



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**“El ejercicio induce cambios en la conectividad de las  
células de la corteza entorrinal hacia el giro dentado”**

**TESIS**

Que presenta

**BIOL. MARILYN CORRAL ARMENTA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

Directora de tesis:

**DRA. MARIA DEL CARMEN VIVAR ESTUDILLO**

Asesores:

**DR. JOSÉ RODOLFO DELGADO LEZAMA**

**DR. RAFAEL GUTIERREZ AGUILAR**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo económico que me permitió finalizar mis estudios de posgrado.

<b>Resumen</b> .....	1
<b>I.Introducción</b> .....	3
<b>II.Antecedentes</b> .....	6
<b><u>2.1 Estructura de la corteza entorrinal</u></b> .....	7
<b>2.1.1 Organización anatómica de la corteza entorrinal</b> .....	7
<b>2.1.1.1 Capas de la corteza entorrinal y sus poblaciones celulares</b> .....	9
<b>2.1.1.2 Conexiones extrínsecas a la corteza entorrinal</b> .....	10
<b>2.1.1.3 Conexión Corteza Entorrinal-Hipocampo</b> .....	12
<b><u>2.2 Estructura y función de la formación hipocampal</u></b> .....	13
<b>2.2.1 Organización anatómica del hipocampo</b> .....	14
<b>2.2.2 Organización anatómica del giro dentado</b> .....	15
<b><u>2.3 Estrategias para revertir el deterioro cognitivo</u></b> .....	16
<b>2.3.1 El ejercicio como estrategia para frenar el deterioro cognitivo</b> ...	16
<b>2.3.2 Efecto del ejercicio a corto plazo en el hipocampo</b> .....	17
<b>2.3.3 Efecto del ejercicio a largo plazo en la corteza entorrinal</b> .....	18
<b>III.Justificación</b> .....	19
<b>IV.Hipótesis</b> .....	20
<b>V.Objetivos</b> .....	20
<b>VI.Materiales y métodos</b> .....	21
<b>VII.Resultados</b> .....	26
<b>7.1 Los ratones se mantienen corriendo por periodos largo de tiempo</b> .....	26
<b>7.2 Dos meses de ejercicio no modifican los parámetros morfométricos corporales y cerebrales</b> .....	27
<b>7.3. Dos meses de ejercicio no mantiene elevado el número total de células BrdU<sup>+</sup></b> .....	29
<b>7.3.1 El ejercicio a largo plazo no modifica la distribución de células BrdU<sup>+</sup> a través del eje dorso-ventral</b> .....	31
<b>7.4 Dos meses de ejercicio no modifican la densidad de partículas PSD-95 en la capa molecular del giro dentado</b> .....	33
<b>7.4.1 Dos meses de ejercicio no modifican el número de partículas de PSD-95 en la capa molecular del giro dentado a través del eje dorso-ventral</b> .....	35
<b>7.5 Dos meses de ejercicio modifican la expresión de la proteína PSD-95 en la corteza entorrinal lateral</b> .....	37

	<b>Pág</b>
<b>7.6 La distribución del tamaño de partículas PSD-95 es distinta en el giro dentado ventral después de 2 meses de ejercicio</b> .....	40
<b>7.7 Dos meses de ejercicio modifican el tamaño de las partículas de PSD-95 en la corteza entorrinal lateral</b> .....	43
<b>7.8 Estandarización de las técnicas para el trazado selectivo de las neuronas de la corteza entorrinal</b> .....	44
<b>VIII.Discusión</b> .....	49
<b>IX.Conclusiones</b> .....	56
<b>X.Perspectivas</b> .....	57
<b>XI.Bibliografía</b> .....	58

## RESUMEN

El ejercicio tiene un efecto positivo en las funciones cognitivas, esto atribuido principalmente a un incremento en la neurogénesis en el giro dentado (GD) del hipocampo. Sin embargo, resultados en nuestro laboratorio muestran que 6 meses de ejercicio no inducen un incremento sostenido de la neurogénesis. Estudios en humanos y modelos animales muestran que mientras mayor sea el periodo de ejercicio, mayor será el beneficio cognitivo. Por tanto, es probable que otros mecanismos, adicionales a la neurogénesis del GD, como cambios en la plasticidad sináptica y conectividad neuronal estén involucrados en la mejora de los procesos cognitivos. De hecho, se ha mostrado que periodos mayores a 2 meses de ejercicio inducen cambios plásticos en otras áreas del cerebro como la corteza entorrinal (EC), la cual envía información multisensorial proveniente de distintas áreas corticales hacia el GD. Así que, para evaluar el efecto de dos meses de ejercicio en la neurogénesis hipocámpal y la conectividad de la EC hacia el GD utilizamos ratones macho C57Bl6J mantenidos en condiciones control o de ejercicio voluntario. Los ratones de ambos grupos experimentales fueron inyectados con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) para evaluar los niveles de neurogénesis. Para evaluar los cambios de conectividad de la EC, se evaluaron los cambios en la expresión de la proteína PSD-95 (un marcador de cambios en la conectividad) en el GD y la EC. Los resultados mostraron que 2 meses de ejercicio no mantiene elevados los niveles de neurogénesis en el GD. Además, mostramos que el ejercicio modifica la expresión de PSD-95 en la EC pero no en el GD. Finalmente establecimos técnicas que permiten el trazado anterógrado y retrógrado de células de la EC para determinar cambios en conectividad. En conjunto, nuestros resultados muestran que el ejercicio induce un incremento transitorio de la neurogénesis y que procesos de plasticidad adicionales como cambios en la expresión de la proteína PSD-95 pudieran llevarse a cabo durante periodos largos de ejercicio para favorecer el mantenimiento de las habilidades cognitivas.

