



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.**

UNIDAD: ZACATENCO

DEPARTAMENTO: FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS.

Diferencias sexuales en el efecto del ejercicio en la neurogénesis  
hipocampal

**Proyecto que presenta**

Bióloga María Belén Melo Munive

Para obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias**

**En la Especialidad**

Neurobiología Celular y Molecular

**Directora del proyecto:** Dra. María del Carmen Vivar Estudillo

México CDMX

Noviembre, 2017

Esta tesis fue desarrollada bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Vivar Estudillo, profesor titular del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Esta tesis fue realizada dentro del proyecto INFRA-2016 268247 subvencionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, cuyo responsable es la Dra. María del Carmen Vivar Estudillo.

Durante la realización de esta tesis conté con el apoyo de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-587870) y con un complemento otorgado por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

## ***DEDICATORIA***

A mis padres por sus consejos, por la motivación constante, por haberme apoyado en todo momento, por su comprensión y confianza, pero sobre todo, por su amor. A mi hermano por apoyarme siempre y porque gracias a ustedes estoy donde estoy.

A mi abuelita Margarita por ser un ejemplo de perseverancia y constancia, por el valor mostrado para salir adelante y por su cariño.

A mi compañero de vida, Airy, por su amor, comprensión, paciencia, por sus enseñanzas y porque me ha hecho fuerte cuando más lo he necesitado.

A las mujeres que contribuyeron a construir lo que ahora soy, Ime, Yolita e Irma, gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. María del Carmen Vivar Estudillo por el apoyo, asesoría, dirección en el desarrollo de esta tesis y sobre todo por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.

A los Doctores Jorge Aceves Ruíz y José Segovia Vila por sus valiosas observaciones y sugerencias al presente trabajo.

Al M. en C. Jorge Airy Mercado Gutiérrez por sus enseñanzas y valiosas sugerencias al presente trabajo.

A la M. en C. Socorro Islas y a Armando Sandoval por su excelente asistencia técnica.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Fany, Cristian, Ana, Carmen, Gabriela, Axel y Víctor por haberme apoyado a realizar este trabajo y por compartir sus conocimientos.

A mis amigos y compañeros de generación Ernesto, Víctor, Gerardo, y Eduardo por su amistad y apoyo en los cursos.

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
El envejecimiento y el deterioro cognitivo .....	3
Procesos cognitivos y diferencias sexuales .....	3
El ejercicio y su efecto en los procesos cognitivos.....	4
El ejercicio y el hipocampo.....	5
Neurogénesis del cerebro adulto .....	6
De célula troncal a neurona .....	8
a. Proceso de proliferación .....	8
b. Diferenciación y migració .....	9
c. Supervivencia.....	9
d. Maduración .....	10
Neurogénesis y el ejercicio .....	12
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	15
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	15
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	16
i. Animales.....	16
ii. Inyecciones de BrdU .....	16
ii.i Determinación de proliferación celular.....	17
ii.ii Determinación de diferenciación celular .....	17
ii.iii Determinación de maduración celular .....	17
iii. Perfusión y preparación de muestras para análisis .....	17

iv. Inmunohistoquímica.....	18
v. Conteo de células BrdU+ .....	18
vi. Inmunofluorescencia .....	19
vii. Análisis estadístico.....	19

## **RESULTADOS** ..... 21

i. Ratones macho y hembra corren distancias similares.....	21
ii. El ejercicio incrementa de manera similar la proliferación celular en el giro dentado de machos y hembras .....	22
ii.i El ejercicio incrementa la proliferación celular en la porción dorsal del giro dentado .....	25
ii.ii En machos, la proliferación celular se correlaciona con la distancia corrida .	27
iii. El ejercicio incrementa la diferenciación celular en el giro dentado de machos y hembras .....	28
iii.i El ejercicio incrementa la diferenciación celular en la porción dorsal del giro dentado .....	31
iii.ii El incremento en la diferenciación celular no depende de la distancia corrida .....	33
iv. El ejercicio incrementa de manera similar la maduración celular en el giro dentado de machos y hembras .....	34
iv.i El ejercicio incrementa el porcentaje de células nuevas con fenotipo neuronal .....	37
iv.ii El ejercicio incrementa la maduración celular en la porción dorsal del giro dentado .....	39

iv.iii	La distancia que las hembras corren correlaciona con el número de células nuevas que sobreviven y alcanzan su madurez.....	42
v.	El ejercicio modula de manera diferente el proceso neurogénico en machos y hembras.....	43
	<b>DISCUSIÓN</b> .....	47
	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	54
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	55

## RESUMEN

La neurogénesis persiste a través de la vida en el hipocampo de los mamíferos adultos, incluido los humanos. La continua incorporación de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo es considerada relevante para el aprendizaje y la memoria. Durante el envejecimiento, los niveles de neurogénesis se ven disminuidos, lo cual correlaciona con un deterioro en los procesos cognitivos. Una forma de revertir estos efectos es mediante el ejercicio, el cual se ha demostrado incrementa los niveles de neurogénesis, mejora el aprendizaje y la memoria y previene el deterioro cognitivo inducido durante la enfermedad de Alzheimer. Interesantemente, la mayor incidencia de casos de la enfermedad de Alzheimer se observa en mujeres y se ha mostrado que existen diferencias en ciertas capacidades cognitivas entre hombres y mujeres. Hasta el momento, se desconoce si estas diferencias podrían estar influenciadas por las diferencias en los niveles de neurogénesis en el hipocampo cuando aún no existe ningún indicio de padecer alguna discapacidad cognitiva y si el efecto del ejercicio podría ser diferencial entre sexos. Para explorar esta posibilidad, se evaluaron los niveles de neurogénesis a través de sus diferentes estadios (proliferación, diferenciación y maduración) en ratones macho y hembra de la cepa C57Bl6 en condición control y de ejercicio. Los resultados mostraron que machos y hembras tienen los mismos niveles de neurogénesis. El ejercicio incrementó el número total de células nuevas en las tres fases de la neurogénesis preferencialmente en la porción dorsal y medial del giro dentado. Este incremento fue de la misma magnitud para ambos sexos en la fase de proliferación y maduración, no así en la fase de diferenciación, donde las hembras presentan un mayor número de células nuevas. Interesantemente, la proliferación celular, la sobrevivencia y maduración de las nuevas neuronas es diferencialmente regulada por la distancia que los ratones corren. Estos resultados muestran que el efecto del ejercicio en los niveles de neurogénesis es similar entre sexos. Sin embargo, nuestros resultados muestran que el proceso de neurogénesis durante el ejercicio es diferente entre machos y hembras.



## **Abstract**

Neurogenesis persists through life on the hippocampus of adult mammals, including humans. The continuous incorporation of new neurons into the dentate gyrus of the hippocampus is considered relevant for memory and learning. During aging, neurogenesis levels are reduced, which correlates with deterioration of the cognitive processes. A way to reverse these effects is by means of exercise, which has been demonstrated increases neurogenesis levels, improves learning and memory, and prevents cognitive decline induced during Alzheimer's disease. Interestingly, the biggest incidence of Alzheimer's disease is observed on women and it has been shown that there are differences on certain cognitive abilities between men and women. Until now, it is unknown if these differences may be influenced by differences on neurogenesis levels in the hippocampus, even when there are no indications of cognitive decline or if the effect of exercise could be differential between sexes. To explore this possibility, the levels of neurogenesis were evaluated through their different stages (proliferation, differentiation and maturation) in male and female C57Bl6 under control and exercise conditions. The results showed that male and female had the same neurogenesis levels. Exercises increased the total number of new cells on the three phases of neurogenesis, mainly in the dorsal and medial portion of the dentate gyrus. This increment was similar for cell proliferation and maturation in both sexes, but not for differentiation, where females had a higher number of new cells. Interestingly, cell proliferation, survival and maturation of the new neurons is differentially regulated by the distance that the mice run. This results show that the effect of exercise on neurogenesis levels is similar among sexes. However, exercise regulate differentially the neurogenesis process between males and females.

# **INTRODUCCIÓN**

## **El envejecimiento y el deterioro cognitivo**

En México, como en otras regiones del mundo, existe un envejecimiento poblacional acelerado, el cual no es reversible y es predominantemente femenino (Gutiérrez Robledo, 2013). En el 2000, la proporción de adultos mayores fue de alrededor de 7% y se estima que este porcentaje alcance el 12.5% y 28% en el 2020 y 2050, respectivamente (CONAPO-2013).

Al envejecer ocurren cambios orgánicos (hormonales, cognitivos, pérdida de volumen cerebral) y funcionales (disminución en habilidades motrices, visuales, de lenguaje), de éstos, los que ocurren en el desempeño cognitivo se consideran normales siempre que no alteren la funcionalidad del adulto mayor. Se sabe, que el declive cognitivo se da principalmente por la edad e inicia cuando el individuo ha llegado a la madurez fisiológica. Estudios han sugerido que éste declive inicia alrededor de los 25 años de edad (Salthouse, 2009).

Uno de los efectos claramente negativos del envejecimiento es el incremento del riesgo a padecer enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Prince y Jackson, 2009; WHO, 2015). Estos padecimientos se caracterizan por ser patologías que se desarrollan durante un período de al menos 20-30 años antes de que los síntomas se perciban. Durante este proceso, las neuronas sufren cambios morfológicos progresivos con estadios de propagación de la enfermedad (Braak et al., 1998).

## **Procesos cognitivos y diferencias sexuales**

En México, los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Gutiérrez et al., 2012) indican que el porcentaje de personas con demencia y deterioro cognitivo no demencial (DCND) es mayor en mujeres que en hombres. Interesantemente, en la enfermedad de Alzheimer (EA) el riesgo de mortalidad y la

severidad en la progresión de la enfermedad es también mayor en mujeres (Letenneur et al., 1999; Baum, 2005; Ganguli et al., 2005; Irvine et al., 2012).

Las diferencias fisiológicas entre mujeres y hombres están influenciadas principalmente por diferencias hormonales. Durante la madurez sexual, tanto en humanos como en roedores, los niveles hormonales fluctúan cíclicamente en las mujeres más que en hombres, aumentando la respuesta al estrés y la susceptibilidad a la ansiedad (Mahmoud et al., 2016). Más allá del contexto de la enfermedad, existen diferencias sexuales en ciertos dominios de la cognición, por ejemplo: las mujeres son mejores en habilidades del lenguaje, y los hombres tienen un mejor desempeño en tareas de memoria espacial (Hamson et al., 2016). Esas diferencias se presentan desde edades muy tempranas y se mantienen a lo largo de toda la vida (Yagi et al., 2016), lo que sugiere posibles diferencias en el procesamiento cognitivo dependientes del sexo.

### **El ejercicio y su efecto en los procesos cognitivos**

El deterioro cognitivo y su impacto a largo plazo no afecta a todos los individuos por igual. Existe una clara asociación entre la tasa y la gravedad del declive cognitivo, y una variedad de factores genéticos y ambientales, dentro de los cuales se incluyen, la calidad nutricional, el estilo de vida, la obesidad, el estrés, la inactividad física, las fluctuaciones hormonales a lo largo de la vida, entre otros (Westenbroek et al., 2004; Barnes y Yaffe, 2011). Específicamente, la inactividad física es un factor importante de riesgo para el deterioro cognitivo y la EA. Se estima que, a nivel mundial, aproximadamente el 13% (casi 4.3 millones) de casos de Alzheimer podrían ser atribuidos a la inactividad física. Una reducción del 10 al 25% en la prevalencia de la inactividad física podría potencialmente prevenir de 380,000 a 1 millón de estos casos (Barnes y Yaffe, 2011). Afortunadamente, la inactividad física es un factor que puede ser modificado.

Los beneficios del ejercicio se pueden obtener en cualquier etapa de la vida, y su efecto es mayor durante la adolescencia (Hopkins y Bucci 2011; Marlatt et al.

2012). Tanto en humanos como en modelos animales, se ha observado que el ejercicio tiene efectos a nivel cognitivo, como son, la mejora de la memoria espacial (Erickson et al. 2009) y del aprendizaje de procesos de separación de patrones, tales como el reconocimiento de escenas y objetos complejos (Duzel et al., 2016). Adicionalmente, el ejercicio aeróbico incrementa el volumen de ciertas regiones del cerebro (Biedermann et al., 2016) y mejora el estado de ánimo (Erickson et al., 2013).

### **El ejercicio y el hipocampo**

En humanos, como en modelos animales, la mayoría de los efectos del ejercicio a nivel cerebral se han observado en el hipocampo, sin embargo, sus efectos influyen otras áreas como la corteza entorrinal (afereente primaria hacia el giro dentado), lo que sugiere que el ejercicio podría contribuir a la función cognitiva.

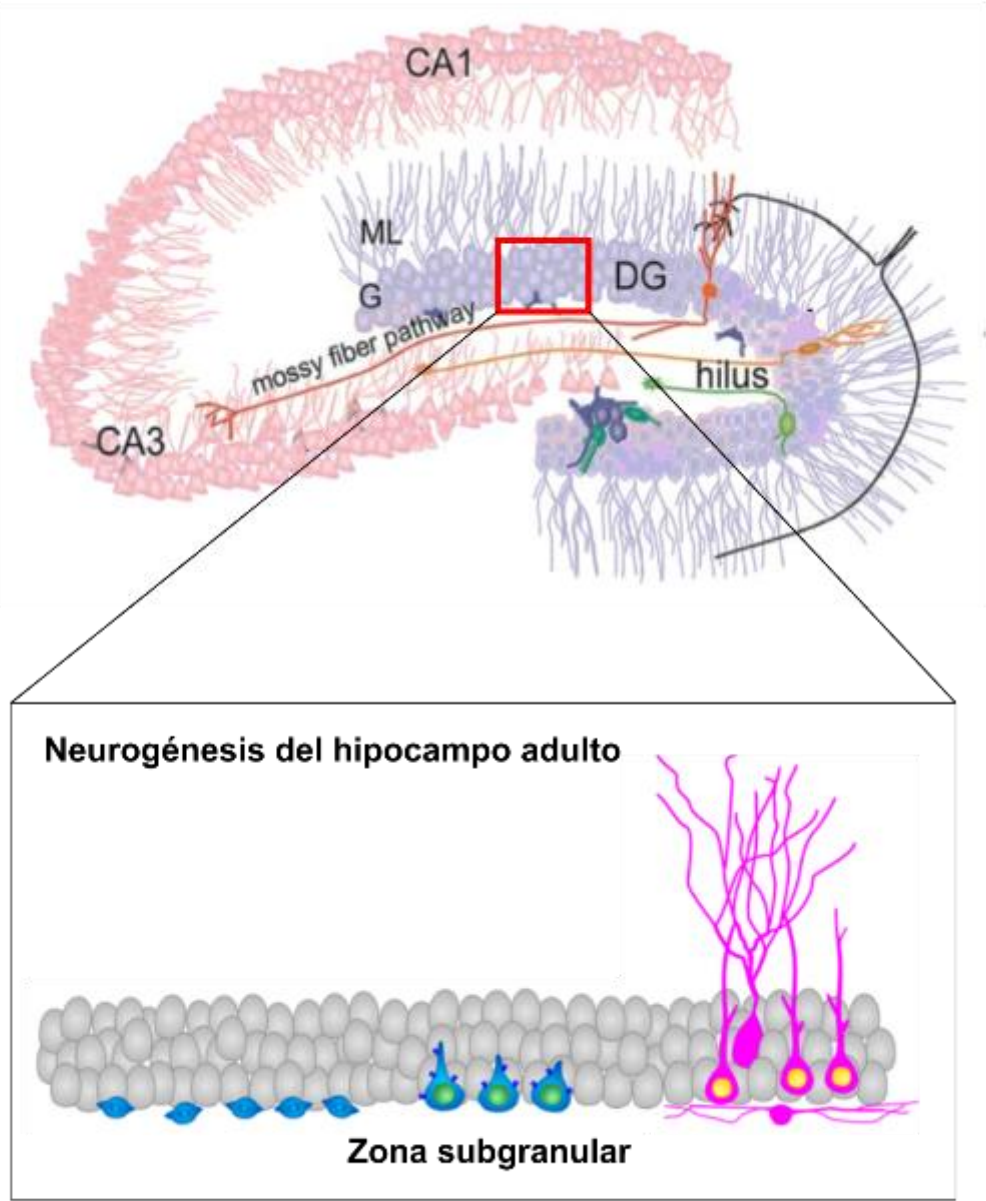
El hipocampo es una región del cerebro crítica para los procesos de aprendizaje y memoria (Squire and Zola 1991; Scharfman 2017). Este se divide en dos grandes regiones en forma de U, la fascia dentata o giro dentado (GD) y el hipocampo propiamente dicho (*cornu ammonis*). El GD está constituido por tres capas: 1) la capa granular que contiene los cuerpos celulares densamente empaquetados de las células granulares; 2) la capa molecular, formada por las dendritas apicales entrelazadas de las células granulares y sus fibras aferentes; 3) una capa polimorfa denominada “hilus” que se fusiona con el área CA3 y contiene los segmentos iniciales de los axones de las células granulares cuando se reúnen para formar el haz de fibras musgosas. El hipocampo propiamente dicho puede dividirse en tres regiones; CA3 (región más cercana al GD), CA1 (región más distal del GD), y CA2, área intermedia a las regiones anteriores (O' Keefe et al., 1978). Las tres regiones presentan células piramidales de tamaños diferentes.

El ejercicio incrementa el volumen del hipocampo y específicamente en el giro dentado, incrementa la vascularización, lo cual correlaciona positivamente con una mejora en la memoria y el aprendizaje (Erickson et al., 2009). Adicionalmente, el ejercicio incrementa los niveles de factores neurotróficos, principalmente el factor

neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual es un factor importante en la plasticidad sináptica (Kobilo et al., 2011). Aunado a estos cambios, el ejercicio modifica la morfología de las células de giro dentado, área CA1 y la corteza entorrinal al incrementar la densidad de espinas dendríticas (Stranahan et al., 2007).

### **Neurogénesis del cerebro adulto**

Dentro del hipocampo, el giro dentado es el área que sufre el mayor número de modificaciones por el ejercicio. Interesantemente, esta es una de las dos únicas estructuras del cerebro adulto que genera nuevas neuronas durante toda la vida (Ming y Song, 2005), a este proceso se le denomina “Neurogénesis del cerebro adulto”. Estas nuevas neuronas son funcionales y se integran a la red neuronal hipocampal ya establecida, a través de un proceso de maduración bien definido (van Praag et al., 2002). El tiempo que le toma a una célula nueva diferenciarse a neurona y tener la morfología de una célula granular es de aproximadamente un mes, mientras que su maduración completa puede llevar varios meses (Zhao et al., 2006; Vivar y van Praag, 2013). El nicho neurogénico se encuentra en la parte interna del GD, área conocida como zona subgranular, la cual contiene células progenitoras neurales (NPC) capaces de generar nuevas células durante la edad adulta (Lledo et al., 2006) Figura 1.



