2017. Running Changes the Brain: the Long and the Short of It. *Physiol. Bethesda Md* 32, 410–424. <https://doi.org/10.1152/physiol.00017.2017>
- Vivar, C., van Praag, H., 2013. Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Front. Neural Circuits* 7, 15. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00015>
- Voss, M.W., Vivar, C., Kramer, A.F., van Praag, H., 2013. Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends Cogn. Sci.* 17, 525–544. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.08.001>
- Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M., Mori, K., 2000. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* 11, 1991–1996.

- Zhao, C., Deng, W., Gage, F.H., 2008. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell* 132, 645–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Ming, G., Gage, F.H., 2006. Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 3–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006>