## ABSTRACT

Exercise has a positive effect on cognitive functions, mainly due to an increase in neurogenesis in the dentate gyrus (GD) of the hippocampus. However, results in our laboratory show that six months of exercise do not induce a sustained increase in neurogenesis. Studies in humans and animal models show that the longer the period of exercise, the greater the cognitive benefit. Therefore, it is likely that other mechanisms, in addition to hippocampal neurogenesis, such as changes in synaptic plasticity and neuronal connectivity are involved in the improvement of cognitive processes. Indeed, it has been shown that periods greater than 2 months of exercise induce plastic changes in other brain areas, such as the entorhinal cortex (EC), which sends multisensory information from different cortical areas to the DG. Thus, to assess the effects of two months of exercise on hippocampal neurogenesis and the connectivity of EC to the GD, we used male C57Bl6J mice housed under control or voluntary exercise conditions. Mice from both experimental groups were injected with 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) to assess the levels of neurogenesis. To evaluate the changes in EC connectivity, we evaluate the changes in the expression of PSD-95 protein (a marker of changes in connectivity) in the GD and EC. The results showed that two months of exercise does not maintain elevated the levels of neurogenesis in the GD. In addition, we show that exercise modifies the expression of PSD-95 in the EC but not in the DG. Finally, we established techniques that allow the anterograde and retrograde tracing of EC cells to determine the modifications in connectivity induced by exercise. Altogether, our results show that exercise induces a transient increase in neurogenesis and that additional plastic processes, such as changes in the expression of PSD-95 protein, could take place during long periods of exercise to favor the maintenance of cognitive abilities.

## I. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento se asocia con una disminución en las funciones cognitivas que finalmente conllevan a perjudicar la calidad de vida de las personas (Barnes, 2015). La demencia y el deterioro cognitivo inducidos por el envejecimiento conllevan a la pérdida gradual de distintas habilidades cognitivas como el razonamiento conceptual, la velocidad de procesamiento y la memoria (Harada et al. 2013). Específicamente, la memoria declarativa espacial es una de los principales tipos de memoria que decaen con la edad, la cual está relacionada con el recuerdo de historias y eventos específicos (Harada et al. 2013).

Con el envejecimiento se observan cambios estructurales a nivel del sistema nervioso central en áreas como el hipocampo y la corteza entorrinal, áreas involucradas en la regulación de distintos procesos de memoria como la memoria declarativa espacial (Toledo-Morell et al. 2000; Huijbers et al. 2014). Específicamente, se ha observado que estas dos estructuras disminuyen su volumen gradualmente durante el envejecimiento, lo que podría estar relacionado con el deterioro normal de los procesos cognitivos (Harada et al. 2013; Toledo-Morell et al. 2000; Huijbers et al. 2014). Estudios en humanos han mostrado que la corteza entorrinal disminuye su volumen de manera temprana (antes de presentar los síntomas) en individuos que padecen enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson o incluso en individuos con un deterioro cognitivo medio, en comparación con aquellos que tienen un deterioro cognitivo normal (Du et al. 2001). Estas modificaciones no solo se han observado en enfermedades neurodegenerativas sino también en trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia (Harada et al. 2013; Du et al. 2001; Goldman et al. 2012; Baiano et al. 2008). Por lo anterior se ha sugerido que, la disminución del volumen de la corteza entorrinal podría ser utilizada como un diagnóstico temprano de

enfermedades neurodegenerativas, siendo un indicador anatómico de riesgo para desarrollar estas enfermedades (Du et al. 2001; Toledo-Morell et al. 2000).

El ejercicio es una actividad benéfica que ayuda al organismo a detener o retardar el deterioro cognitivo inducido por el envejecimiento. Se sabe, que el ejercicio previene el riesgo de desarrollar enfermedades de tipo cardiovascular (las cuales son factores de riesgo para desarrollar Alzheimer) por medio de un incremento en los niveles sanguíneos cerebrales (Barnes & Yaffe 2011; Hiura et al. 2014). A nivel cognitivo se ha mostrado que el ejercicio ayuda a disminuir las probabilidades de desarrollar un impedimento cognitivo medio o demencia, y ayuda a retardar o detener el deterioro cognitivo inducido por enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Barnes 2015; Laurin et al. 2001).

Estudios tanto en humanos como en modelos animales han mostrado que el ejercicio incrementa el volumen del hipocampo y la corteza entorrinal (Erickson et al 2010; Pereira et al. 2007). La mayoría de las modificaciones inducidas por el ejercicio se observan en el giro dentado del hipocampo, donde se observada un incremento de la densidad de espinas dendríticas, la plasticidad sináptica y los niveles de factores neurotróficos (Pereira et al. 2007; Voss et al. 2013). El giro dentado es una de las dos áreas del cerebro donde se generan nuevas neuronas de manera continua durante toda la vida (Andersen et al. 2007; Dhikav & Anand 2012). Este proceso llamado neurogénesis del cerebro adulto se ve incrementado con el ejercicio. El incremento en el número de nuevas neuronas en el giro dentado correlaciona con una mejora cognitiva (Gage & Van Praag 2002). En modelos animales, periodos cortos de ejercicio (1 semana – 1 mes) inducen modificaciones principalmente en el giro dentado del hipocampo. Sin embargo, periodos mayores a 2 meses de ejercicio inducen modificaciones más allá del giro dentado, como la corteza entorrinal y el área CA1 del hipocampo donde se observa un aumento en la densidad dendrítica de las neuronas de estas áreas



(Stranahan et al. 2007). Es probable que estos cambios morfológicos, promuevan cambios en la conectividad de otras áreas corticales que forman parte del circuito hipocampal (Stranahann et al. 2007).