**Figura 1. Neurogénesis del cerebro adulto en el giro dentado del hipocampo.** Arriba, esquema que muestra la organización hipocampal. Las células granulares del giro dentado (DG: giro dentado, G: capa granular, ML: capa molecular) en morado, y las neuronas piramidales de la región CA3-CA1 en rojo. Abajo, ampliación de un segmento del giro dentado donde se observa el nicho neurogénico, el cual se encuentra en la zona subgranular localizada por debajo de la capa de células granulares y contiene a las células progenitoras neuronales (azul) (imagen modificada de Ming y Song, 2005; Sah et al., 2017).

Con el uso de diferentes metodologías para rastrear e identificar el nacimiento de estas nuevas neuronas, se ha podido determinar su proceso de maduración y las modificaciones que éste tiene ante diferentes estímulos intrínsecos (hormonas, péptidos, factores de crecimiento) y extrínsecos (ejercicio, ambiente enriquecido, estrés).

Una de esas metodologías es el uso de 5-Bromo-2'-deoxuridina (BrdU), un análogo sintético de timidina, que actúa como marcador de células nuevas, ya que se introduce al genoma de las células durante la fase S del ciclo celular (Gratzner, 1982). Dado que las neuronas expresan distintos marcadores durante su proceso de maduración, se ha utilizado la combinación de BrdU con diferentes marcadores neuronales para conocer el estadio en que la célula se encuentra. Sin embargo, el BrdU solo permite marcar los somas de las células nuevas, lo cual limita la caracterización morfológica, así como su caracterización fisiológica ya que el tejido tiene que ser fijado para su análisis. Debido a esto, se han generado vectores retrovirales que infectan selectivamente células en división y expresan proteínas fluorescentes por periodos largos de tiempo después de la infección (hasta por un año) (Ming y Song, 2005). 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.

## **De célula troncal a neurona**

### **a. Proceso de proliferación**

El proceso de proliferación durante la neurogénesis se da a partir de células progenitoras neurales quiescentes (QNP), cuyos núcleos residen en la SGZ del GD y expresan algunos marcadores en común con astrocitos, por ejemplo, vimentina y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Las QNP pueden ser activadas a través de factores intrínsecos [proteína morfogénica de hueso (BMP), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), entre otros] o por factores externos (hormonas,

ejercicio, etc.), su capacidad de proliferación es baja pero ilimitada. Estas células pueden dividirse simétrica o asimétricamente (Lledo et al., 2006; Braun et al., 2014).

Cuando las QNP son activadas, sufren divisiones asimétricas, para dar lugar a progenitores neurales de amplificación (ANP) las cuales tienen capacidad limitada de proliferar a diferencia de las QNP, y están localizadas en la SGZ. Estas células expresan Sox2 y nestina (Encinas et al., 2006; Ming y Song, 2011) como se muestra en la figura 2.

### **b. Diferenciación y migración**

Los ANP proliferan por divisiones simétricas, su proliferación es alta pero limitada, cuando se dividen asimétricamente pueden diferenciarse hacia precursores neuronales postmitóticos, neuroblastos tipo 1 (NB1), los cuales expresan marcadores para la proteína doblecortina (DCX), PSA-NCAM, Prox-1 y BIII-tubulina. Estas células se localizan en la SGZ, extienden procesos horizontales de 10-30  $\mu\text{m}$ , y su tamaño del soma es de  $\sim 10 \mu\text{m}$  de diámetro.

Durante esta fase, los NB1 comienzan a migrar hacia la capa de células granulares y se extienden en dirección horizontal y oblicua respecto al plano de la SGZ (Cameron et al., 1993), y se convierten en neuroblastos de tipo 2 (NB2). Expresan los mismos marcadores que los NB1, su soma es  $\sim 15 \mu\text{m}$  de diámetro, sus procesos son más largos (20-40  $\mu\text{m}$ ), Figura 2 (Encinas et al., 2006; Ming y Song, 2011).

### **c. Supervivencia**

Durante esta fase, los neuroblastos atraviesan un periodo crítico, ya que aproximadamente la mitad de las células no sobrevive para alcanzar la maduración (Cameron et al., 1993). Las células que logran sobrevivir lo hacen de manera dependiente de la actividad sináptica que reciben, a través de un mecanismo de

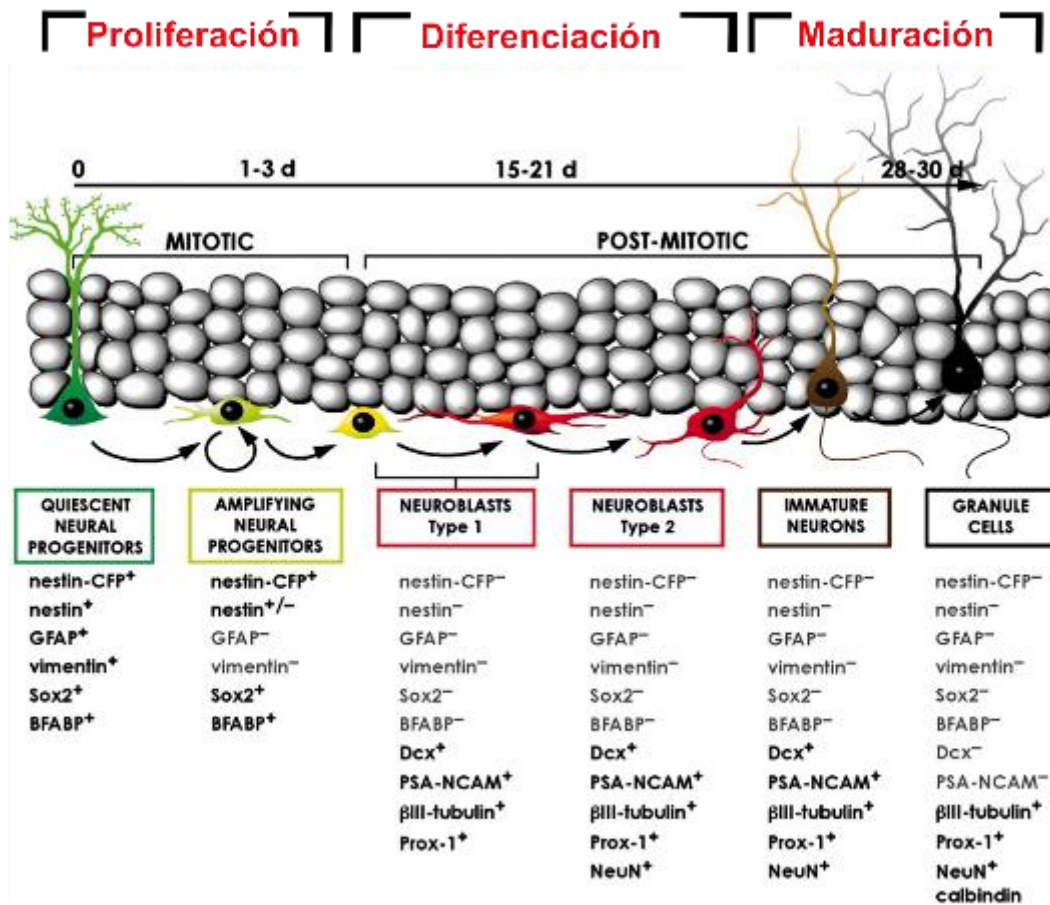


señalización dependiente de los receptores glutamatergicos NMDA (Tashiro et al., 2006).

#### **d. Maduración**

En esta fase, los NB2 que sobrevivieron se diferencian a neuronas inmaduras (IN), las cuales continúan migrando hacia el interior de la capa de células granulares. Expresan marcadores como DCX, PSA-NCAM, Prox-1, BIII-tubulina y NeuN. En cuestión de días, las IN extienden dendritas hacia la capa molecular y proyectan sus axones hacia la región CA3 (Zhao et al., 2006). Morfológicamente, las IN son más grandes que las células de las clases anteriores (diámetro del soma 15-20  $\mu\text{m}$ ), su soma es redondo u ovalado.

Aproximadamente a las 4 semanas, las IN ya presentan las características de una célula granular, y expresan marcadores característicos de éstas: NeuN, Calbindina y Prox 1 (van Praag et al. 2002; Encinas et al. 2006; Ming y Song, 2011) Figura 2.

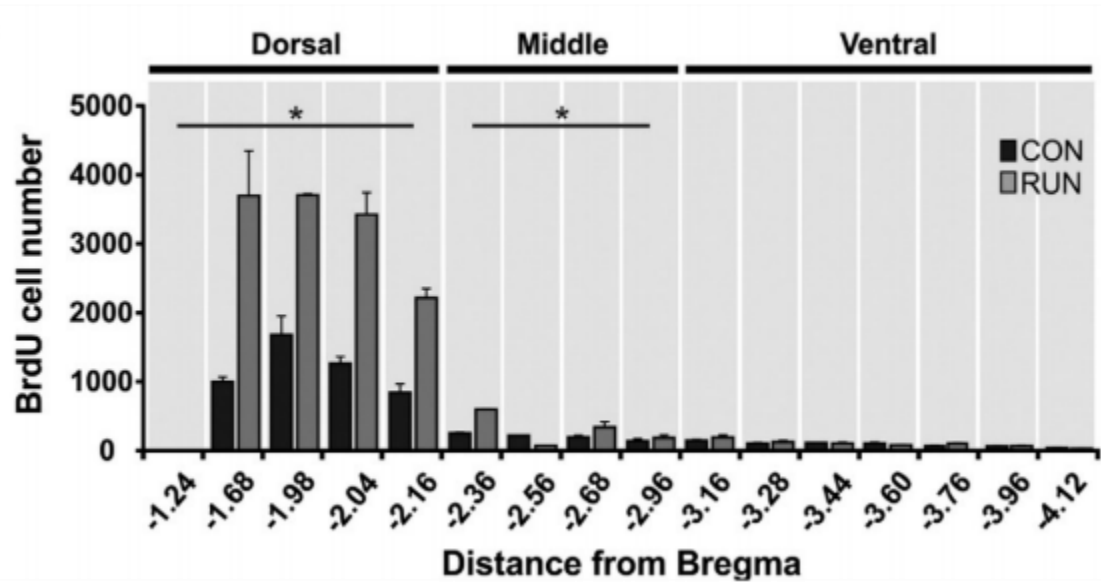


**Figura 2. Marcadores que se expresan durante la cascada de diferenciación neuronal en el GD.** Durante la proliferación, las células progenitoras neurales quiescentes son activadas y sufren divisiones asimétricas, para dar origen a progenitores neurales de amplificación, éstas células sufren varias rondas de divisiones simétricas y aprox. 2-3 días después salen del ciclo celular y se diferencian hacia neuroblastos tipo 1. Durante la diferenciación, los neuroblastos tipo 1 maduran a neuroblastos tipo 2 y posteriormente a neuronas inmaduras que ya presentan procesos dendríticos apicales y su axón en la parte basal, en esta fase, el soma de la célula se localiza en la capa de células granulares. Durante la maduración, las neuronas inmaduras adquieren características de una célula granular madura, con arborización dendrítica extensa, y proyectando su axón hacia el hilus y el área CA3. d: días (imagen modificada de Encinas et al., 2006).

## Neurogénesis y el ejercicio

La primera evidencia de que el ejercicio es capaz de influir en el proceso de neurogénesis fue mostrado por van Praag y colaboradores (1999). Ellos mostraron que la neurogénesis hipocampal se incrementa en animales que tuvieron libre acceso a una rueda para correr. Diferentes estudios han mostrado que el ejercicio influye en cada fase de la neurogénesis del giro dentado. El ejercicio incrementa drásticamente la proliferación celular en la SGZ del giro dentado (van Praag et al., 1999; Kronenberg et al., 2006; Olson et al., 2006), y el número de células que se diferencian hacia el fenotipo neuronal, las cuales expresan el marcador para DCX, característico de neuronas inmaduras (Couillard-Despres et al., 2005; van der Borght et al., 2009). Durante la fase de sobrevivencia, se sugiere que el ejercicio impacta en la morfología de células, ya que acelera la formación de espinas dendríticas e incrementa la longitud y la ramificación dendrítica, lo cual favorece la integración de las neuronas nuevas a los circuitos sinápticos, es decir, acelera la maduración (van Praag et al., 2005; Zhao et al., 2006; Snyder et al., 2009; Kobilko et al., 2011). Una vez que estas nuevas células han alcanzado la madurez, pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo (Toni et al., 2008).

El hipocampo no es una estructura homogénea, ya que presenta una disociación funcional a lo largo del eje dorso-ventral (Moser, 1998). Los estudios anatómicos de expresión génica y de comportamiento sugieren que el hipocampo dorsal tiene un papel primordial en los procesos cognitivos, mientras que el hipocampo ventral está principalmente involucrado en las funciones afectivas (Fanselow y Dong, 2010). Interesantemente, el efecto neurogénico del ejercicio no es homogéneo a través del eje dorso-ventral. Vivar y colaboradores (2016) mostraron que bajo condiciones de ejercicio, la neurogénesis se incrementa en la región dorsal y medial, no así en la región ventral del giro dentado del hipocampo de ratones macho (Figura 3).



**Figura 3. El ejercicio incrementa la neurogénesis en la porción dorsal y medial del giro dentado del hipocampo. Número de células BrdU<sup>+</sup> a través del eje dorso-ventral en ratones macho en condiciones control y de ejercicio. CON: control, RUN: corredor, \*  $p < 0.05$  (Vivar et al., 2016).**

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente la mayoría de las intervenciones para detener o revertir el deterioro cognitivo están dirigidas a la población adulta (<65 años). Sin embargo, se sabe que el declive en la función cognitiva inicia desde que el individuo comienza la segunda década de su vida, lo que sugiere, que una gran cantidad de cambios a nivel cerebral habrán ocurrido antes de llegar a los 60 años (Salthouse, 2009).

Es claro que existen diferencias sexuales en la función cognitiva, bajo condiciones normales o patológicas, a lo largo de toda la vida de los individuos. De ahí que los estudios longitudinales se centran en buscar diferencias ambientales, sociales, económicas, hormonales y estructurales que les den una respuesta al por qué las mujeres son las más afectadas por la demencia. Sin embargo, se desconoce si estas diferencias podrían estar influenciadas por las diferencias en los niveles de neurogénesis en el hipocampo cuando aún no existen indicios de padecer alguna discapacidad cognitiva.

De hecho, se ha demostrado que el ejercicio impacta de manera diferencial la plasticidad sináptica del giro dentado entre hembras y machos (Titterness et al., 2011), sugiriendo posibles diferencias en el incremento de la neurogénesis.

Los estudios muestran que el ejercicio impacta de manera significativa cada una de las fases de la neurogénesis en el giro dentado tanto en hembras (Praag et al., 1999; Kobilov et al., 2011; Marlatt et al., 2012) como en machos (Patten et al., 2013; Vivar et al., 2016). Sin embargo, estos estudios se han realizado de manera independiente, por lo que es difícil comparar si este aumento en la neurogénesis es similar entre ambos sexos bajo condiciones control y de ejercicio. Hasta el momento no hay estudios que comparen bajo las mismas condiciones (protocolo de administración de BrdU, edad de los animales, condiciones de ejercicio, alimento) si el aumento en estas fases es similar entre hembras y machos.

Adicionalmente, se desconoce si el efecto neurogénico del ejercicio a través del eje dorso-ventral del hipocampo en ratones hembra es similar al observado en ratones machos. Es por ello que el presente proyecto está enfocado a determinar el

impacto del ejercicio en la neurogénesis hipocampal en modelos animales machos y hembras. Estos estudios podrán ayudar a diseñar estrategias para prevenir o revertir el deterioro cognitivo de manera específica para cada sexo.

## **HIPÓTESIS**

El ejercicio voluntario incrementa la neurogénesis del giro dentado del hipocampo de manera diferencial en ratones hembra y macho.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar los niveles de proliferación, diferenciación y maduración de las nuevas neuronas del hipocampo en ratones hembra y macho en condiciones control y de ejercicio.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- i. Determinar si existen diferencias en la distancia que corren ratones macho y hembra.
- ii. Determinar si existen diferencias en los niveles de proliferación, diferenciación y maduración celular en el giro dentado del hipocampo entre ratones macho y hembra en condiciones control y de ejercicio.
- iii. Determinar si existen diferencias en los niveles de proliferación, diferenciación y maduración celular a través del eje dorso-ventral del giro dentado del hipocampo entre ratones macho y hembra en condiciones control y de ejercicio.

- iv. Determinar si existen diferencias en el porcentaje de células nuevas con fenotipo neuronal entre ratones macho y hembra en condiciones control y de ejercicio.
- v. Determinar si existen diferencias en el proceso neurogénico entre ratones macho y hembra en condiciones control y de ejercicio.
- vi. Determinar si existe una correlación entre la distancia corrida y el número de células BrdU<sup>+</sup> en etapa de proliferación, diferenciación y maduración entre ratones macho y hembra.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **i. Animales**

En este estudio se utilizaron ratones hembra y macho de la cepa C57Bl/6 (UPEAL-Cinvestav) en el rango de 4-5 semanas de edad, los cuales fueron divididos en un grupo control y de ejercicio. Los ratones del grupo control fueron colocados individualmente en cajas estándar (control), mientras que los del grupo de ejercicio fueron colocados en cajas estándar adicionadas con una rueda para correr (12 cm diámetro). La distancia corrida diariamente se midió a través de un odómetro (Sunding, SD-548B). Todos los animales permanecieron bajo condiciones de luz-oscuridad constante de 12/12 horas, con alimento y agua *ad libitum*.

### **ii. Inyecciones de BrdU**

Tres días después de haber sido colocados en sus respectivas condiciones, todos los animales recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) diaria durante cinco días (1/24h) de 5-Bromo-2'-deoxuridina (BrdU) a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal. El BrdU (Sigma) se disolvió en solución de NaCl al 0.9%. Los animales

fueron sacrificados a diferentes tiempos, dependiendo de la fase de neurogénesis que se estudió.

### **ii.i Determinación de proliferación celular**

Para determinar si existen diferencias en el impacto del ejercicio en la proliferación celular entre ratones hembra y macho, los animales fueron sacrificados 5 días después de la primera inyección de BrdU.

### **ii.ii Determinación de diferenciación celular**

Para determinar si existen diferencias en el impacto del ejercicio en la diferenciación celular entre machos y hembras, los animales fueron sacrificados 15 días después de la primera inyección de BrdU.

### **ii.iii Determinación de maduración celular**

Para determinar si existen diferencias en el impacto del ejercicio en la maduración neuronal entre ratones macho y hembra, los animales fueron sacrificados 30 días después de la primera inyección de BrdU.