Por lo anterior, en el presente estudio se propuso estudiar el efecto del ejercicio a largo plazo en la corteza entorrinal, una estructura cortical implicada en la regulación de procesos cognitivos que tiene una fuerte conexión con el hipocampo (Witter et al. 2017). Los resultados de este estudio nos permitirán determinar los mecanismos por los que el ejercicio induce sus efectos benéficos en los procesos cognitivos y nos permitirá proponer estrategias que en un futuro puedan prevenir o detener el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas inducidas por el envejecimiento.

## II. ANTECEDENTES

Los cambios cognitivos asociados con la edad pueden afectar el funcionamiento cotidiano de un adulto mayor. Dentro de éstos, el razonamiento conceptual, la memoria y la velocidad de procesamiento, disminuyen gradualmente con el tiempo (Harada et al. 2013). Estructuras como el hipocampo y la corteza entorrinal, que se encargan de la regulación de la memoria episódica y procesamiento cognitivo, son vulnerables tanto en el envejecimiento normal como en procesos neurodegenerativos (Huijbers et al. 2014). En particular, se ha determinado que la corteza entorrinal, que sirve como un centro de retransmisión entre el hipocampo y distintas áreas de asociación, sufre una disminución temprana (antes de que se presenten los síntomas) del volumen en la enfermedad de Alzheimer (Harada et al. 2013; Du et al., 2001; Toledo-Morell et al. 2000).

Un estudio realizado por medio de imágenes de resonancia magnética (MRI) en grupos de sujetos control (sin demencia), pacientes con un deterioro cognitivo medio que presentaban Alzheimer y un tercer grupo de pacientes con problemas cognitivos sin demencia, mostró que el volumen de la corteza entorrinal se veía disminuida en pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes con problemas cognitivos, comparados con sujetos control, lo que sugirió que la corteza entorrinal se ve afectada aun antes de presentarse los síntomas de la enfermedad (Toledo-Morell et al. 2000). Adicionalmente, en este mismo estudio utilizando los volúmenes del hipocampo y corteza entorrinal como predictores, se determinó que por cada 10 unidades de disminución en el volumen de corteza entorrinal la probabilidad de desarrollar la enfermedad de Alzheimer aumenta en un 7% (Toledo-Morell et al. 2000). La corteza entorrinal también se ve afectada por otros trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson. Estudios han

mostrado que, el volumen de la corteza entorrinal del hemisferio izquierdo disminuye significativamente en pacientes que presentan esta enfermedad. Además, al comparar pacientes con Parkinson con aquellos que adicionalmente presentaban demencia observaron que el volumen de la corteza entorrinal en el hemisferio izquierdo disminuía comparado con sujetos normales (Goldman et al. 2012).

En conjunto, todos estos datos sugieren que la corteza entorrinal juega un papel relevante en la regulación de los procesos cognitivos y que podría tener un papel importante en el deterioro cognitivo temprano, aun antes de presentarse enfermedades neurodegenerativas (Toledo-Morell et al. 2000).

## 2.1 Estructura de la corteza entorrinal

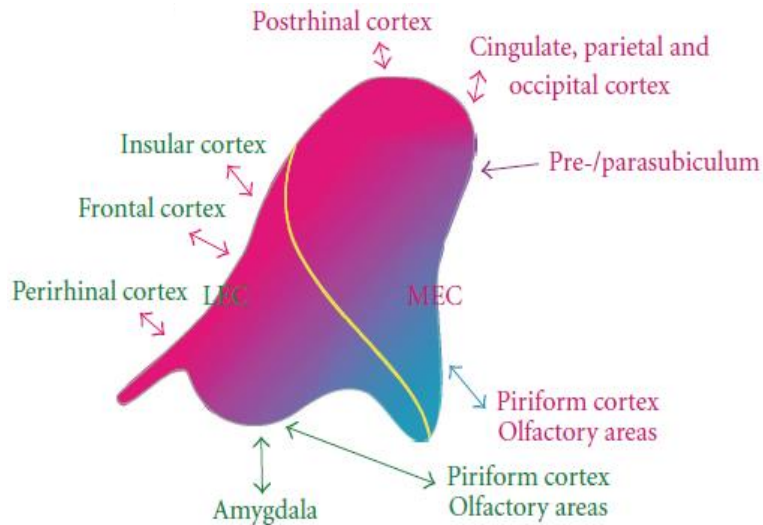
La corteza entorrinal está ubicada en el área 28 de Brodman y se encuentra rodeada por el surco rinal (olfativo), de ahí que recibe ese nombre. Ramón y Cajal en 1902 describió una parte de la corteza temporal-posterior que estaba fuertemente conectada al hipocampo a través de la vía temporo-ammonica; de esta observación, Cajal sugirió que ésta estructura (corteza entorrinal) debía tener una relevancia funcional con el hipocampo. Hoy se sabe que la corteza entorrinal es la principal estructura de entrada y de salida de información de la formación hipocampal y es considerada como el punto nodal en los circuitos cortico-hipocampales (Witter et al. 2017).