## **iii. Perfusión y preparación de muestras para análisis**

Posterior a su tiempo de experimentación los animales fueron sacrificados y el cerebro fue extraído. Los ratones fueron anestesiados (isoflurano) y perfundidos transcárdicamente con solución salina 0.9%, seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% (4°C) en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 M. Se realizó la extracción del cerebro y se post-fijo con PFA al 4% durante 24 horas. Posteriormente, los cerebros fueron crioprotegidos en solución de sacarosa al 30%. Se obtuvieron cortes horizontales de 40 µm de grosor utilizando un micrótopo de



deslizamiento (Leica SM2010R), los cuales fueron almacenados en una solución de glicerol con PBS a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **iv. Inmunohistoquímica**

Para determinar el número y la distribución de células BrdU<sup>+</sup>, el tejido cerebral fue sometido a pruebas inmunohistoquímicas para BrdU por libre flotación. La inmunohistoquímica fue realizada en 1:6 series (240  $\mu\text{m}$  de separación) de cortes horizontales a través del eje dorso-ventral del cerebro. Los cortes fueron pretratados con HCl 2N para desnaturalizar el ADN. Los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario rata anti-BrdU (1:100, Serotec). La marca de BrdU fue revelada con el método de peroxidasa, sistema ABC (Complejo Avidina-Biotina-peroxidasa) utilizando el anticuerpo secundario burro anti-rata biotinilado (1:200, Jackson Immunoresearch) y diaminoabencidina (DAB) como cromógeno.

#### **v. Conteo de células BrdU<sup>+</sup>**

Se adquirieron imágenes del GD de los cortes horizontales a través de un microscopio invertido de contraste de fase, a una amplificación 10x (Nikon diaphot 300). Para determinar la distribución dorso-ventral de las células BrdU<sup>+</sup> en toda la extensión del GD, las imágenes de los cortes fueron pareadas con el atlas de ratón de Paxinos (Franklin y. Paxinos, 2007). El hipocampo fue dividido en la región dorsal, medial y ventral basado en las siguientes coordenadas respecto a Bregma: hipocampo dorsal: -1.24 mm a -2.16 mm; hipocampo medial: -2.36 mm a -2.96 mm e hipocampo ventral: -3.16 mm a -4.12 mm (Vivar et al., 2016). Las células BrdU<sup>+</sup> localizadas entre la zona subgranular y la capa de células granulares del GD fueron cuantificadas con la ayuda del programa ImageJ (Software libre).

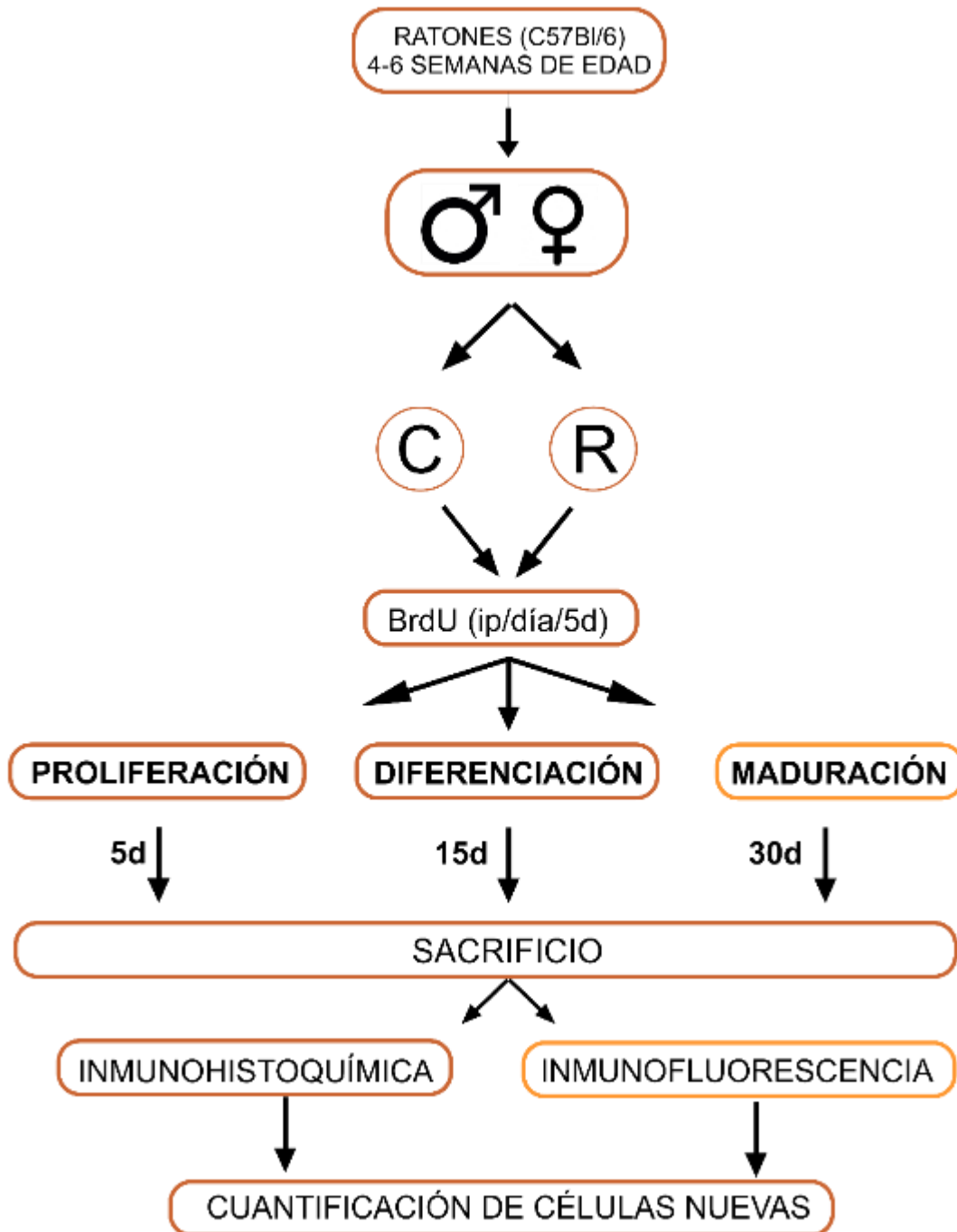
## **vi. Inmunofluorescencia**

Para determinar el porcentaje de neuronas nuevas marcadas con BrdU, el tejido cerebral fue sometido a pruebas de inmunofluorescencia por libre flotación. La inmunofluorescencia fue realizada en cortes horizontales equidistantes 1:6, (240  $\mu\text{m}$  de separación) a través del eje dorso-ventral del cerebro. Los cortes fueron pretratados con HCl 2N para desnaturalizar el ADN. Los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios rata anti-BrdU (1:100, Serotec) y ratón anti-NeuN (1:100, Merck). La marca de BrdU y el marcador neuronal NeuN fue revelada con anticuerpos secundarios burro anti-rata (1:250, Jackson Immunoresearch) y burro anti-ratón (1:250, Jackson Immunoresearch) acoplados a los fluoróforos Alexa Fluor 488 y Cy3 respectivamente.

La doble marca se analizó por microscopía confocal (TCSSP8). Las células que expresaban la marca de BrdU (BrdU<sup>+</sup>) y la doble marca (BrdU<sup>+</sup>/ NeuN) que se localizaban entre la zona subgranular y la capa de células granulares del GD fueron cuantificadas con la ayuda del programa ImageJ (Software libre).

## **vii. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 5. Las pruebas utilizadas fueron t-student para el análisis de distancia corrida y análisis de varianza (ANOVA de dos vías), seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni para análisis del número de células BrdU<sup>+</sup>. Los datos son presentados como el promedio  $\pm$  error estándar (ES).



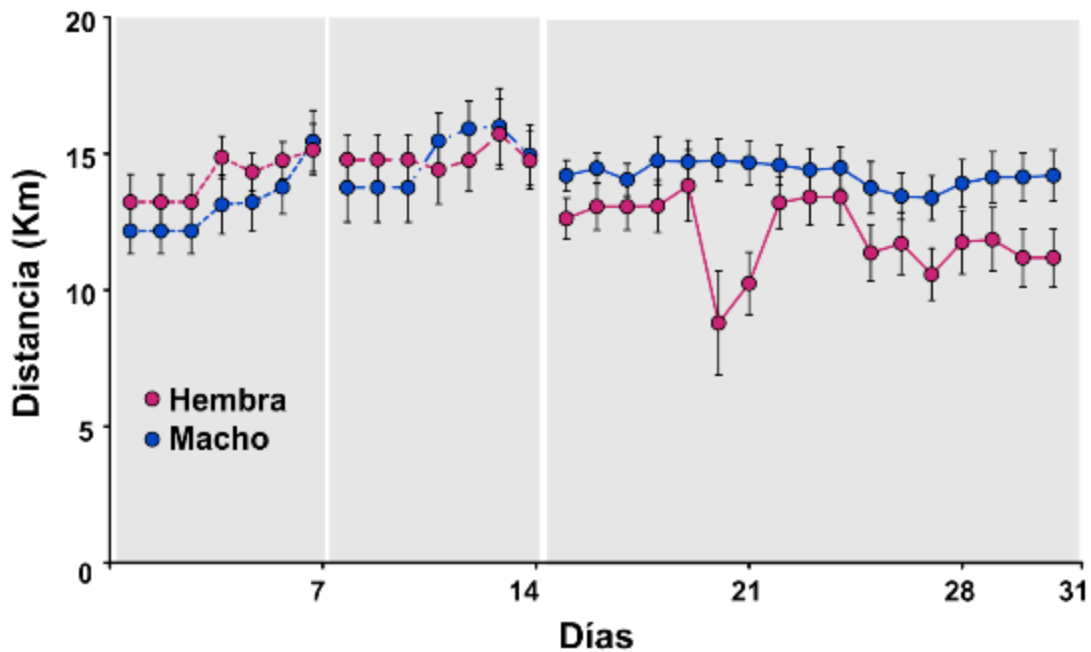
**Figura 4. Diagrama general de la metodología.** Hembra (♀); macho (♂); control (C); corredor (R); días (d).

## RESULTADOS

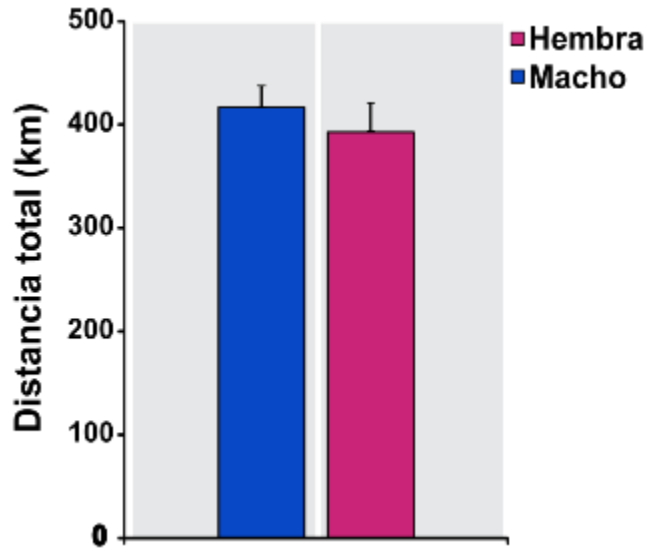
### i. Ratones macho y hembra corren distancias similares

Para determinar si existen diferencias en la cantidad de actividad física que ratones machos y hembra realizan diariamente, se midió la distancia diaria que cada sujeto corrió de forma voluntaria durante un periodo de 30 días. El análisis mostró que no hay diferencias significativas en la distancia promedio diaria que machos y hembras corren (Machos  $13.61 \pm 0.74$  km/día,  $n = 25$ ; hembras  $14.38 \pm 0.64$  km/día,  $n = 30$ ;  $t_{(53)} = 0.79$ ,  $p > 0.43$ ; Figura 5).

El análisis de la distancia total corrida durante 30 días mostró que machos y hembras corren distancias similares (Machos  $416.24 \pm 23.44$  km,  $n = 12$ ; hembras  $392.79 \pm 24.66$  km,  $n = 12$ ;  $t_{(22)} = 0.69$ ,  $p > 0.49$ ; Figura 6).



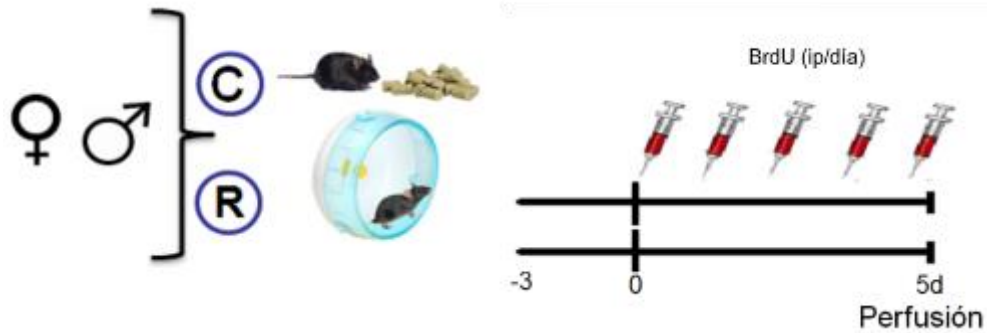
**Figura 5.** La distancia promedio diaria que corren machos y hembras es similar. El análisis muestra que no hay diferencias significativas en la distancia promedio diaria que machos y hembras corren durante un periodo de 30 días (promedio  $\pm$  ES).



**Figura 6. La distancia promedio total corrida de forma voluntaria durante 30 días es similar entre machos y hembras. Distancia promedio corrida durante en un periodo 30 días de machos y hembras.**

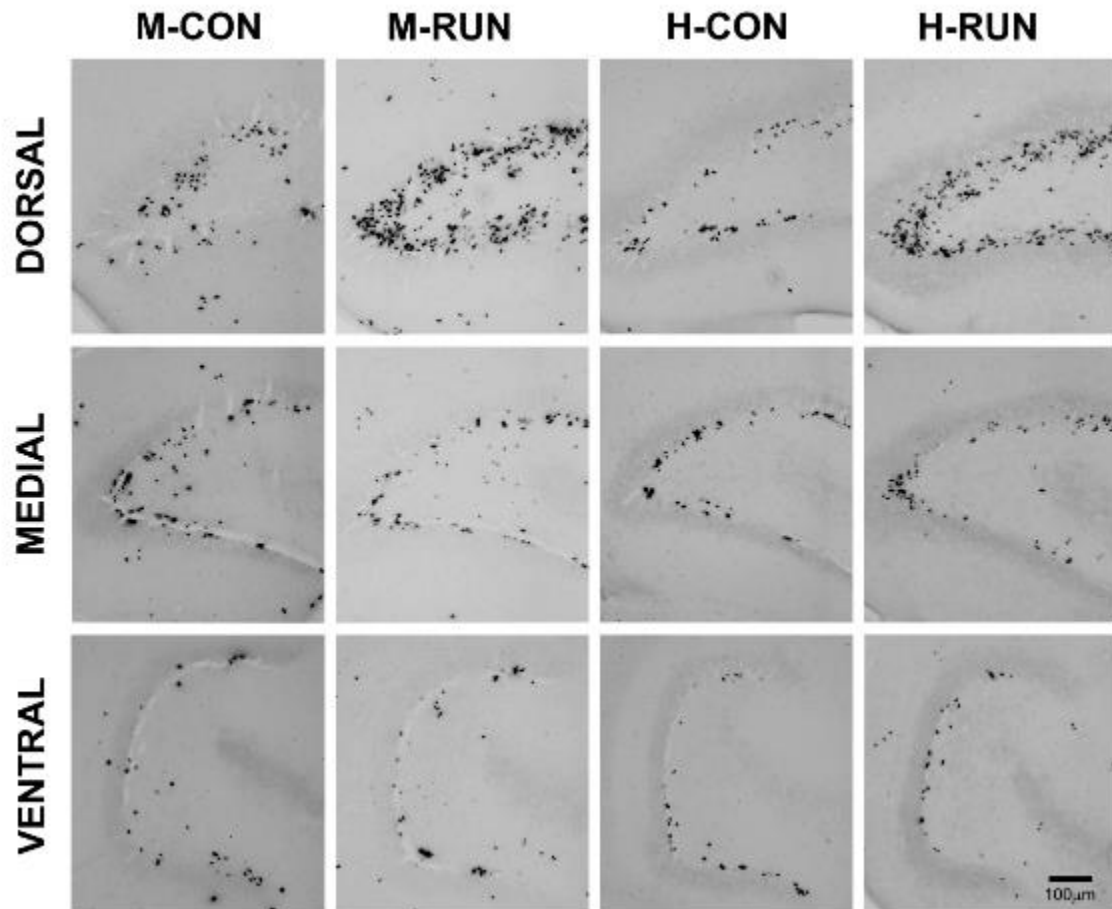
**ii. El ejercicio incrementa de manera similar la proliferación celular en el giro dentado de machos y hembras**

Para determinar los niveles de proliferación celular en ratones macho y hembra en condición sedentaria y de ejercicio [Machos control (M-CON), n = 7; machos corredor (M-RUN), n = 7; hembras control (H-CON), n = 9; hembras corredor (H-RUN), n = 10], los ratones recibieron una inyección diaria por 5 días de BrdU (50 mg/kg/ip). Los animales fueron sacrificados 5 días después de la primera inyección (Figura 7).

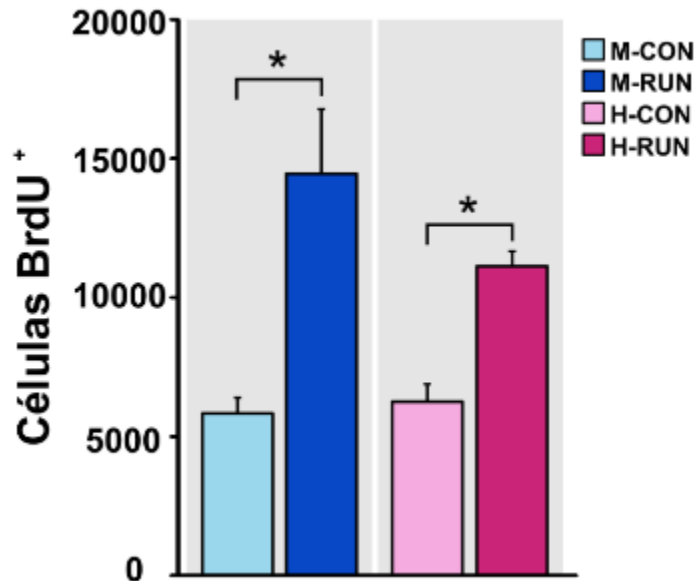


**Figura 7. Curso temporal para determinar proliferación celular inducida por ejercicio.** Ratones macho y hembra fueron divididos en grupos control (C) y de ejercicio (R). Tres días después de haber sido colocados en sus respectivas condiciones recibieron una inyección diaria de BrdU (50 mg/Kg, ip/ día) durante 5 días. Los animales fueron sacrificados 5 días después de la primera inyección.