### 2.1.1 Organización anatómica de la corteza entorrinal

La corteza entorrinal comprende diferentes subdivisiones y capas, caracterizadas por la conectividad con conjuntos funcionalmente distintos de áreas corticales y subcorticales en el cerebro. La corteza entorrinal tiene dos subdivisiones principales, la corteza entorrinal lateral y la corteza entorrinal

medial. Registros electrofisiológicos de éstas dos áreas en roedores muestran que las células en la corteza entorrinal medial son espacialmente moduladas predominantemente. Por el contrario, en la corteza entorrinal lateral dicha modulación está ausente, presentando un disparo neuronal que se relaciona con los objetos en contexto (Fyhn et al. 2004).

Estas dos áreas se dividen en base a múltiples criterios, uno de los principales con base en la distribución diferencial de sus proyecciones que presentan (Witter et al. 2017). La corteza entorrinal medial establece conexión con áreas como las cortezas parietal y occipital y el área parahipocampal posterior, permitiendo la representación de señales de movimientos percibidos o planeados. Por el contrario, la corteza entorrinal lateral establece conexión con el área parahipocampal anterior, dominios sensoriales y cortezas como la insular y perirrinal, proporcionando acceso a la información sobre el medio externo (Witter et al. 2017) (Figura 1).



**Figura 1. Conectividad de la corteza entorrinal.** Conectividad que establecen distintas áreas corticales con las dos divisiones de la corteza entorrinal. En verde tenemos las áreas corticales que conectan con la corteza entorrinal lateral (LEC) y en rosa las áreas corticales que conectan con la corteza entorrinal medial (MEC). Las flechas con doble punta nos indican una comunicación bidireccional entre las distintas áreas corticales y la corteza entorrinal lateral y medial (Tomada del Canto et al. 2008).

#### 2.1.1.1 Capas de la corteza entorrinal y sus poblaciones celulares

De acuerdo al esquema propuesto por Ramón y Cajal en 1911 (con ligeras modificaciones) la corteza entorrinal se divide en 6 capas, 4 capas celulares (II, III, V y VI) y 2 capas plexiformes (I y IV) (Witter & Amaral 2004).

La capa I se encuentra generalmente desprovista de células y rica en fibras orientadas transversalmente, aunque aquí podemos encontrar neuronas del tipo multipolar que constituyen la mayoría de las células aquí presentes.

En la capa II se encuentran localizadas las células piramidales y estrelladas de tamaño medio a largo. Las células estrelladas se caracterizan por tener un árbol dendrítico que contiene múltiples dendritas primarias, éstas son más comunes en la corteza entorrinal medial que en la lateral, donde se presenta otro tipo de células conocidas como fan cells. Del grupo de interneuronas, en la capa II podemos encontrar neuronas multipolares, bipolares, de canasta y células candelabro.

La capa III contiene múltiples tipos celulares de distintos tamaños y formas; las células piramidales son el tipo celular predominante de esta capa. Las células piramidales que encontramos aquí se diferencian morfológicamente en la corteza entorrinal lateral y medial; en la corteza entorrinal medial encontramos 2 grupos de células piramidales: espinosas y no espinosas mientras que en la corteza entorrinal lateral encontramos predominantemente, células piramidales no espinosas y muy pocas células piramidales espinosas. La capa III también contiene células estrelladas agrupadas principalmente en la región superior de esta capa. Además encontramos dentro del grupo de las interneuronas, a las células multipolares, interneuronas de tipo piramidal y neuronas bipolares.

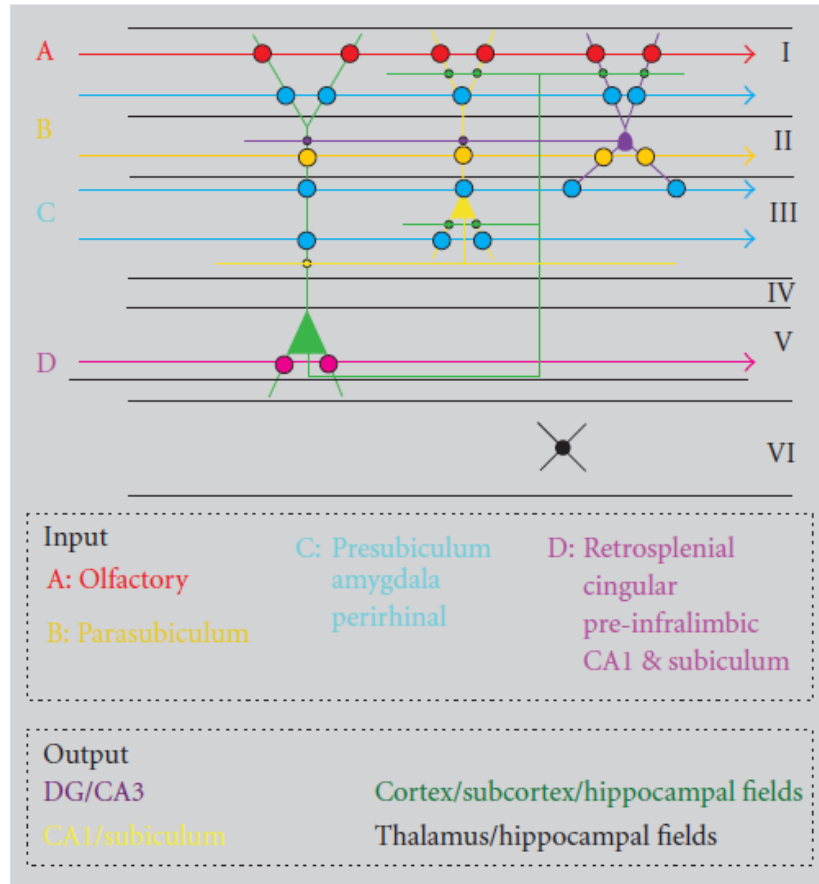
En la capa IV (también llamada lamina dissecans) se encuentran algunas células piramidales en los bordes con las capas III y V y algunas interneuronas como las células bipolares. La capa V se divide en Va (superior) y Vb (inferior) y no hay diferencias entre las neuronas localizadas en la corteza entorrinal lateral y medial. Dentro de Va se encuentran múltiples células piramidales de tamaño grande, mientras que en Vb encontramos algunas células piramidales de tamaño pequeño. Un segundo tipo celular encontrado en la capa V son las células horizontales con un soma poligonal, estas neuronas poseen pocas espinas dendríticas. Otro tipo celular encontrado aquí son las neuronas multipolares, así como también neuronas bipolares. Finalmente, la capa VI contiene una población heterogénea en cuanto a tipos celulares dentro de los que encontramos a las neuronas multipolares y células piramidales (solo en corteza entorrinal medial) (Witter & Amaral 2004; Canto et al. 2008).