El conteo y análisis del número de células que expresaban la marca de BrdU (BrdU<sup>+</sup>) en el GD mostró que en condiciones control no hay diferencias significativas en la proliferación celular entre machos y hembras (M-CON, 5831 ± 521 vs H-CON, 6251 ± 635;  $p > 0.05$ ; Figura 8 y 9). El ejercicio incrementó el número total de células BrdU<sup>+</sup> con respecto a sus controles en ambos sexos (M-CON, 5831 ± 521 vs M-RUN, 14450 ± 2489; H-CON, 6251 ± 635 vs H-RUN, 11130 ± 540;  $F_{(1,29)} = 32.31$   $p < 0.0001$ ; Figura 8 y 9). Este incremento representó el 247% en machos y el 178% en hembras con respecto a su control (Figura 27). El incremento en el número de células BrdU<sup>+</sup> inducido por el ejercicio no fue significativamente diferente entre machos y hembras ( $p > 0.05$ ; Figura 9).



**Figura 8. El ejercicio incrementa la proliferación celular en la porción dorsal del GD en machos y hembras.** Fotomicrografías representativas de la marca de BrdU en cortes horizontales del giro dentado del hipocampo a través del eje dorso-ventral. Los puntos negros representan la marca de BrdU de células en proliferación. El número de células BrdU<sup>+</sup> es mayor en la porción dorsal de ratones macho y hembra en la condición de ejercicio. M-CON: Machos control; M-RUN: machos corredor; H-CON: hembras control; H-RUN: hembras corredor.



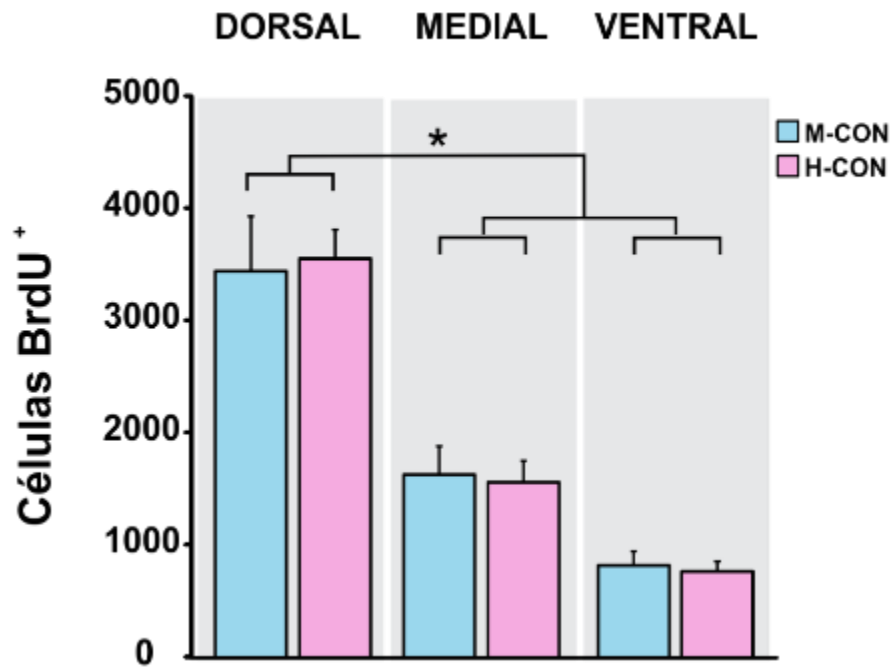
**Figura 9. El ejercicio incrementa de manera similar la proliferación celular entre machos y hembras.** Número total de células BrdU<sup>+</sup> en el GD. Bajo condiciones control, no hay diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras. El ejercicio incrementó el número de células BrdU<sup>+</sup> en ambos sexos respecto a su control. El incremento en el número de células BrdU<sup>+</sup> fue similar entre machos y hembras corredores. M-CON: Machos control; M-RUN: machos corredor; H-CON: hembras control; H-RUN: hembras corredor. \*  $p < 0.05$ .

### ii.i El ejercicio incrementa la proliferación celular en la porción dorsal del giro dentado

Para determinar si el efecto neurogénico del ejercicio es homogéneo a través del eje dorso-ventral, se cuantificó el número de células BrdU<sup>+</sup> a través de toda la extensión del GD. El hipocampo fue dividido en región dorsal, medial y ventral. El análisis mostró que en condiciones control hay diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> por región ( $F_{(2,39)} = 53.02$ ,  $p < 0.0001$ ). Al comparar las regiones dorsal, medial y ventral se mostró que el GD de ratones machos y hembra tienen un mayor número de células BrdU<sup>+</sup> en la región dorsal (Dorsal: M-CON,  $3405 \pm 483$ ; H-CON,  $3516 \pm 255$ ; Medial: M-CON,  $1613 \pm 250$ ; H-CON,  $1545 \pm 189$ ; Ventral: M-CON,  $812 \pm 125$ ; H-CON,  $759 \pm 90$ ;  $p < 0.05$ ; Figura 10). Adicionalmente,



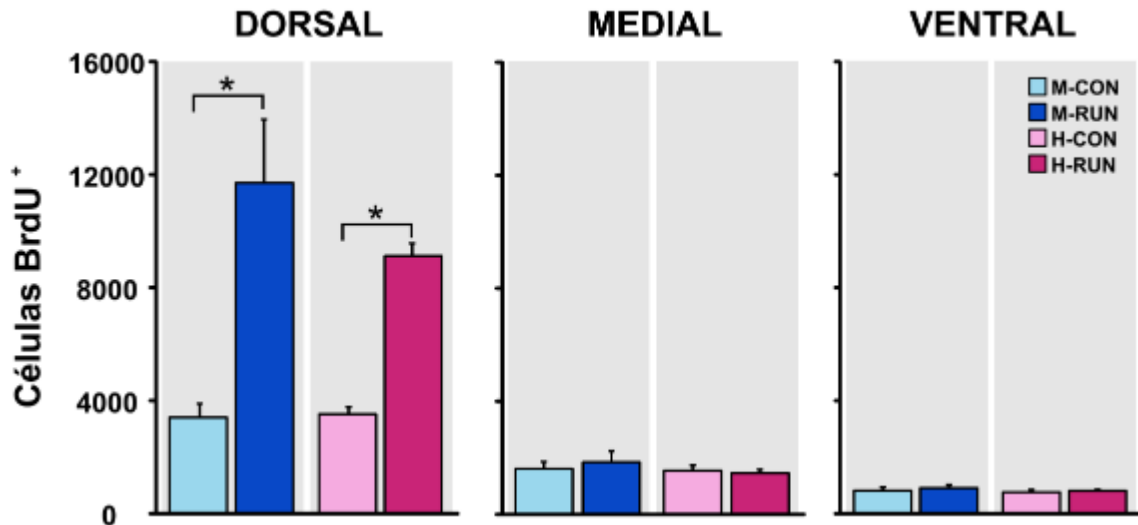
el análisis mostró que no hay diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras por región ( $p > 0.05$ ; Figura 10).



**Figura 10.** En condiciones control, el giro dentado tiene un mayor número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal. Número de células BrdU<sup>+</sup> en la región dorsal, medial y ventral del giro dentado. Existe un mayor número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal en ambos sexos. El número de células BrdU<sup>+</sup> por región es similar entre machos y hembras. M-CON: Machos control, H-CON: hembras control. \*  $p < 0.05$ .

El ejercicio incrementó significativamente el número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal con respecto su control en machos y hembras (Dorsal: M-CON, 3405 ± 483; M-RUN, 11707 ± 2242; H-CON, 3516 ± 255; H-RUN, 9116 ± 442;  $F_{(1,27)} = 41.32$ ,  $p < 0.0001$ ), pero no en la región medial o ventral del GD (Medial: M-CON, 1613 ± 250; M-RUN, 1842 ± 397; H-CON, 1545 ± 189; H-RUN, 1457 ± 131;  $F_{(1,27)} = 0.07$ ,  $p > 0.05$ ; Ventral: M-CON, 812 ± 125; M-RUN, 904 ± 114; H-CON, 759 ± 90; H-RUN, 807 ± 44;  $F_{(1,27)} = 0.51$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 8 y 11). El análisis por región no

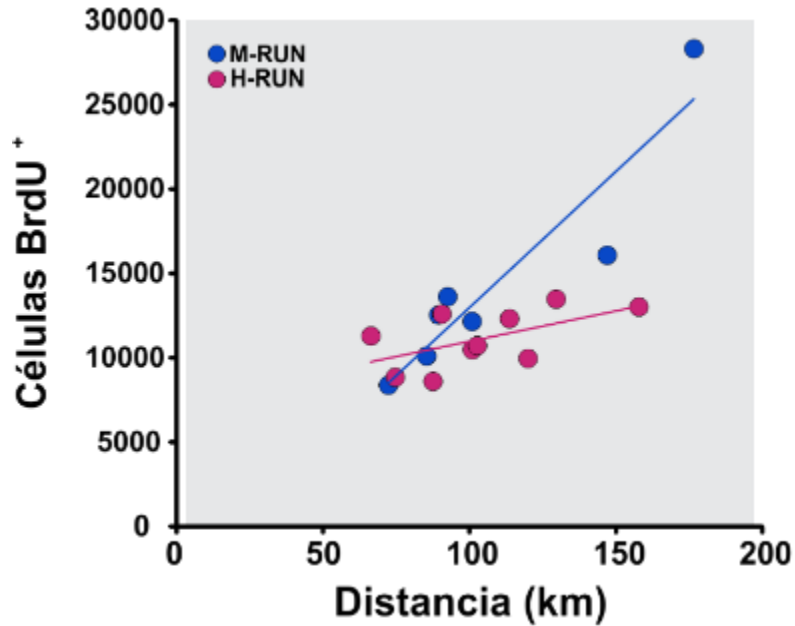
mostró diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras en condición de ejercicio ( $p > 0.05$ ; Figura 11).



**Figura 11.** El efecto neurogénico del ejercicio en la proliferación celular se observa en la porción dorsal del giro dentado. Número de células BrdU<sup>+</sup> en la región dorsal, medial y ventral del giro dentado. El ejercicio incrementó el número de células BrdU<sup>+</sup> solo en la porción dorsal en ambos sexos. Este incremento es similar entre machos y hembras. M-CON: Machos control; M-RUN: machos corredor; H-CON: hembras control; H-RUN: hembras corredor. \*  $p < 0.05$ .

### ii.ii En machos, la proliferación celular se correlaciona con la distancia corrida

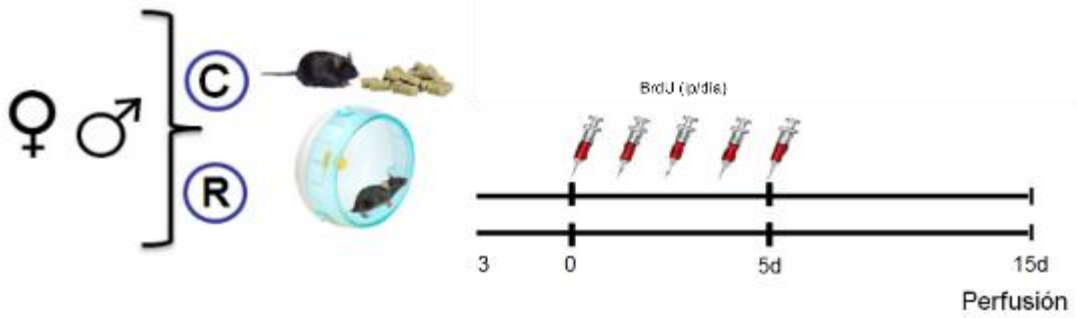
Para determinar si la distancia que el sujeto de experimentación corre influye en el número de células que proliferan, se analizó la correlación entre la distancia total corrida en un periodo de 7 días y el número total de células BrdU<sup>+</sup>, el resultado mostró que existe una correlación positiva en machos ( $r = 0.92$ ,  $p < 0.002$ ), pero no en hembras ( $r = 0.57$ ,  $p > 0.08$ . Figura 12), lo que sugiere una modulación diferencial, dependiente de la distancia corrida, en la proliferación celular entre machos y hembras.



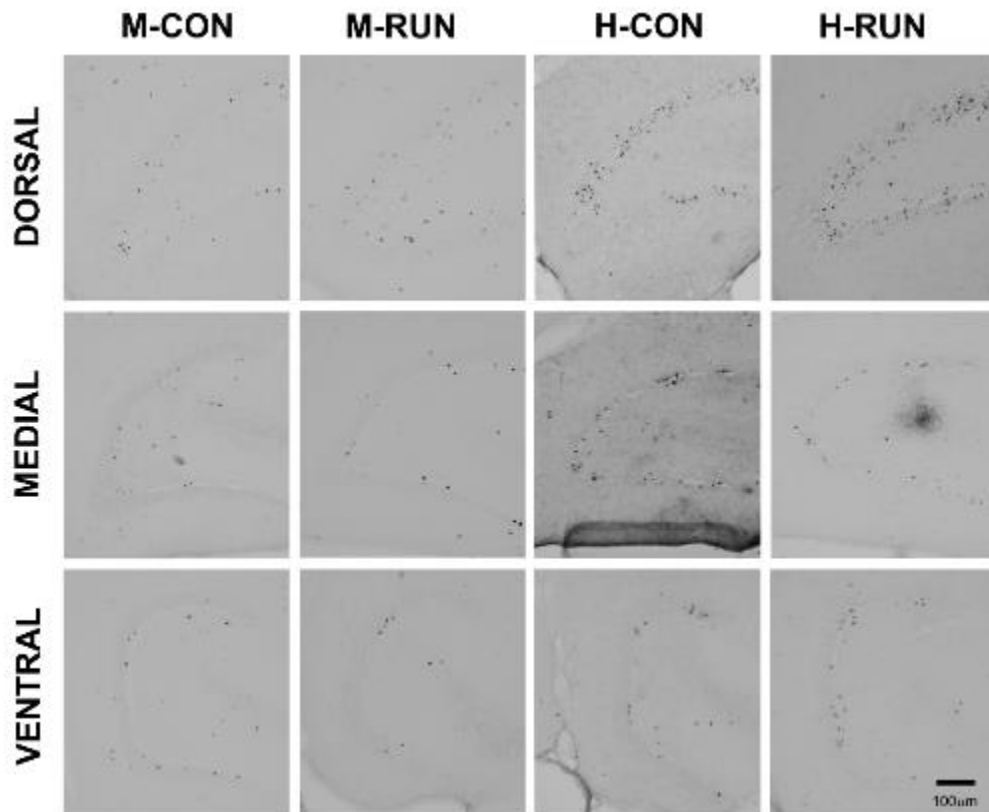
**Figura 12.** En machos, la proliferación celular se correlaciona con la distancia corrida. Correlación entre la distancia total corrida durante un periodo de 7 días y el número de células BrdU<sup>+</sup> por animal. M-RUN: machos corredor y H-RUN: hembras corredor.

**iii. El ejercicio incrementa la diferenciación celular en el giro dentado de machos y hembras**

Para determinar los niveles de diferenciación celular, ratones macho y hembra en condición control y de ejercicio (M-CON, n = 7; M-RUN, n = 6; H-CON, n = 7; H-RUN, n = 7) recibieron una inyección diaria por 5 días de BrdU (50 mg/kg/ip). Los animales fueron sacrificados 15 días después de la primera inyección (Figura 13). Las células que expresaban la marca de BrdU (BrdU<sup>+</sup>) fueron cuantificadas en rebanadas horizontales a través del eje dorso-ventral del GD (Figura 14).



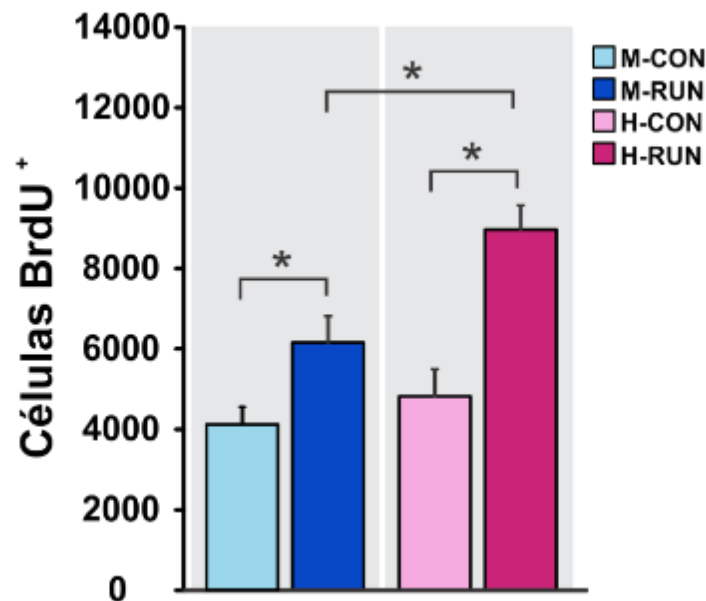
**Figura 13. Curso temporal para determinar la diferenciación celular inducida por el ejercicio.** Ratones macho y hembra fueron divididos en grupos control (C) y de ejercicio (R). Tres días después de haber sido colocados en sus respectivas condiciones, los ratones recibieron una inyección diaria de BrdU (50mg/Kg, ip/ día) durante 5 días. Los animales fueron sacrificados 15 días después de la primera inyección.



**Figura 13.4. El ejercicio incrementa la diferenciación celular en la porción dorsal del GD en machos y hembras.** Fotomicrografías representativas de la marca de BrdU en cortes horizontales

del giro dentado del hipocampo a través del eje dorso-ventral. Los puntos negros representan la marca de BrdU de células en diferenciación. El número de células BrdU<sup>+</sup> es mayor en la porción dorsal de ratones macho y hembra en la condición de ejercicio. M-CON: Machos control; M-RUN: machos corredor; H-CON: hembras control; H-RUN: hembras corredor.

El análisis mostró que en condiciones control no hay diferencias significativas en la diferenciación celular, representada por el número total de células BrdU<sup>+</sup>, entre machos y hembras (M-CON, 4144 ± 440 vs H-CON, 4824 ± 669;  $p > 0.05$ ; Figura 15). El ejercicio incrementó el número total de células BrdU<sup>+</sup> en ambos sexos con respecto a su control (M-CON, 4144 ± 440 vs M-RUN, 6163 ± 656; H-CON, 4824 ± 669 vs H-RUN, 8968 ± 600;  $F_{(1,23)} = 27.71$ ,  $p < 0.0001$ ; Figura 15). Este incremento representó el 148% en machos y el 185% en hembras con respecto a su control. Al comparar el número total de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras con condición de ejercicio, el análisis mostró que el incremento fue significativamente mayor en hembras ( $p < 0.01$ ; Figura 15).



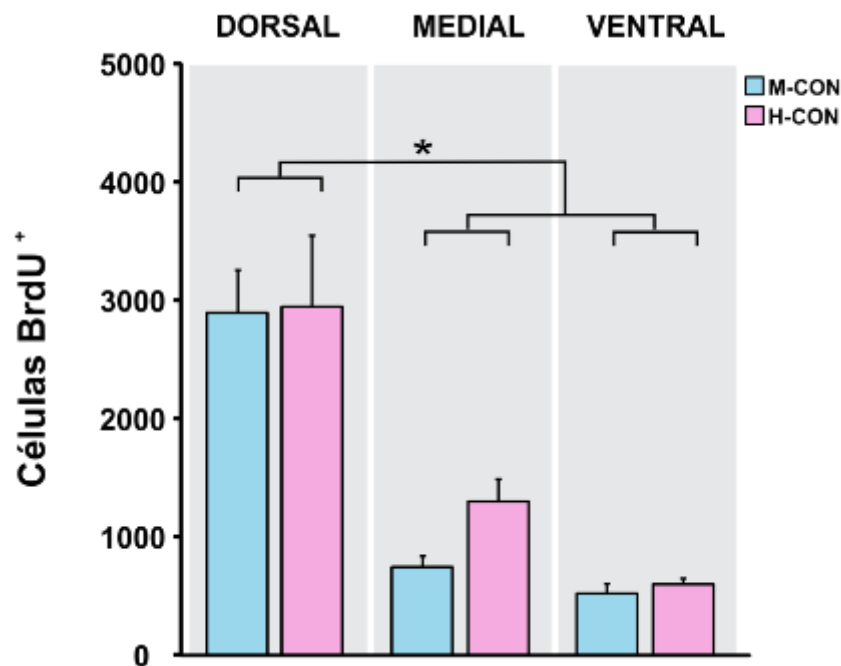
**Figura 1445.** Durante la diferenciación celular, el ejercicio incrementa en mayor número las células BrdU<sup>+</sup> en hembras. Número total de células BrdU<sup>+</sup> en el GD. Bajo condiciones control, no hay diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras. El ejercicio

*incrementa de manera significativa el número de células BrdU<sup>+</sup> en machos y hembras con respecto a su control. Este incremento fue significativamente mayor en hembras. \* p < 0.05.*

### **iii.i El ejercicio incrementa la diferenciación celular en la porción dorsal del giro dentado**

Para determinar si el efecto neurogénico del ejercicio es homogéneo a través del eje dorso-ventral, se cuantificó el número de células BrdU<sup>+</sup> a través de toda la extensión del GD. El hipocampo fue dividido en región dorsal, medial y ventral.

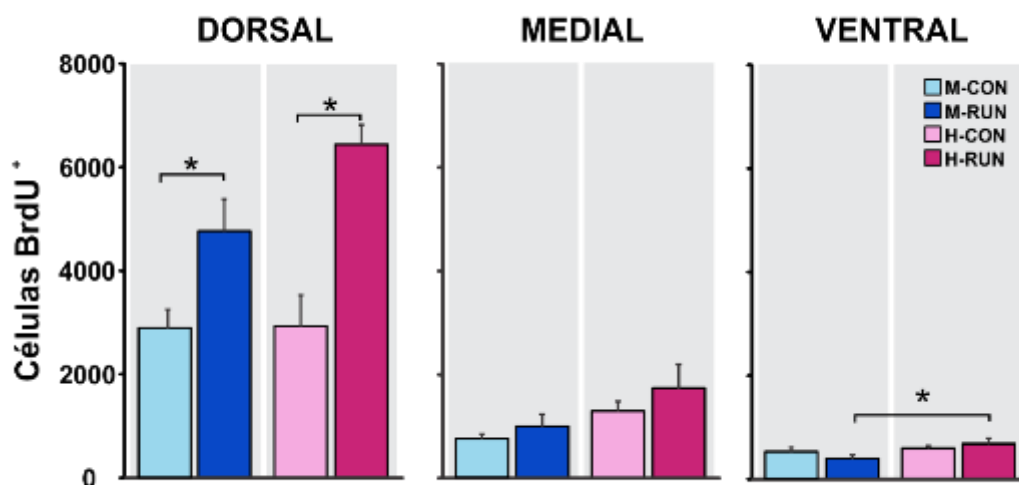
El análisis mostró que, en condición control, hay diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> por región ( $F_{(2,36)} = 34.34$ ,  $p < 0.0001$ ). Al comparar las regiones dorsal, medial y ventral se mostró que hay un mayor número de células BrdU<sup>+</sup> en la región dorsal del GD en ambos sexos (Dorsal: M-CON,  $3222 \pm 484$ ; H-CON,  $2930 \pm 599$ ; Medial: M-CON,  $828 \pm 108$ ; H-CON,  $1295 \pm 187$ ; Ventral: M-CON,  $566 \pm 93$ ; H-CON,  $598 \pm 48$ ;  $p < 0.05$ ; Figura 16). El análisis por región (dorsal, media y ventral) no mostró diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras control. ( $p > 0.05$ ; Figura 16).



**Figura 1546.** En condiciones control, el giro dentado tiene un mayor número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal. Número de células BrdU<sup>+</sup> en la región dorsal, medial y ventral del giro dentado. Existe un mayor número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal en ambos sexos. El número de células BrdU<sup>+</sup> por región es similar entre machos y hembras. M-CON: Machos control, H-CON: hembras control. \*  $p < 0.05$ .

El ejercicio incrementó significativamente el número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal en ambos sexos con respecto a su control (Dorsal: M-CON,  $2880 \pm 358$ ; M-RUN,  $4795 \pm 602$ ; H-CON,  $2930 \pm 599$ ; H-RUN,  $6438 \pm 381$ ;  $F_{(1,23)} = 30.30$ ,  $p < 0.0001$ ; Figura 17), no así, en las porciones medial y ventral en machos y hembras con respecto a su control (Medial: M-CON,  $743 \pm 92$ ; M-RUN,  $1006 \pm 229$ ; H-CON,  $1295 \pm 187$ ; H-RUN,  $1740 \pm 457$ ;  $F_{(1,23)} = 1.58$ ,  $p > 0.05$ ; Ventral: M-CON,  $520 \pm 82$ ; M-RUN,  $404 \pm 65$ ; H-CON,  $598 \pm 48$ ; H-RUN,  $684 \pm 106$ ;  $F_{(1,23)} = 0.03$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 14 y 17).

El análisis por región (dorsal, media y ventral) mostró diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras corredores en la región ventral ( $p < 0.05$ ), no así, en la porción media y dorsal ( $p > 0.05$ ; Figura 17).

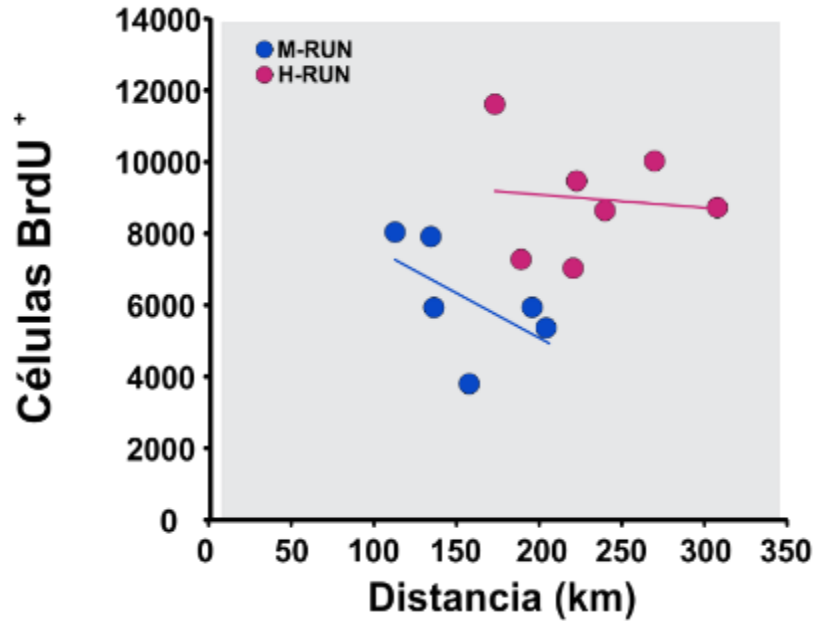


**Figura 1647.** El ejercicio incrementa el número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal del giro dentado. Número de células BrdU<sup>+</sup> en la región dorsal, medial y ventral del giro dentado. El ejercicio incrementó el número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal del giro dentado de machos y hembras. Este incremento es similar en ambos sexos. M-CON: Machos control; M-RUN: machos corredor; H-CON: hembras control; H-RUN: hembras corredor. \*  $p < 0.05$ .

### iii.ii El incremento en la diferenciación celular no depende de la distancia corrida

Para determinar si la distancia recorrida influye en el número de células que se diferencian, representadas por el número de células BrdU<sup>+</sup>. Se analizó la correlación entre la distancia total recorrida durante un periodo de 15 días y el número total de células BrdU<sup>+</sup>. El análisis mostró que no hay una correlación en la distancia que los ratones hembra y macho corren y el número de células BrdU<sup>+</sup> (Machos,  $r = -0.56$ ,  $p > 0.24$ ; hembras,  $r = -0.10$ ,  $p > 0.82$ ; Figura 18).

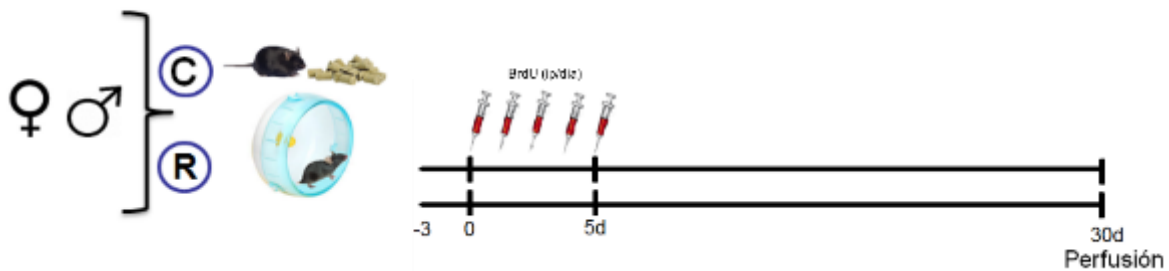




**Figura 1748.** La tasa de diferenciación celular no se correlaciona con la distancia corrida. Correlación entre la distancia total corrida durante un periodo de 15 días y el número de células BrdU<sup>+</sup> por animal. M-RUN: machos corredor y H-RUN: hembras corredor.

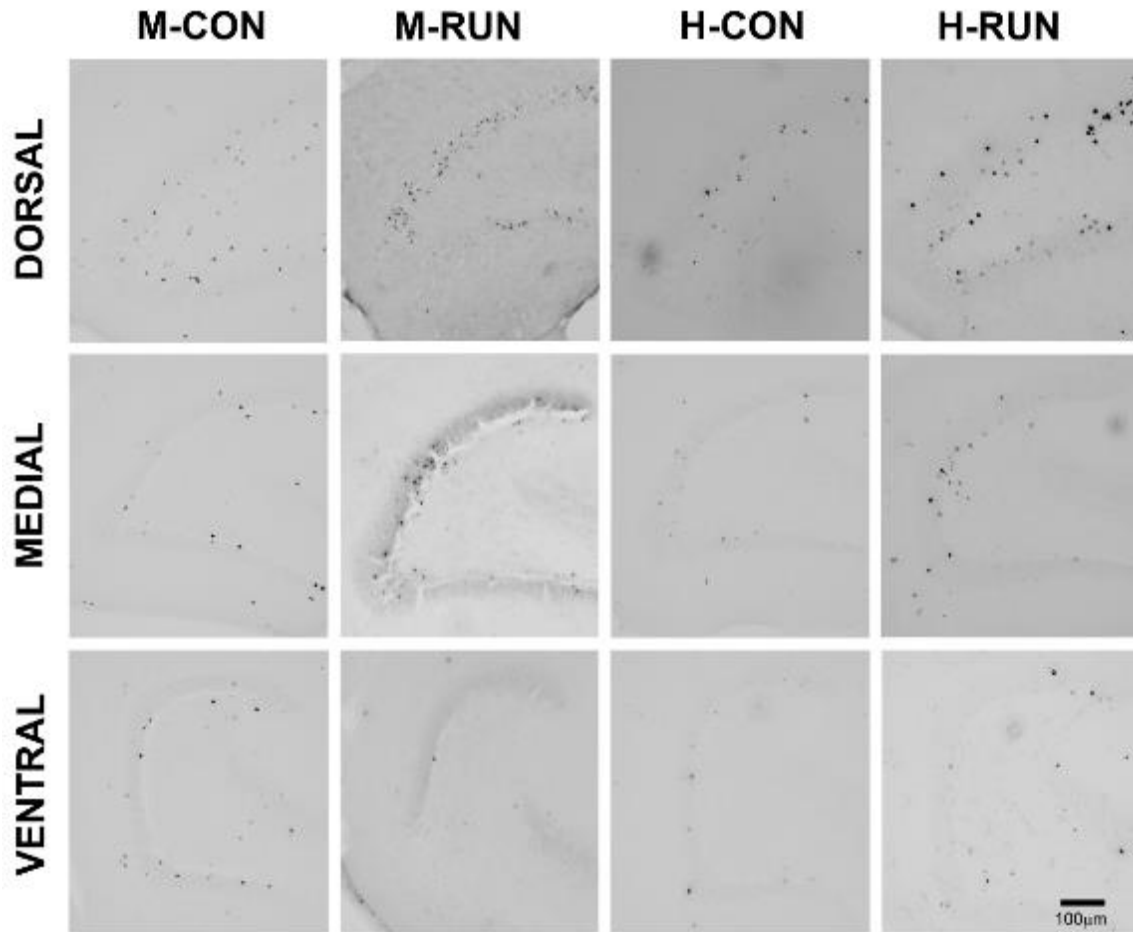
**iv. El ejercicio incrementa de manera similar la maduración celular en el giro dentado de machos y hembras**

Para determinar los niveles de células nuevas que sobreviven y alcanzan la madurez, ratones macho y hembra en condición sedentaria y de ejercicio (M-CON, n = 6; M-RUN, n = 9; H-CON, n = 8; H-RUN, n = 9) recibieron una inyección diaria durante 5 días de BrdU (50 mg/kg/ip). Los animales fueron sacrificados 30 días después de la primera inyección (Figura 19). Las células BrdU<sup>+</sup> a través del eje dorso-ventral del GD fueron cuantificadas (Figura 20).

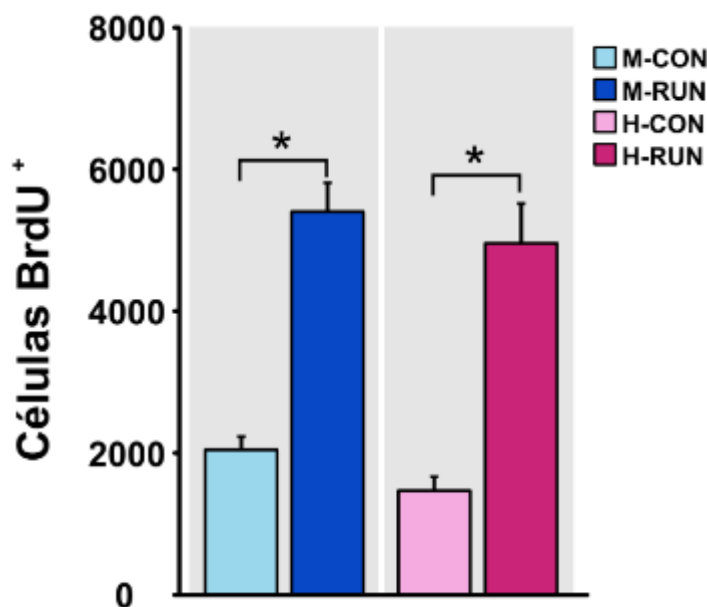


**Figura 1849.** *Curso temporal para determinar el efecto del ejercicio en la maduración neuronal.* Ratones macho y hembra fueron divididos en grupos control (C) y de ejercicio (R). Tres días después de haber sido colocados en sus respectivas condiciones recibieron una inyección diaria de BrdU (50mg/Kg, ip/ día) durante 5 días. Los animales fueron sacrificados 30 días después de la primera inyección.

El análisis mostro que, en condiciones control, no hay diferencias significativas en el número total de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras (M-CON, 1851 ± 192; H-CON, 1468 ± 196;  $p > 0.05$ ; Figura 20 y 21). El ejercicio incrementó el número total de células BrdU<sup>+</sup> en ambos sexos con respecto a su control (M-CON, 1851 ± 192 vs M-RUN, 5403 ± 40; H-CON, 1468 ± 196 vs H-RUN, 4956 ± 560;  $F_{(1,28)} = 63.76$ ,  $p < 0.0001$ ; Figura 20 y 21). Este incremento representó el 281% en machos y el 337% en hembras con respecto a su control. El incremento en el número de células BrdU<sup>+</sup> inducido por el ejercicio no fue significativamente diferente entre machos y hembras ( $p > 0.05$ ; Figura 21).



**Figura 1920.** El ejercicio incrementa la maduración celular en la porción dorsal del GD en machos y hembras. Fotomicrográficas representativas de la marca de BrdU en cortes horizontales del giro dentado del hipocampo a través del eje dorso-ventral. Los puntos negros representan la marca de BrdU de células maduras. El número de células BrdU<sup>+</sup> es mayor en la porción dorsal de ratones macho y hembra en la condición de ejercicio. M-CON: Machos control; M-RUN: machos corredor; H-CON: hembras control; H-RUN: hembras corredor.