#### 2.1.1.2 Conexiones extrínsecas a la corteza entorrinal

Múltiples estudios han demostrado que las cortezas perirrinal y parahipocámpica (post-rinal en organismos no primates) forman el principal

enlace cortical de la corteza entorrinal. Por otro lado, el pre y parasubiculo y estructuras olfativas proporcionan también entradas importantes hacia la corteza entorrinal y, en el caso de las áreas olfatorias, éstas reciben una conexión fuerte equivalente de la corteza entorrinal (Canto et al. 2008).

Dentro de las capas de la corteza entorrinal, la que establece una mayor conexión con las distintas áreas corticales es la capa V a través de las células piramidales. Este grupo de células reciben información procesada de los otros campos del hipocampo y también dan lugar a proyecciones de regreso a ciertas regiones corticales (Witter & Amaral 2004). Con excepción de la conexión entre corteza entorrinal- áreas olfatorias y corteza entorrinal-corteza infralímbica, donde las proyecciones de la corteza entorrinal parecen originarse en las capas II y III. Las neuronas de las capas II y III, son la fuente principal de proyección hacia el giro dentado, el hipocampo y el subículo (Canto et al. 2008; Witter & Amaral 2004). Dentro de las áreas sub-corticales, la amígdala conecta con gran parte de la corteza entorrinal y su entrada termina principalmente en la capa III de la corteza entorrinal y al igual que en la mayoría de sus proyecciones, la corteza entorrinal se conecta con la amígdala a través de la capa V (Canto et al. 2008). Las entradas de información cortical provienen principalmente de la entrada piriforme, aunque las entradas se producen también de las áreas frontal, cingular, retroesplenial, insular, parietal e incluso visual con las cuales la corteza entorrinal establece una conexión bidireccional (Canto et al. 2008; Witter & Amaral 2004). Por otro lado, del hipocampo provienen proyecciones de CA1 principalmente que llegan hacia la capa V de la corteza entorrinal (Witter et al. 2017) (Figura 1 y 2).



**Figura 2. Principales entradas y salidas de la corteza entorrinal.** En el diagrama se muestran las 6 capas en las que se divide la corteza entorrinal, así como los principales tipos celulares presentes en cada capa y las entradas y salidas de la corteza entorrinal en las distintas capas (Tomada de Canto et al. 2008).

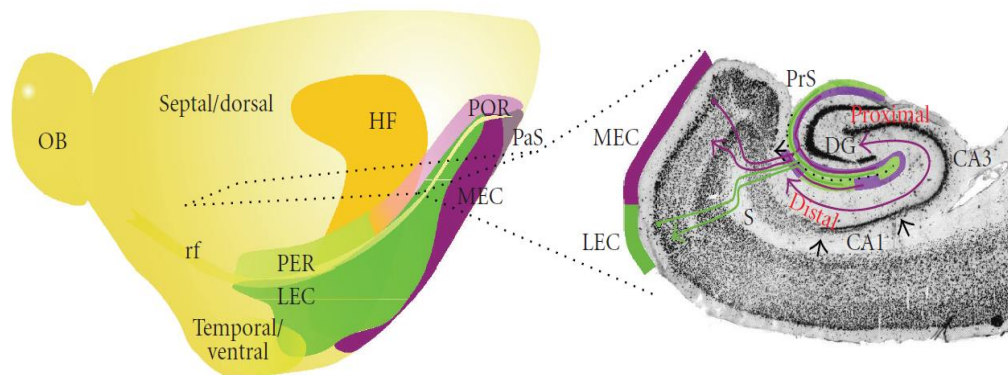
### 2.1.1.3 Conexión Corteza Entorrinal-Hipocampo

El giro dentado en el área dorsal recibe su entrada principal de la corteza entorrinal a través de la llamada vía perforante. La proyección hacia el giro dentado surge principalmente de las células piramidales ubicadas en la capa II de la corteza entorrinal, aunque un componente menor de la proyección también proviene de las capas V y VI. En la capa molecular del giro dentado, las terminaciones de la corteza entorrinal están estrictamente confinados a los dos tercios más superficiales. Las fibras de la vía perforante que se originan en la corteza entorrinal lateral terminan en el tercio más superficial de la capa molecular (capa molecular externa), mientras que las fibras de la vía perforante



que se originan en la corteza entorrinal medial terminan en el tercio medio de la capa molecular (capa molecular media; Figura 3).