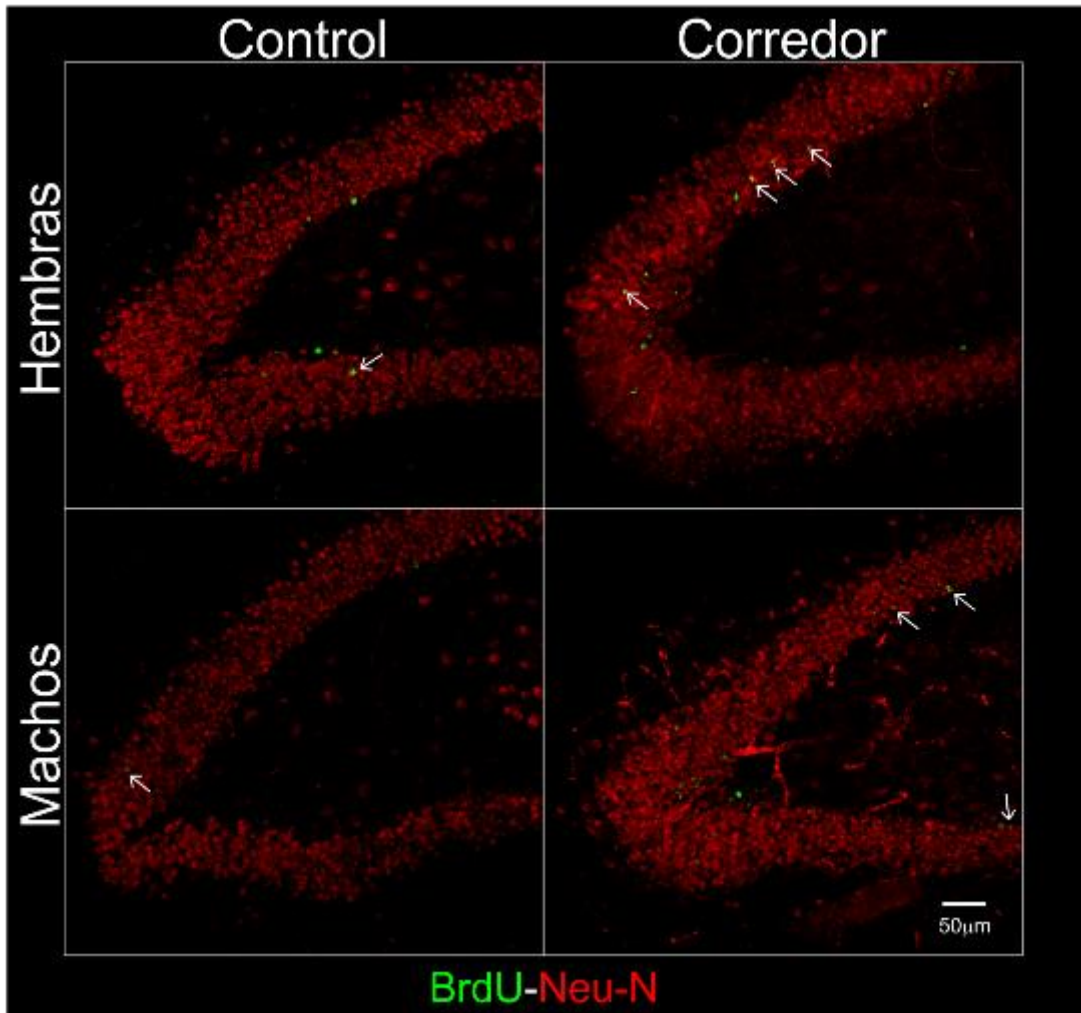
**Figura 2024.** El ejercicio incrementa de manera similar el número de células BrdU<sup>+</sup> en machos y hembras. Número total de células BrdU<sup>+</sup> en el GD. En condiciones control, no hay diferencia significativa del número total de células BrdU<sup>+</sup> entre ratones machos y hembra. El ejercicio incrementó significativamente el número de células BrdU<sup>+</sup> respecto a su control en ambos sexos. El aumento en el número de células BrdU<sup>+</sup> es similar entre machos y hembras corredores. M-CON: Machos control; M-RUN: machos corredor; H-CON: hembras control; H-RUN: hembras corredor. \*  $p < 0.05$ .

#### iv.i El ejercicio incrementa el porcentaje de células nuevas con fenotipo neuronal

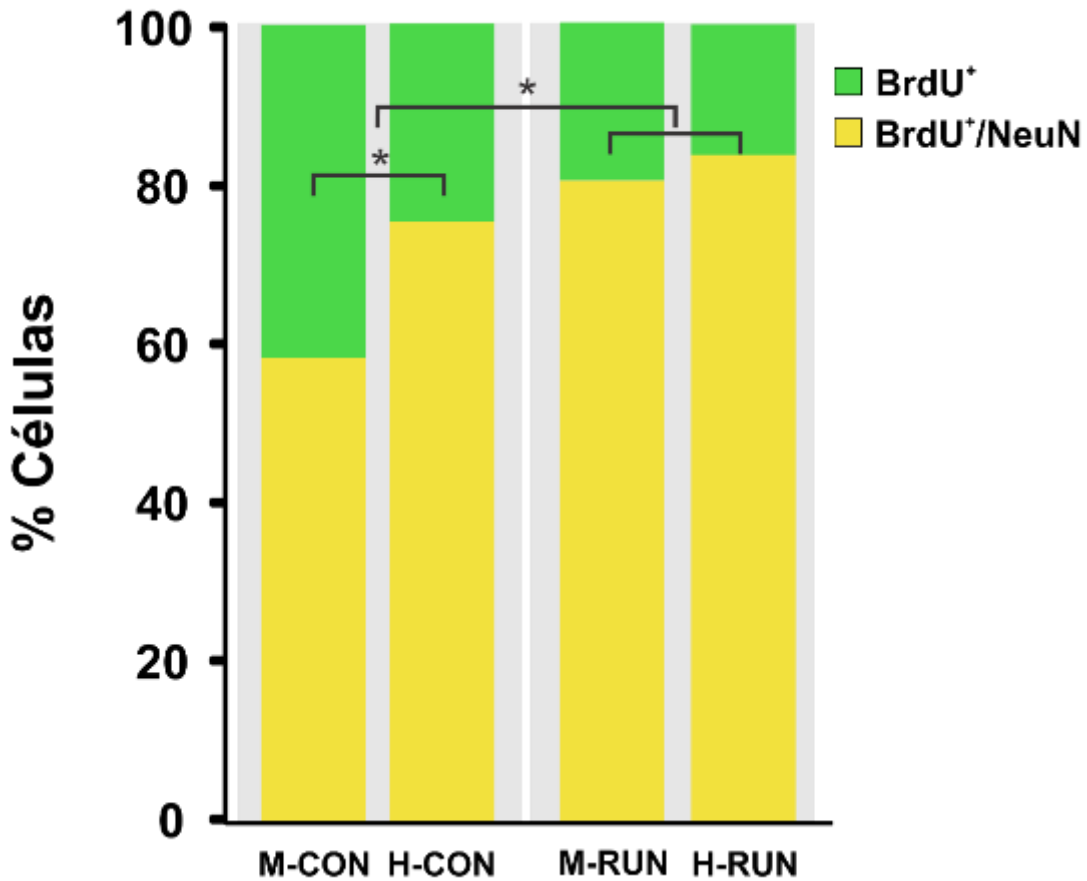
Para determinar el fenotipo de las células BrdU<sup>+</sup>, se hizo un doble marcaje inmunofluorescente de BrdU y el marcador neuronal NeuN, en muestras que se obtuvieron 4 semanas después de la primera inyección de BrdU (Figura 19).

El análisis mostró que en condiciones control, el porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> con fenotipo neuronal (BrdU<sup>+</sup>/NeuN) es mayor en hembras con respecto a machos (H-CON  $80 \pm 4\%$  vs M-CON  $58 \pm 8\%$ ;  $p < 0.05$ ). El efecto del ejercicio en el porcentaje de células con fenotipo neuronal (BrdU<sup>+</sup>/NeuN) fue significativamente diferente al porcentaje en los animales control (M-RUN  $80 \pm 3\%$ ; H-RUN  $84 \pm 2\%$  vs M-CON  $58 \pm 8\%$ ; H-CON  $80 \pm 4\%$ ;  $F_{(1,14)} = 4.81$ ,  $p < 0.04$ ). El análisis no mostró

diferencias significativas en el porcentaje de células con fenotipo neuronal entre machos y hembras corredoras (M-RUN  $80 \pm 3\%$  vs H-RUN  $84 \pm 2\%$ ;  $p > 0.05$ ; Figura 22 y 23).



**Figura 22. El ejercicio incrementa de manera similar las células nuevas con fenotipo neuronal en machos y hembras.** Fotomicrografías representativas de la doble marca inmunofluorescente en cortes horizontales del giro dentado del hipocampo. Los puntos rojos representan las células de la capa granular del giro dentado que expresan el marcador neuronal NeuN, los puntos verdes representan las células nuevas que expresan la marca de BrdU, los puntos amarillos representan las células nuevas que son neuronas (señalados por flechas).

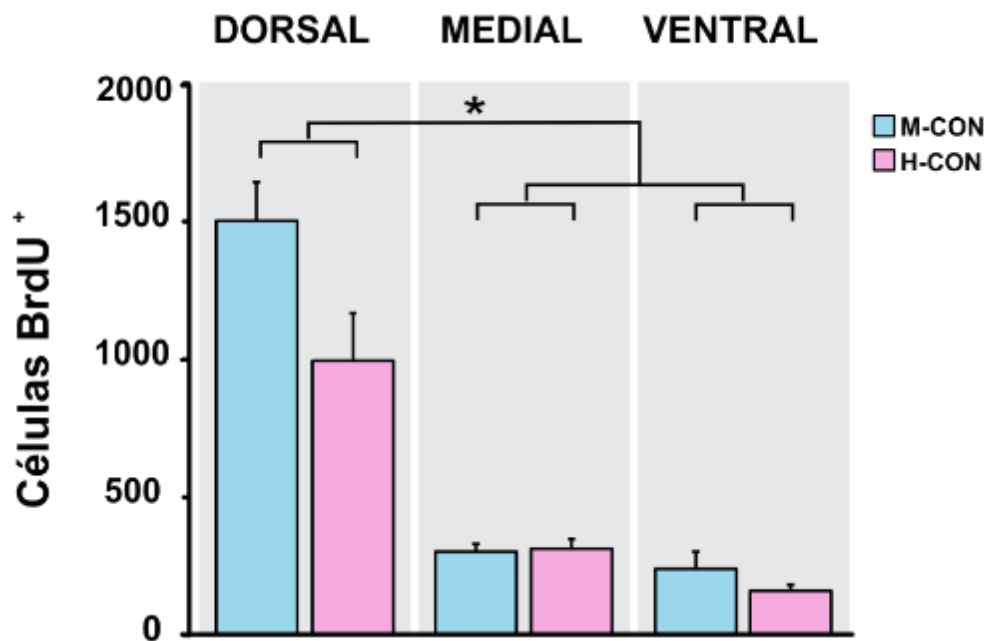


**Figura 2123.** El ejercicio incrementa el porcentaje de células nuevas con fenotipo neuronal (**BrdU<sup>+</sup>/NeuN**). Porcentaje de células BrdU<sup>+</sup>, y BrdU<sup>+</sup>/NeuN en el GD. En condiciones control las hembras presentan un mayor porcentaje de células BrdU<sup>+</sup>/NeuN. El ejercicio incrementó el porcentaje de células BrdU<sup>+</sup>/NeuN con respecto a la condición control. La comparación entre machos y hembras en condiciones de ejercicio no mostró diferencias significativas en el porcentaje de células BrdU<sup>+</sup>/NeuN M-CON: Machos control; H-CON: hembras control; M-RUN: machos corredor; H-RUN: hembras corredor. En amarillo porcentaje de células con doble marca BrdU<sup>+</sup>/NeuN y en verde porcentaje de células BrdU<sup>+</sup>. \* $p < 0.05$ .

#### iv.ii El ejercicio incrementa la maduración celular en la porción dorsal del giro dentado

Para determinar si el efecto neurogénico del ejercicio es homogéneo a través del eje dorso-ventral, se cuantificó el número de células BrdU<sup>+</sup> a través de toda la extensión del GD. El hipocampo fue dividido en región dorsal, medial y ventral.

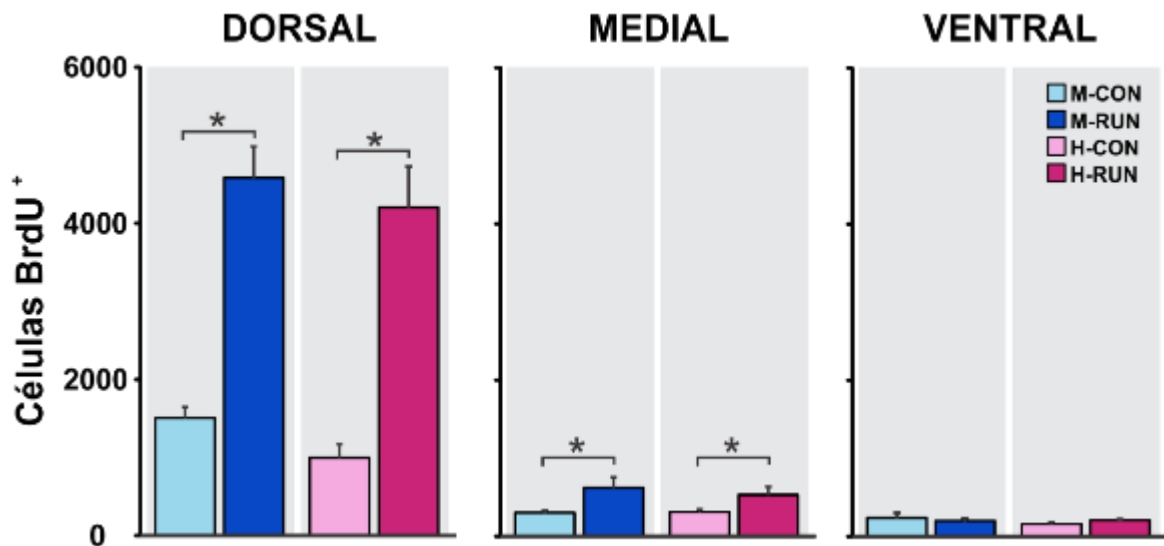
El análisis mostró que, en condición control, hay diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> por región ( $F_{(2,36)} = 56.46$ ;  $p < 0.0001$ ). En la región dorsal del GD hay un mayor número de células BrdU<sup>+</sup> con respecto a la región medial o ventral en ambos sexos (Dorsal: M-CON,  $1506 \pm 141$ ; H-CON,  $996 \pm 173$ ; Medial: M-CON,  $301 \pm 28$ ; H-CON,  $312 \pm 35$ ; Ventral: M-CON,  $238 \pm 62$ ; H-CON,  $159 \pm 22$ ;  $p < 0.05$ ; Figura 24). El análisis por región (dorsal, media y ventral) no mostró diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras control ( $p > 0.05$ ; Figura 24).



**Figura 2224.** En condiciones control, hay un mayor número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal del GD. Número de células BrdU<sup>+</sup> en la región dorsal, medial y ventral del giro dentado. Existe un mayor número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal en ambos sexos. El número de células BrdU<sup>+</sup> por región es similar entre machos y hembras. M-CON: Machos control, H-CON: hembras control. \*  $p < 0.05$ .

El ejercicio incrementó significativamente el número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal y medial en machos y hembras con respecto a su control (Dorsal: M-CON, 1506 ± 141; M-RUN, 4583 ± 401; H-CON, 996 ± 173; H-RUN, 4203 ± 524;  $F_{(1,28)} = 61.48$ ,  $p < 0.0001$ ; Medial: M-CON, 301 ± 28 vs M-RUN, 620 ± 135; H-CON, 312 ± 35; H-RUN, 531 ± 101;  $F_{(1,28)} = 9.44$ ,  $p < 0.004$ ; Figura 25). En la porción ventral el ejercicio no mostró diferencias significativas en el número de células BrdU<sup>+</sup> (Ventral: M-CON, 238 ± 62 vs M-RUN, 200 ± 31; H-CON, 159 ± 22 vs H-RUN, 209 ± 14;  $F_{(1,28)} = 0.51$ ,  $p > 0.47$ ; Figura 25).

Al comparar el número de células BrdU<sup>+</sup> por región (dorsal, media y ventral) en condiciones de ejercicio, el análisis no mostró diferencias significativas entre machos y hembras ( $p > 0.05$ ; Figura 25).

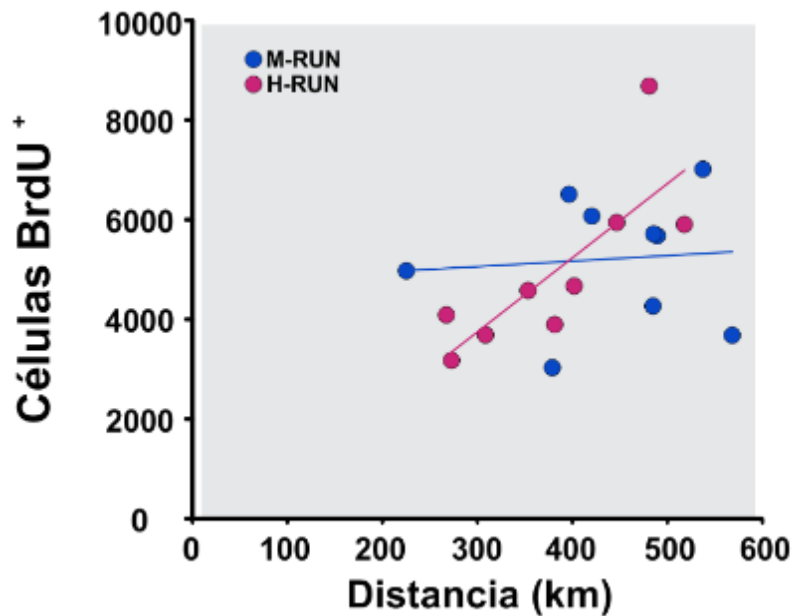


**Figura 2325.** El ejercicio incrementa la maduración celular en la porción dorsal y medial del giro dentado. Número de células BrdU<sup>+</sup> en la región dorsal, medial y ventral del giro dentado. El ejercicio incrementó el número de células BrdU<sup>+</sup> en la porción dorsal y medial en ambos sexos. Este incremento es similar entre machos y hembras. M-CON: Machos control; M-RUN: machos corredor; H-CON: hembras control; H-RUN: hembras corredor. \*  $p < 0.05$ .



iv.iii **La distancia que las hembras corren correlaciona con el número de células nuevas que sobreviven y alcanzan su madurez.**

Para determinar si la distancia corrida influye en el número de células que sobreviven y alcanzan la maduración, representadas por el número de células BrdU<sup>+</sup>, se analizó la correlación entre la distancia total corrida durante un periodo de 30 días y el número total de células BrdU<sup>+</sup>. El análisis mostró que existe una correlación positiva en hembras ( $r = 0.79$ ,  $p < 0.01$ ), no así, en machos ( $r = 0.08$ ,  $p > 0.82$ ; Figura 26), lo que sugiere una modulación diferencial, dependiente de la distancia corrida, en la sobrevivencia y maduración celular entre machos y hembras.



**Figura 2426.** En ratones hembra, la maduración celular se correlaciona con la distancia total corrida. Correlación entre la distancia total corrida durante un periodo de 30 días y el número de células BrdU<sup>+</sup> por animal. M-RUN: machos corredor y H-RUN: hembras corredor.

**v. El ejercicio modula de manera diferente el proceso de neurogénesis en machos y hembras**

El proceso neurogénico, desde que una célula progenitora neural quiescente (QNP) es activada hasta alcanzar el estadio de una neurona nueva madura, dura aproximadamente 30 días. Una vez que las QNP son activadas, dan origen a progenitores de amplificación, estas células proliferan (0-7 días) y se diferencian a neuroblastos de tipo 1 y posteriormente a neuroblastos de tipo 2 (15 días). En esta etapa, un porcentaje de estas células morirá y su sobrevivencia dependerá de su activación a través de la activación de receptores NMDA. Las células que logren sobrevivir se convertirán en neuronas maduras.