Adicionalmente, las proyecciones de la corteza entorrinal también proyectan al hipocampo *per se* (CA1-CA3) a través del *stratum lacunosum-moleculare*, y al igual que la proyección hacia la capa molecular del giro dentado, hay una segregación de estas proyecciones. Las proyecciones de la corteza entorrinal lateral terminan en la región superficial del *stratum lacunosum-moleculare*, mientras que las proyecciones de la corteza entorrinal medial terminan en la región profunda de esta capa (Andersen et al. 2007; Witter & Amaral 2004; Figura 3).



**Figura 3. Diagrama de conectividad corteza entorrinal-hipocampo.** En púrpura se muestran las conexiones que establece la corteza entorrinal medial con el hipocampo, mientras que en verde se muestran las conexiones que establece la corteza entorrinal lateral con el hipocampo (Tomada de Canto et al. 2008).

## 2.2 Estructura y función de la formación hipocampal

La formación hipocampal se conforma de: el hipocampo, el giro dentado, el subículo, el presubículo, el parasubículo y la corteza entorrinal. Funcionalmente, el hipocampo juega un papel importante en el aprendizaje, la memoria y la navegación espacial (Dhikav & Anand 2012). Dividido anatómicamente y funcionalmente en el área dorsal (posterior) se encarga principalmente de regulación de memoria y aprendizaje y el área ventral (anterior) que regula principalmente procesos relacionados a la ansiedad (Moser y Moser 1998; Strange et al. 2014).

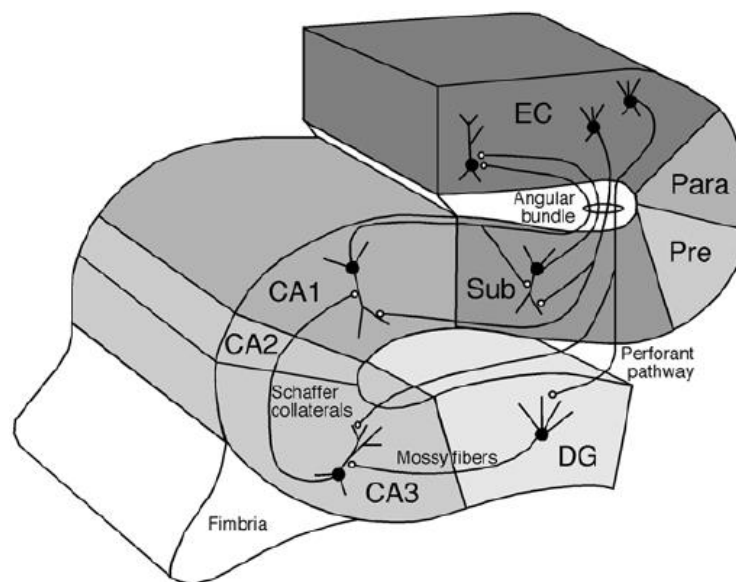
### 2.2.1 Organización anatómica del hipocampo

El hipocampo, tiene tres subdivisiones: denominadas CA3, CA2 y CA1 y hasta CA4 en humanos (CA proviene de *Cornu ammonis*) y el giro dentado (Dhikav & Anand 2012). Dentro del hipocampo, la capa celular principal es denominada capa celular piramidal, aquí podemos encontrar células piramidales, siendo el grupo celular predominante en estas regiones. En las áreas CA3 y CA2, las células piramidales tienen un mayor tamaño en comparación con las que se encuentran en el área CA1 (Dhikav and Anand 2012). La capa siguiente en profundidad es el *stratum oriens*, esta capa contiene las dendritas basales de las células piramidales y múltiples interneuronas. A mayor profundidad encontramos la región alveus. En la región CA3 encontramos además una región acelular denominada *stratum lucidum* sobre la capa piramidal, la cual está ocupada por las fibras musgosas. El *stratum radiatum* en las áreas CA1-CA2 se localiza sobre la capa piramidal y en el área CA3 se localiza por arriba del *stratum lucidum*. En el *stratum radiatum* se encuentran las colaterales de Schaffer (conexión CA3-CA1) y las conexiones asociativas (CA3-CA3). La capa más superficial del hipocampo se llama *stratum lacunosum-moleculare* y es en esta capa donde terminan las proyecciones provenientes de la corteza entorrinal (Andersen et al. 2007; Dhikav & Anand 2012; Witter & Amaral 2004; Figura 4).

Además de las células piramidales, el hipocampo también posee un grupo de interneuronas bastante diverso que se encuentran dispersas a través de todas las capas del hipocampo como células en canasta células axo-axónicas, células trilaminares horizontales y células O-ML (Andersen et al. 2007).

### 2.2.2 Organización anatómica del giro dentado

El giro dentado está compuesto por 3 capas: capa molecular, que es la capa más superficial, la capa celular principal que contiene células granulares y la capa celular polimórfica o también conocida como hilus. El principal tipo de células que encontramos en el giro dentado son las células granulares, las cuales envían sus dendritas hacia la porción superficial de la capa molecular donde también encontraremos axones de células en canasta, células polimórficas y axones terminales provenientes de la corteza entorrinal (Figura 4). En el hilus (capa polimórfica) se localizan las células musgosas, las cuales envían sus axones hacia el giro dentado de lado ipsi y contralateral. Adicionalmente, en el giro dentado también se encuentran múltiples tipos de interneuronas como las células en canasta, células MOPP, células HICAP entre otras (Andersen et al. 2007; Dhikav & Anand 2012).