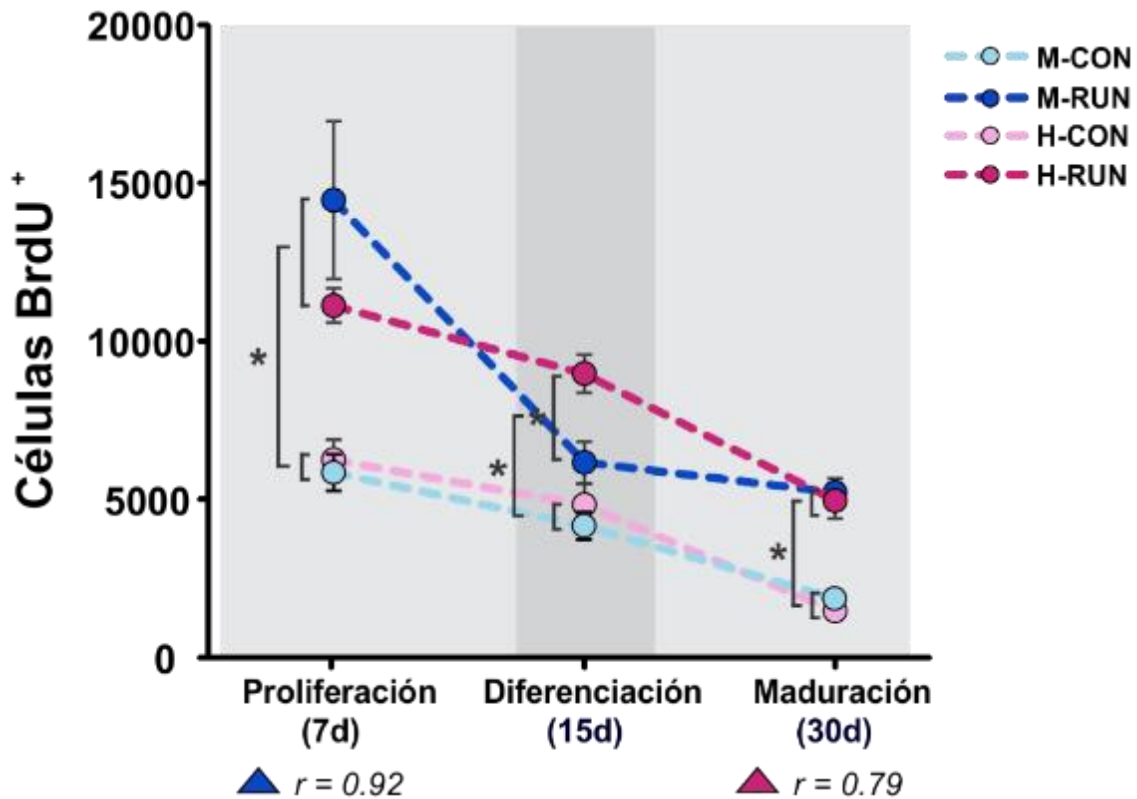
Nuestros resultados mostraron que en condiciones control, los niveles de proliferación, diferenciación y maduración, representados por el número de células BrdU<sup>+</sup>, son similares en ratones macho y hembra (Figura 27). Del total de células BrdU<sup>+</sup> que proliferan, menos del 50% de estas células sobreviven y alcanzan la madurez (Figura 28).

El ejercicio incrementó el número total de células BrdU<sup>+</sup> en cada fase de la neurogénesis (proliferación, diferenciación y maduración) respecto a los animales control en ambos sexos (Figura 27). En la fase de proliferación (0-7 días), el ejercicio incrementó significativamente el número de células BrdU<sup>+</sup> en ambos sexos con respecto a su control ( $p < 0.05$ ; Figura 27). Este incremento fue similar entre machos y hembras ( $p > 0.05$ ). El incremento en el número de células BrdU<sup>+</sup> representó el 247% en machos y el 178% en hembras con respecto a sus controles (Figura 28). Interesantemente en ratones macho, el incremento en el número total de células BrdU<sup>+</sup> correlacionó con la distancia total corrida ( $r = 0.92$ ,  $p < 0.002$ ), es decir, que mientras mayor sea la distancia corrida mayor será el número de células en proliferación. Esta correlación no fue observada en hembras ( $r = 0.57$ ,  $p > 0.08$ ; Figura 27). Esto sugiere una modulación diferencial, dependiente de la distancia corrida, en la proliferación celular entre machos y hembras.

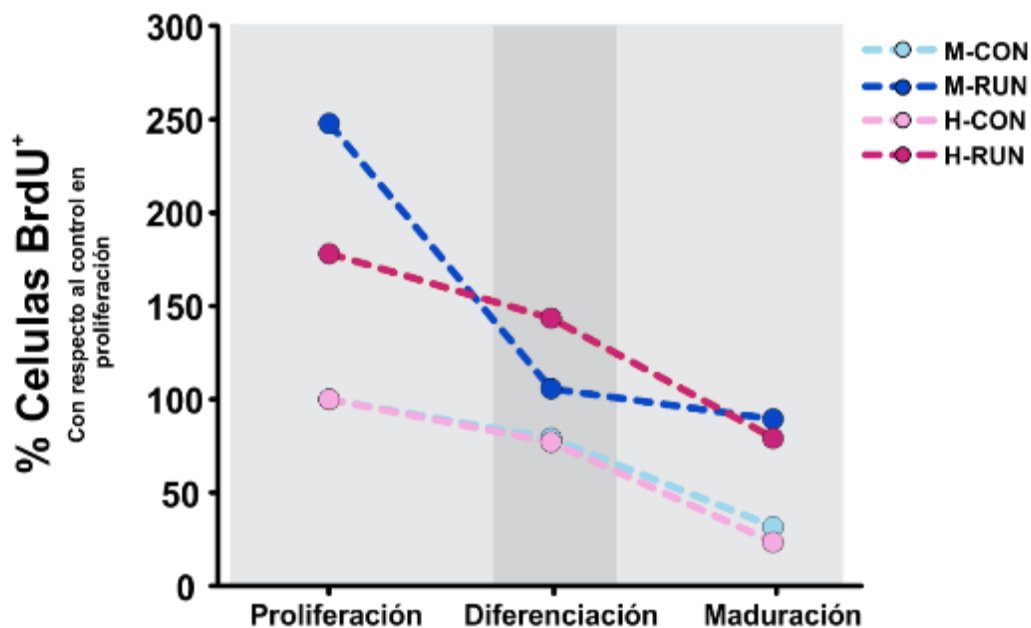
Durante la fase de diferenciación (15 días), el ejercicio incrementó significativamente el número de células BrdU<sup>+</sup> en ambos sexos con respecto a su control ( $p < 0.05$ ; Figura 27). El análisis mostró que hay diferencias significativas en el número total de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras corredores, siendo las hembras quienes presentan un mayor número de células BrdU<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ; Figura 27). Del total de células que proliferan solo algunas de estas logran diferenciarse. En condiciones control, el porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> que alcanzaron la fase de diferenciación fue del 71% en machos y 77% en hembras, con respecto al número de células que proliferaron. El ejercicio incrementó el porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> que alcanzaron esta fase, el cual representó el 105% en machos y el 143% en hembras, con respecto al porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> que proliferaron en condiciones control (Figura 28). La tasa de diferenciación celular no correlacionó con la distancia total corrida para ninguno de los sexos (Machos,  $r = -0.56$ ,  $p > 0.24$ ; hembras,  $r = -0.10$ ,  $p > 0.82$ ).

Del total de células que proliferan solo algunas de estas llegan a la madurez (30 días). El ejercicio incrementó significativamente el número de células BrdU<sup>+</sup> en ambos sexos con respecto a su control ( $p < 0.05$ ; Figura 27), el cual fue similar entre machos y hembras ( $p > 0.05$ ).

En condiciones control el porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> que alcanzaron la fase de maduración fue del 31% en machos y 23% en hembras, con respecto al porcentaje de células que proliferaron. Sin embargo en condiciones de ejercicio el porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> que alcanzo la fase de maduración fue mayor, el cual representó el 89% en machos y el 79% en hembras con respecto al porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> que proliferaron en condiciones control (Figura 28). Además, en ratones hembra, el incremento en el número total de células BrdU<sup>+</sup> correlacionó con la distancia total recorrida ( $r = 0.79$ ,  $p < 0.01$ ), no así, en machos ( $r = 0.08$ ,  $p > 0.82$ ; Figura 27), lo que indica que en hembras, mientras más corran el número de neuronas nuevas será mayor. Estos datos sugieren una modulación diferencial, dependiente de la distancia corrida, en la sobrevivencia y maduración celular entre machos y hembras.



**Figura 2527.** El efecto neurogénico inducido por ejercicio es diferente entre machos y hembras. Curso temporal del número total de células BrdU<sup>+</sup> en el GD en cada fase de la neurogénesis (proliferación, diferenciación y maduración). En condiciones control, no hay diferencia significativa del número total de células BrdU<sup>+</sup> entre ratones machos y hembra en cada fase de la neurogénesis. El ejercicio incrementó significativamente el número de células BrdU<sup>+</sup> en cada fase de la neurogénesis en ambos sexos con respecto a su control. El incremento fue similar entre machos y hembras corredores durante la fase de proliferación y maduración, no así, en la fase de diferenciación. M-CON: Machos control; M-RUN: machos corredor; H-CON: hembras control; H-RUN: hembras corredor. Área de color gris fuerte: periodo crítico en el cual la modulación del ejercicio es diferencial entre machos y hembras. (d): días. Triángulo azul: correlación positiva en machos corredores, triángulo rosa: correlación positiva en hembras corredoras. \* p < 0.05.



**Figura 2628.** El ejercicio incrementa el porcentaje de células nuevas en cada fase de la neurogénesis. Porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> generadas en la fase de proliferación, diferenciación y maduración. Porcentajes calculados con respecto al porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> que proliferaron en condiciones control. M-CON: Machos control; M-RUN: machos corredor; H-CON: hembras control; H-RUN: hembras corredor. Área de color gris fuerte: periodo crítico en el cual la modulación del ejercicio es diferencial entre machos y hembras.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo estuvo enfocado a determinar si el ejercicio impacta de manera similar los niveles de proliferación, diferenciación y maduración neuronal en machos y hembras. Los resultados obtenidos mostraron que, bajo la condición control, no hay diferencias significativas en los niveles de neurogénesis entre sexos en ninguna de las tres fases del proceso de neurogénesis. El ejercicio incrementó a más del doble el número de nuevas neuronas en la porción dorsal del giro dentado del hipocampo en ambos sexos, con respecto a su control. Este incremento fue similar entre machos y hembras en la fase de proliferación y maduración, no así, en la fase de diferenciación, donde las hembras tuvieron un mayor número de células que alcanzaron la diferenciación. Adicionalmente, la distancia corrida se correlacionó positivamente en machos durante la fase de proliferación y en hembras durante la fase de maduración. Lo anterior sugiere que el ejercicio modula de diferente manera el proceso de neurogénesis entre machos y hembras.

Nuestros resultados concuerdan con los trabajos de neurogénesis realizados de manera independiente, donde se reporta que el ejercicio voluntario incrementa significativamente la proliferación, diferenciación y maduración celular en el giro dentado del hipocampo, tanto en hembras (van Praag et al. 1999; Couillard-Despres et al. 2005; Kobilic et al. 2011) como en machos (Snyder et al. 2009; Yau et al. 2011; Patten et al., 2013; Mustroph et al. 2012). En el presente trabajo se mantuvieron a ratones hembra y macho bajo las mismas condiciones, lo que permitió observar que el curso temporal en los niveles de células nuevas en las tres fases de la neurogénesis es regulado de manera diferente entre ambos sexos.

En condiciones control, el número de células BrdU<sup>+</sup> en la fase de proliferación, diferenciación y maduración fue similar entre machos y hembras, lo que sugiere que la neurogénesis es similar en ambos sexos. Nuestros resultados coinciden con el trabajo de Lagace y colaboradores donde se muestra que, en condiciones control, los niveles de proliferación y maduración en ratones macho y hembra de la cepa C57Bl/6 son similares (Lagace et al., 2007). Los mismos autores

muestran que los niveles de neurogénesis en hembras no son influenciados por el ciclo estral o después de una ovariectomía (Lagace et al., 2007).

## **Proliferación**

En la fase de proliferación nuestros resultados mostraron que el ejercicio incrementó en más del doble el número de células BrdU<sup>+</sup> en ambos sexos con respecto a sus controles; aunque el incremento fue mayor en los machos, no hubo diferencias significativas entre ambos sexos.

Se sabe que algunos de los factores implicados en la regulación de la proliferación celular son neurotransmisores, factores neurotróficos endógenos, y factores de crecimiento, por ejemplo, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), el inhibidor de la unión al diazepam (DBI), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento similar-insulina I (IGF-I), el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) (Zhao et al., 2008; Braun et al., 2014; Dumitru et al., 2017). De hecho se ha mostrado que el ejercicio incrementa los niveles de estos factores en ambos sexos (Eliakim et al., 1997; Trejo et al., 2001; Voss et al., 2013).

Durante esta fase, los resultados mostraron que en machos existe una correlación entre la distancia total corrida y el número de células que proliferan. Estudios previos muestran que existe una asociación entre la distancia que se corre y el incremento en la proliferación celular en machos. Específicamente, se ha mostrado que cuando los animales corren durante su fase activa (periodo de oscuridad) hay una correlación entre la distancia corrida y el número de células en proliferación, no así durante los periodos de luz, lo que sugiere que la proliferación celular podría estar regulada por el ritmo circadiano (Holmes et al., 2004).

Es posible que la modulación diferencial, dependiente de la distancia corrida, en la proliferación celular entre machos y hembras, pudiera estar mediada por la concentración de corticosteroides (Brummelte et al., 2010), ya que se sabe que los niveles de estas hormonas están en función del ciclo circadiano (Holmes et al., 2004; Gibson et al., 2010), y que alcanzan su máxima concentración durante la fase activa del animal (Ottenweller et al., 1979). En este trabajo no pudimos medir si la

distancia que el ratón corre durante el día o la noche podría ser un factor que incremente los niveles de corticosteroides, y si las hembras en condición de ejercicio tienen una respuesta diferente durante la proliferación celular a estos niveles en comparación con los machos.

También se ha visto que la proliferación celular se ve afectada por la cantidad de corticosteroides (Cameron et al., 1994; Westenbroek et al., 2004), probablemente debido a esto no existe una correlación entre la distancia y el número de células que proliferan en hembras, pero sí en machos.

### **Diferenciación**

El análisis en cada fase del proceso de neurogénesis nos permite evaluar el número de células BrdU<sup>+</sup> que llegan a la fase de diferenciación. Durante esta fase el ejercicio incrementó el número de células nuevas en ambos sexos con respecto a su control; algo notable es que, este incremento fue significativamente mayor en las hembras. Estos resultados sugieren que, el mecanismo mediante el cual el ejercicio actúa sobre los factores endógenos que inciden en el número de células que se diferencian, es diferente entre machos y hembras.

Algunos de los factores que regulan este proceso son: el factor de diferenciación neuronal NeuroD, el factor de transcripción Prox1, neurotransmisores como GABA y glutamato, y de manera muy importante el factor neuronal derivado del cerebro (BDNF) (Braun et al., 2014).

De hecho, en hembras se sabe que hay una interacción entre los niveles de estrógenos y el ejercicio; esta interacción resulta en un incremento en los niveles de BDNF, particularmente en el giro dentado y el área CA3, que se registra desde la primera semana que el animal realiza el ejercicio (Berchtold et al., 2001). En los machos, por el contrario, se ha visto que el BDNF se incrementa después de la fase de diferenciación, y que su concentración está en función de la cantidad de ejercicio que el animal realice (Neeper et al., 1995; Adlard et al., 2004; Farmer et al., 2004). Los resultados de estos estudios nos sugieren que los niveles de BDNF son un factor importante en porque las hembras tuvieron un mayor número de células



BrdU<sup>+</sup> en la fase de diferenciación.

Interesantemente, nuestros resultados muestran que en esta fase no hay una correlación entre la distancia total corrida y el número de células nuevas en ambos sexos, lo cual concuerda con el estudio realizado en machos (Bednarczyk et al., 2009), y en hembras, nuestro trabajo es el primer estudio que reporta este análisis.

Las diferencias en el número de células BrdU<sup>+</sup> entre machos y hembras en esta fase podrían deberse también a diferencias en la conectividad que tienen las nuevas células del giro dentado. Se ha demostrado que desde estadios tempranos (7 días) estas células reciben señales de interneuronas GABAérgicas, y células glutamatérgicas hipocampales, como las células musgosas, células granulares maduras y las células piramidales de CA1-3 (Sah et al., 2017). Es posible que el ejercicio este afectando la conectividad de las nuevas células durante la fase de diferenciación, y que esta influencia del ejercicio en la conectividad podría ser diferente entre machos y hembras. Esto podría explicar las diferencias que encontramos, sin embargo, es algo que aún deberá explorarse en investigaciones futuras.

## **Maduración**

Se sabe que una cantidad importante de células que se diferenciaron morirán antes de llegar a la madurez (Cameron et al., 1993). Las células que lograron sobrevivir continúan el proceso de maduración, proceso que implica cambios en la excitabilidad de la membrana y en la morfología de la célula, así como el establecimiento de una conectividad apropiada dentro de los circuitos neuronales ya existentes (Piatti et al., 2006). Se ha demostrado que estos cambios se dan a través de la activación de los receptores NMDA (Tashiro et al., 2006), y por el crecimiento de las espinas dendríticas, dado que son los principales sitios postsinápticos de las células granulares (Zhao et al., 2006).

Nuestros resultados mostraron que en la fase de maduración el ejercicio incrementó el número de células BrdU<sup>+</sup> en ambos sexos con respecto a su control,

y que este incremento fue similar entre machos y hembras. Estos resultados sugieren que, aunque el efecto del ejercicio en el incremento de nuevas neuronas es similar entre machos y hembras, el mecanismo mediante el cual el ejercicio actúa para promover que las células que se diferenciaron alcancen la madurez, es diferente entre machos y hembras. Probablemente esto se debe al momento de la formación de espinas dendríticas, ya que este proceso refleja una de las transiciones fisiológicas más importantes de las nuevas neuronas.

De hecho, se sugiere que la activación de los receptores NMDA promueve el crecimiento dendrítico y la formación de espinas durante el proceso de maduración (Sah et al., 2017). Se sabe que el ejercicio durante un mes incrementa la aparición de espinas dendríticas y la motilidad de estas (Zhao et al., 2006), lo que sugiere que el ejercicio además de incrementar la neurogénesis también tiene un efecto en el proceso de maduración de las nuevas neuronas lo que podría influir en la tasa de integración dentro del circuito hipocampal, esto sugiere que las células que no sobrevivieron porque probablemente no lograron integrarse a la red neuronal ya existente.

Otro candidato que podría estar influyendo en el mecanismo por el cual el ejercicio actúa sobre la maduración neuronal, es la síntesis de la proteína “catepsina-B”, la cual en condiciones de ejercicio se incrementa a partir del día 14, alcanzando una concentración significativamente mayor después de que el animal corre durante 30 días (Moon et al., 2016). En este trabajo muestran que el ejercicio incrementa los niveles de catepsina-B, la cual es liberada por el músculo esquelético, y juega un papel importante en la plasticidad cerebral. Esto se observó en roedores, primates y en humanos, en los cuales se encontró una correlación positiva entre los niveles de catepsina-B, y la mejora en procesos de memoria dependientes del hipocampo (Moon et al., 2016). Esto muestra que los beneficios del ejercicio sobre la función cerebral dependen tanto de factores centrales como periféricos. Sin embargo, faltan estudios para determinar si los niveles de la proteína catepsina-B se incrementan de manera similar entre sexos.