**Figura 4. La formación hipocampal.** Las neuronas en la capa II de la EC proyectan hacia el giro dentado y la región CA3 del hipocampo a través de la vía perforante. Además, las neuronas en la capa III de la EC proyectan hacia la región CA1 y el subículo por la vía perforante. Las células granulares del giro dentado proyectan a la región CA3 a través de proyecciones de fibras musgosas. Las neuronas piramidales de la región CA3 proyectan a CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Las células piramidales de CA1 proyectan hacia el subículo. Tanto CA1 como el subículo proyectan hacia las capas profundas de la corteza entorrinal (IV y V) (Tomada de Andersen et al. 2007).

## 2.3 Estrategias para revertir el deterioro cognitivo

El envejecimiento se asocia con una disminución de distintas habilidades cognitivas que afectan la calidad de vida de las personas, una de las funciones cognitivas que se pierden con el tiempo es la memoria espacial (Barnes, 2015). Áreas como el hipocampo y la corteza entorrinal involucradas en la regulación de distintos procesos de memoria disminuyen su volumen en el envejecimiento aumentando el riesgo de desarrollar distintas enfermedades neurodegenerativas (Huijbers et al. 2014). Hasta el momento no existe un fármaco que pueda detener el deterioro cognitivo, por lo cual se han propuesto múltiples estrategias para detener o retrasar este deterioro y evitar así el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas. Dentro de estas estrategias encontramos al ejercicio físico, el cual ha mostrado efectos benéficos a nivel cognitivo en humanos y modelos animales (Erickson et al. 2010; Creer et al. 2010).

### 2.3.1 El ejercicio como estrategia para frenar el deterioro cognitivo

Investigaciones realizadas en humanos y modelos animales indican que el ejercicio beneficia la función cerebral durante toda la vida y protege al cerebro de los efectos adversos de la edad (Vivar et al. 2012). El ejercicio regular es una intervención que se asocia con una mejor función cognitiva, aunque se desconoce la fisiología que subyace a su efecto benéfico. La hipótesis propuesta es que la mejora en las funciones cognitivas ocurre a través de adaptaciones en la fisiología vascular y el acoplamiento neurovascular (Barnes, 2015).

Adicionalmente, el ejercicio ha demostrado tener efectos importantes sobre el sistema nervioso, incrementando los niveles de factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (en inglés, BDNF) implicado en la supervivencia y función neuronal. En 1995, Neeper y colaboradores

demonstraron por primera vez que el ejercicio tenía un efecto a nivel cerebral en un modelo animal. Específicamente, mostraron que el ejercicio aumenta la expresión de BDNF en regiones cerebrales como el hipocampo y la corteza entorrinal después de 7 días de ejercicio voluntario (Neeper et al. 1995). Recientemente, se mostró utilizando un marcador retrógrado viral, que 1 mes de ejercicio voluntario modifica la conectividad de la corteza entorrinal hacia las nuevas neuronas del hipocampo (Vivar et al. 2016). Aunado a estas evidencias, estudios en humanos han mostrado que el ejercicio tiene un efecto directo sobre el hipocampo, revirtiendo la pérdida de volumen en la adultez, lo que se acompaña con una mejora cognitiva (Erickson et al. en 2011).

### 2.3.2 Efecto del ejercicio a corto plazo en el hipocampo

Dentro del hipocampo, el ejercicio ejerce su mayor efecto en el giro dentado (Vivar et al. 2016). En 1965, Joseph Altman mostró que el cerebro adulto podía generar nuevas neuronas granulares en el giro dentado del hipocampo de ratas adultas (Altman & Das 1965). Este proceso es denominado neurogénesis del cerebro adulto. La neurogénesis del cerebro adulto es un proceso regulado por múltiples estímulos externos como el estrés y la actividad física (Ming & Song 2011).

Específicamente, el ejercicio a corto plazo (1 semana a 1 mes) es un regulador positivo de la neurogénesis que aumenta la neurogénesis neta, el cual impacta la etapa de proliferación y maduración celular (Gage & van Praag 2002). Este incremento en la neurogénesis correlaciona con una mejora en las funciones cognitivas (Voss et al. 2013). Además, se ha observado que la angiogénesis y la neurogénesis son reguladas cooperativamente, resultando en la formación de nuevos vasos sanguíneos que sirven de soporte a las nuevas neuronas generadas (Palmer et al. 2000). Adicional a los cambios en neurogénesis, el ejercicio induce en el giro dentado un aumento en la densidad

de espinas dendríticas, facilitación de la plasticidad sináptica y un aumento de los niveles de factores neurotróficos.

### 2.3.3 Efecto del ejercicio a largo plazo en la corteza entorrinal

De manera interesante, un estudio reciente en adultos de alrededor de 65 años mostró que realizar actividad física (9-14 km de caminata por semana) durante 9 años favorece el mantenimiento del volumen de áreas cerebrales como la corteza entorrinal y el hipocampo en comparación con personas que realizaban una actividad física menor o no realizaban actividad física. Estos resultados sugieren que existe una relación entre la actividad física durante periodos largos de tiempo y el beneficio en el mantenimiento del volumen de éstas áreas (hipocampo y corteza entorrinal), en una etapa de la vida donde el deterioro de estas estructuras se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas (Erickson et al. 2010).