Es de resaltar que en la fase de maduración nosotros encontramos que las hembras presentan una correlación positiva entre la distancia que corren y el número de células marcadas con BrdU, lo que sugiere que mientras más corran el número de células nuevas será mayor.

Pocos estudios han analizado una correlación entre la distancia que el animal corre durante 30 días y el número de células BrdU<sup>+</sup>. En el trabajo de Clark y colaboradores encontraron una correlación positiva entre distancia-células BrdU<sup>+</sup> después de 45 días de ejercicio; sin embargo, ellos analizan en conjunto hembras y machos (Clark et al., 2011).

Por otra parte, se ha mostrado que en condiciones control existe una regulación de los niveles corticosteroides (hormonas secretadas en respuesta a estrés) con respecto al ciclo circadiano, y se sabe que la liberación de corticosterona aumenta en asociación con el ejercicio en cualquier momento del ciclo circadiano (Otteweller et al., 1979; Sellers et al., 1988). De manera interesante, se ha mostrado que las hembras en condiciones de estrés presentan una tasa mayor de supervivencia celular a diferencia de los machos (Westenbroek et al., 2004), dado que nosotros no evaluamos los periodos en los que los animales corrieron ni los niveles de corticosteroides, sugerimos que podría haber una regulación diferencial en estas hormonas entre sexos y es por ello que no encontramos una correlación en machos, pero si en hembras.

### **El efecto neurogénico del ejercicio se da en la porción dorsal**

Está establecido que el ejercicio incrementa la neurogénesis; sin embargo, la distribución regional de las nuevas células inducidas por el ejercicio no está del todo caracterizada. Estudios previos han mostrado que bajo condiciones control, el hipocampo no actúa como una estructura homogénea, ya que presenta una disociación funcional a lo largo del eje dorso-ventral (Moser, 1998).

Estudios anatómicos de expresión génica y de comportamiento sugieren que la región dorsal mantiene conexiones recíprocas con otras áreas involucradas en el procesamiento cognitivo y la locomoción, mientras que la región ventral del

hipocampo comparte conexiones con la amígdala, la corteza prefrontal medial y el hipotálamo, regiones asociadas principalmente con la regulación neuroendocrina, el estrés y las funciones afectivas (Fanselow y Dong, 2010).

Sin embargo, los mecanismos subyacentes al efecto del ejercicio de manera regionalizada no están del todo claros. Estudios previos han mostrado que, bajo condiciones control, la región dorsal del giro dentado tiene un mayor número de nuevas neuronas, las cuales tienen mayor conectividad, así como también su tasa de maduración es mayor, comparada con la región ventral del giro dentado (Jinno 2011; Piatti et al. 2011).

De manera interesante, el efecto neurogénico del ejercicio no es homogéneo a través del eje dorso-ventral. Vivar y colaboradores mostraron que, bajo condiciones de ejercicio, la maduración neuronal se incrementa en la región dorsal, y medial, no así, en la región ventral del giro dentado del hipocampo de ratones macho (Vivar et al., 2016).

Esto concuerda con nuestros resultados en la fase de maduración, que muestran que el efecto neurogénico del ejercicio se observa en la parte dorsal y medial del GD tanto en machos como en hembras. En la fase de proliferación y diferenciación el efecto del ejercicio solo se observó en la porción dorsal en ambos sexos.

El efecto del ejercicio al generar nuevas neuronas en la parte dorsal podría tener relación con la función que tienen estas nuevas células, y esto a su vez estar implicado en el efecto del ejercicio en la mejora de procesos cognitivos. De hecho, diversos estudios han mostrado que el ejercicio mejora la memoria y el aprendizaje, la separación de patrones, así como el desempeño en tareas de reconocimiento de objetos (O'Callaghan et al., 2007; van Praag, 2008; Creer et al., 2010). Nuestros resultados sugieren que el ejercicio está beneficiando a ambos sexos.

Otro de los beneficios del ejercicio es que mejora el estado de ánimo (Erickson et al., 2013) y como se mencionó anteriormente, la región ventral del giro dentado es la que regula estos procesos. El hecho de que nuestros resultados muestren que en esta porción no se incrementó el número de nuevas neuronas con el ejercicio, podría deberse a que el mecanismo por el cual el ejercicio influye en las

emociones no es a través de un incremento en la neurogénesis, sino posiblemente sea a través de modificaciones en las conexiones neuronales de esta región, y que dependa de la cantidad o los tipos de neurotransmisores liberados bajo esta condición.

## **CONCLUSIÓN**

Nuestros datos muestran que, en condiciones control, el proceso de neurogénesis es similar entre machos y hembras.

Adicionalmente, mostramos que ratones hembra y macho de la cepa C57Bl6 corren distancias similares, el ejercicio incrementó de manera similar la neurogénesis hipocampal en la porción dorsal y medial del giro dentado de machos y hembras. Sin embargo, el mecanismo por el cual el ejercicio influye en cada fase de la neurogénesis es diferente entre machos y hembras.

Finalmente, se encontró que la correlación distancia corrida-número de células nuevas depende del estadio y del sexo. Aún se necesita más investigación para comprender los mecanismos celulares que subyacen a los efectos del ejercicio sobre la neurogénesis del cerebro adulto, sin embargo, el ejercicio es una intervención eficaz que podría utilizarse para aumentar y mantener la función cognitiva a lo largo de la vida.

## **PERSPECTIVAS**

Queda por investigar si los mecanismos moleculares en el efecto del ejercicio se modulan en respuesta a características fisiológicas dependientes del sexo, determinar la interacción de factores centrales, periféricos y hormonales con el ejercicio. Así como dilucidar si existen diferencias en las características morfológicas y en los circuitos neuronales que integran estas nuevas neuronas entre hembras y machos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbäck H, Oscarsson J, Eriksson PS. (2000) 'Peripheral infusion of IGF-I adult rat hippocampus' *J Neurosci.* 20(8): 2896-903.
- Adlard P, Perreau V, Engesser-Cesar C, Cotman C. (2004) 'The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise' *Neuroscience Letters.* 363: 43–48.
- Barnes DE, Yaffe K. (2011) 'The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence' *Lancet Neurol.* 10(9): 819–828.
- Baum LW. (2005) 'Sex, hormones, and Alzheimer's disease' *J. Gerontol. A: Biol. Sci. Med. Sci.* 60: 36–743.
- Bednarczyk MR, Aumont A, Décary S, Bergeron R, Fernandes KJ. (2009) 'Prolonged voluntary wheel-running stimulates neural precursors in the hippocampus and forebrain of adult CD1 mice' *Hippocampus.* 19: 913–927.
- Berchtold NC, Kessler JP, Pike CJ, Adlard PA, Cotman CW. (2001) 'Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus' *European Journal of Neuroscience.* 14: 1992–2002.
- Biedermann SV, Fuss J, Steinle J, Auer MK, Dormann C, Falfán-Melgoza C, Ende G, Gass P, Weber-Fahr W. (2016) 'The hippocampus and exercise: histological correlates of MR-detected volume changes' *Brain Struct Funct.* 221(3):1353-63.
- Braak, H., Braak, E. (1998) 'Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease'. *Journal of Neural Transmission*. Supplementum. 53:127-40.
- Braun SM, Jessberger S. (2014) 'Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance' *Development.* 141: 1983-1986.
- Brummelte S, Galea LA. (2010) 'Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats' *Neuroscience.* 168(3): 680-90.
- Cameron HA, Gould E. (1994) 'Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus' *Neuroscience.* 61:203–209.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. (1993) 'Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat' *Neuroscience.* 56 (2): 337-344.
- Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. (2000) 'Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain' *J Neurosci.* 20(8): 2926-33.
- Clark PJ, Kohman RA, Miller DS, Bhattacharya TK, Brzezinska WJ, Rhodes JS. (2011) 'Genetic influences on exercise-induced adult hippocampal neurogenesis across 12 divergent mouse strains' *Genes Brain Behav.* 10(3): 345–353.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L. (2005) 'Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis' *European Journal of Neuroscience.* 21: 1–14.

- Creer D, Romberg C, Saksidab L, van Praag H, and Bussey T. (2010) 'Running enhances spatial pattern separation in mice' *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:2367–2372.
- Dumitru I, Neitz A, Alfonso J, Monyer H. (2017) 'Diazepam Binding Inhibitor Promotes Stem Cell Expansion Controlling Environment-Dependent Neurogenesis' *Neuron*. 94(1): 125-137.e5.
- Duzel E, van Praag H, Sendtner M. (2016) 'Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function?' *Brain*. 139: 662–673.
- Eliakim A, Moromisato M, Moromisato D, Brasel JA, Roberts C Jr, Cooper DM. (1997) 'Increase in muscle IGF-I protein but not IGF-I mRNA after 5 days of endurance training in young rats' *Am J Physiol*. 273(4 Pt 2): R1557-61.
- Encinas J, Vaahtokari A, Enikolopov G. (2006) 'Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain' *The National Academy of Sciences of the USA PNAS*. 103: 8233–8238.
- Erickson KI, Gildengers AG, Butters MA. (2013) 'Physical activity and brain plasticity in late adulthood' *Dialogues Clinical Neuroscience*. 15: 99-108.
- Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Hu L, Morris KS, White SM, Wójcicki TR, McAuley E, Kramer AF. (2009) Aerobic fitness is associated with hippocampal volume in elderly humans. *Hippocampus* 19:1030–1039.
- Fanselow, MS, Dong, HW. (2010) 'Are the dorsal and ventral hippocampus Fanselow, M.S., Dong, H.W., (2010) 'Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?' *Neuron*. 65: 7–19.
- Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR. (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(1): 71-9.
- Franklin K, Paxinos G. (2007) 'The Mouse Brain in stereotaxic coordinates' Third Edition
- Fuss J, Ben Abdallah NM, Vogt MA, Touma C, Pacifici PG, Palme R, Witzemann V, Hellweg R, Gass P. (2010) 'Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis' *Hippocampus*. 20: 364–376.
- Ganguli M, Dodge HH, Shen C, Pandav RS, DeKosky ST. (2005) 'Alzheimer disease and mortality: a 15-year epidemiological study' *Arch Neurol*. 62: 779-784
- Gibson EM, Wang C, Tjho S, Khattar N, Kriegsfeld LJ. (2010) 'Experimental 'jet lag' inhibits adult neurogenesis and produces long-term cognitive deficits in female hamsters' *PLoS One*. 5(12): e15267
- Gratzner HG. (1982) 'Monoclonal Antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine : A New Reagent for Detection of DNA Replication Placental Mononuclear Phagocytes as a Source of Interleukin-1', *Science*. 218: 474–475.
- Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernandez S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martinez M, Hernandez-Avila M. (2012) 'Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012'. Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública (MX).

- Gutiérrez Robledo LM, L. F. M. (2013) 'Envejecimiento y salud: una propuesta para un plan de acción GERIATRIA', Academia Nacional de Medicina, 1.
- Hamson DK, Roes MM, Galea LA. (2016) 'Sex Hormones and Cognition: Neuroendocrine Influences on Memory and Learning' *Compr Physiol.* 6: 1295-1337.
- Holmes M, Galea L, Mistlberger R, Kempermann G. (2004) 'Adult Hippocampal Neurogenesis and Voluntary Running Activity: Circadian and Dose-Dependent Effects' *Journal of Neuroscience Research.* 76: 216–222.
- Hopkins ME, Nitecki R, Bucci DJ. (2011) 'Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels' *Neuroscience.* 194: 84–94.
- Irvine K, Laws KR, Gale TM, Kondel TK, (2012) 'Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta-analysis' *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 34: 989–998.
- Jinno S. (2011) 'Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse hippocampus: a stereology-based study using endogenous markers' *Hippocampus.* 21: 467–480.
- Kobilo T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H. (2011) 'Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment' *Learn Mem.* 18: 605–609.
- 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.
- Lagace D, Fischer S, and Eisch A. (2007) 'Gender and Endogenous Levels of Estradiol Do Not Influence Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice' *Hippocampus.* 17: 175–180.
- Letenneur V, Gilleron D, Commenges C, Helmer JM, Orgogozo JF, Dartigues. (1999) 'Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project' *Neurol Neurosurg Psychiatry.* 66: 177–183.
- Lledo P, Alonso M, Grubb M. (2006) 'Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits' *Nature reviews.* 7: 179-193.
- Mahmoud R., Wainwright S., Galea L., (2016) 'Sex hormones and adult hippocampal neurogenesis: Regulation, implications, and potential mechanisms' *Frontiers in Neuroendocrinology.* 41: 129–152.
- Marlatt MW, Potter MC, Lucassen PJ, van Praag H. (2012) 'Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice' *Dev Neurobiol.* 72(6): 943-52.
- Ming GL, Song H. (2005). 'Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System' *Annu. Rev. Neurosci.* 28 (1): 223–50.
- Ming GL, Song H. (2011) 'Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions' *Neuron.* 70: 687-702.



- Moon HY, Becke A, Berron D, Becker B, Sah N, Benoni G, Janke E, Lubejko ST, Greig NH, Mattison JA, Duzel E, van Praag H. (2016) 'Running-Induced Systemic Cathepsin B Secretion Is Associated with Memory Function' *Cell Metab.* 24: 1–9.
- Moser MB, Moser EI. (1998) 'Functional differentiation in the hippocampus' *Hippocampus.* 8: 608–619.
- Mustroph ML, Chen S, Desai SC, Cay EB, DeYoung EK, Rhodes JS. (2012) 'Aerobic exercise is the critical variable in an enriched environment that increases hippocampal neurogenesis and water maze learning in male C57BL/6J mice' *Neuroscience.* 219: 62–71.
- Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. (1995) 'Exercise and brain neurotrophins' *Nature.* 373(6510): 109.
- O'Keefe J, Nadel L. (1978) 'The Hippocampus as a Cognitive Map '. Oxford University press. Chapter 3. 103-140.
- O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. (2007) 'The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: a comparison of LTP, spatial-and non-spatial learning. *Behav Brain Res.* 176:362–366.
- Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. (2006) 'Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways' *Hippocampus.* 16(3): 250-60.
- Ottenweller JE, Meier AH, Russo AC, Frenzke ME. (1979) 'Circadian rhythms of plasma corticosterone binding activity in the rat and the mouse' *Acta Endocrinol.* 91:150–157.
- Patten AR, Sickmann H, Hryciw BN, Kucharsky T, Parton R, Kernick A, Christie BR. (2013) 'Long-term exercise is needed to enhance synaptic plasticity in the hippocampus' *Learn Mem.* 20: 642–647.
- Piatti V, Davies-Sala M, Espósito MS, Mongiat L, Trincherro M, and Schinder A. (2011) 'The Timing for Neuronal Maturation in the Adult Hippocampus Is Modulated by Local Network Activity' *The Journal of Neuroscience.* 31(21): 7715–7728.
- Piatti VC, Espósito MS, Schinder AF. (2006) 'The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis' *Neuroscientist.* 12(6): 463-8.
- Prince M and Jackson J. (2009) 'World Alzheimer Report 2009' *Alzheimer's Disease International.* 1–96.
- Proyecciones de población 2010 a 2050. México, CONAPO, 2013. <http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones>
- Sah N, Peterson BD, Lubejko ST, Vivar C, van Praag H. (2017) 'Running reorganizes the circuitry of one-week-old adult-born hippocampal neurons' *Sci Rep.* 7(1): 1-15.
- Salthouse T. (2009) 'When does age-related cognitive decline begin?' *Neurobiology of aging.* 30: 507–514
- Scharfman, H., MacLusky, N., (2017) 'Sex Differences in Hippocampal Area CA3 Pyramidal Cells' *Journal of Neuroscience Research.* 95: 563–575.

- Sellers TL, Jaussi AW, Yang HT, Heninger RW, Winder WW. (1988) 'Effect of the exercise-induced increase in glucocorticoids on endurance in the rat' *J Appl Physiol.* 65:173–178.
- Snyder JS, Glover LR, Sanzone KM, Kamhi JF, Cameron HA. (2009) 'The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells' *Hippocampus.* 19(10): 898–906.
- Squire LR, Zola-Morgan S (1991) 'The medial temporal lobe memory system' *Science.* 253: 1380-1386.
- Stranahan AM, Khalil D, Gould E. (2007) 'Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex' *Hippocampus.* 17(11): 1017-22.
- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, and Gage FH. (2006) 'NMDA receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus' *Nature.* 442: 929–933.
- Titterness A, Wiebe E, Kwasnica A, Keyes G, Christie B. (2011) 'Voluntary exercise does not enhance long-term Potentiation in the adolescent female dentate gyrus' *Neuroscience* 183: 25–31.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF. (2008) 'Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells' *Nat Neurosci.* 11(8): 901–907.
- Trejo JL, 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.* 21(5): 1628-34.
- van der Borght K, Kóbor-Nyakas DE, Klauke K, Eggen BJ, Nyakas C, Van der Zee EA, Meerlo P. (2009) 'Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis' *Hippocampus.* 19: 928–936.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, and Gage FH. (1999) 'Running Enhances Neurogenesis, Learning, and Long-Term Potentiation in Mice' *Proc Natl Acad Sci USA.* 96 (23): 13427–31.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, and Gage FH. (2002) 'Functional neurogenesis in the adult hippocampus' *Nature.* 415: 1030–1034.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. (2005) 'Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice' *J Neurosci.* 25(38): 8680–8685.
- van Praag H. (2008) 'Neurogenesis and exercise: past and future directions' *Neuromolecular Med.* 10:128–140.
- Vivar C, Peterson BD, van Praag H. (2016) 'Running rewires the neuronal network of adult-born dentate granule cells' *Neuroimage.* 131: 29–41.
- Vivar C, van Praag H. (2013) 'Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus' *Front Neural Circuits.* 7: 1-13.
- Voss MW, Vivar C, Kramer AF, van Praag H. (2013) 'Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity' *Trends Cogn Sci.* 17(10): 525-44.

- Westenbroek C, Den Boer JA, Veenhuis M, Ter Horst GJ. (2004) 'Chronic stress and social housing differentially affect neurogenesis in male and female rats' *Brain Res Bull.* 64(4): 303-8.
- World Health Organization (2015) 'The Epidemiology and Impact of Dementia: Current State and future trends', First WHO Ministerial Conference on Global Action Against Dementia. 1–4.
- Yagi S, Chow C, Lieblich SE, Galea LA. (2016) 'Sex and strategy use matters for pattern separation, adult neurogenesis, and immediate early gene expression in the hippocampus' *Hippocampus.* 26: 87–101.
- Yau SY, Lau BW, Tong JB, Wong R, Ching YP, Qiu G, Tang SW, Lee TM, So KF. (2011) 'Hippocampal neurogenesis and dendritic plasticity support running-improved spatial learning and depression-like behaviour in stressed rats' *PLoS One.* 6(9): e24263.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. (2008) 'Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis' *Cell.* 132: 645–660.
- Zhao C, Teng M, Summers R, Ming G, Gage F. (2006) 'Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus' *The Journal of Neuroscience.* 26(1): 3–11.