Actualmente está ya establecido que la actividad física mejora la función del hipocampo, pero los efectos del ejercicio a largo plazo sobre estructuras neuronales fuera del giro dentado permanecen relativamente inexplorados. En 2007, Stranahan y colaboradores demostraron que 2 meses de ejercicio incrementan la densidad de las espinas dendríticas, así como un aumento en la arborización y longitud dendrítica de las neuronas piramidales de la capa III de la corteza entorrinal y del área CA1 del hipocampo de ratas adultas (Stranahan et al. 2007). Esto sugiere que un periodo largo de ejercicio voluntario puede tener efectos en áreas más allá del giro dentado, como la corteza entorrinal y el área CA1, modificando la morfología de las células de estas áreas, teniendo quizás un impacto en cómo éstas células integran la información recibida.

### III. JUSTIFICACIÓN

Las modificaciones inducidas por el ejercicio en el hipocampo y otras estructuras han sido mayormente evaluadas en periodos cortos de tiempo (1 mes) (Vivar et al. 2016; Gage & Van Praag 2002; Voss et al. 2013). Se ha sugerido que el principal mediador del efecto benéfico del ejercicio es el incremento en la neurogénesis del giro dentado. Sin embargo, estudios en nuestro laboratorio muestran que 6 meses de ejercicio no mantienen elevados los niveles de neurogénesis. Estudios en humanos han mostrado que mientras mayor sea el periodo de ejercicio, mayor será el beneficio cognitivo. Por lo tanto, es posible que otros mecanismos, adicionales al incremento de la neurogénesis, sean los involucrados en el mantenimiento de la mejora cognitiva. Es por ello que en el presente estudio nos propusimos determinar el nivel de neurogénesis después de 2 meses de ejercicio, así como determinar los cambios en la conectividad entre la corteza entorrinal y el giro dentado a través de cambios en la expresión de la proteína de la densidad post-sináptica 95 (PSD-95).

#### **IV. Hipótesis:**

Dos meses de ejercicio no mantiene elevados los niveles de neurogénesis y producen cambios en la conectividad de la corteza entorrinal hacia el giro dentado.

#### **V. Objetivo general:**

Determinar el efecto de 2 meses de ejercicio en la neurogénesis hipocampal así como los cambios en la conectividad de la corteza entorrinal hacia el giro dentado.

#### **V.I Objetivos específicos:**

1. Determinar el efecto de 2 meses de ejercicio en la neurogénesis hipocampal.
- 2.- Determinar los cambios en la conectividad de la corteza entorrinal hacia el giro dentado a través de la expresión de la proteína PSD-95.
- 3.- Establecer técnicas para el marcaje selectivo de células de la corteza entorrinal para determinar los cambios en la conectividad hacia el giro dentado.



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL6 de 4 a 6 semanas de edad, los cuales fueron divididos al azar en dos grupos, grupo en condición control (n = 13) y de ejercicio (n = 13). Los ratones fueron alojados individualmente en cajas SuperMouse con agua y alimento *ad libitum*. Las cajas de los animales del grupo de ejercicio contenían adicionalmente una rueda para correr acoplada a un odómetro que permitió la cuantificación de la distancia y la velocidad a la que los ratones corren. Los animales se mantuvieron en sus respectivas condiciones 2 o 3 meses dependiendo del experimento.

### 6.2 Perfusión

Los animales fueron anestesiados por inhalación de Isoflurano (Fluriso, VET one) y posteriormente perfundidos trans-cardiacamente con solución salina y PFA 4% a 4°C. Los cerebros fueron removidos y post-fijados en PFA al 4% durante 24h y posteriormente crioprottegidos en una solución de sacarosa 30%.

Se realizaron cortes horizontales de 40  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando un micrótopo de deslizamiento (Leica SM2010R). Las rebanadas de cerebro de los ratones inyectados con BrdU fueron colocadas en placas multipozos que contenían TCS y almacenadas a -20°C para su posterior análisis. Las rebanadas de cerebro de los experimentos restantes fueron almacenadas en cajas multipozos que contenían TBS 1X y almacenadas a 4°C hasta su análisis.

## 6.3 Protocolo de BrdU

### 6.3.1 Inyección de BrdU

Posterior a 2 meses en sus respectivas condiciones control o de ejercicio, los ratones (control, n = 5; ejercicio, n = 5) recibieron una inyección de BrdU (50 mg/Kg; intraperitonealmente) durante 5 días. Los animales fueron perfundidos un mes después para permitir que las células marcadas con BrdU alcanzaran su estadio de maduración, sumando así 3 meses de experimentación.

#### 6.3.1.1 Procesamiento para la detección de la marca de BrdU

Para determinar el número de nuevas neuronas que incorporaron el BrdU (células BrdU<sup>+</sup>), se realizó una inmuno-histoquímica para revelar la marca de BrdU. Se seleccionaron cortes de una serie de 1:6 cortes equidistantes con una separación de 240 µm entre cada corte. Se utilizó como anticuerpo primario rata anti-BrdU (1:200; AbD Serotec) y como anticuerpo secundario burro anti-rata biotinilado (1:250; Jackson Immunoresearch), usando el método de peroxidasa (sistema ABC, Vector Laboratories) y 3,3-Diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich) como cromógeno. De las muestras obtenidas se adquirieron fotomicrografías digitales en campo claro del hemisferio completo (4X) y del giro dentado (10X). De las fotomicrografías obtenidas se realizó manualmente la reconstrucción del hemisferio completo y el giro dentado, empalmando las fotomicrografías utilizando el software CorelDraw. El análisis dorso-ventral se realizó pareando las imágenes reconstruidas con el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos (2007). Para la cuantificación de las células BrdU<sup>+</sup> a través del eje dorso-ventral la región dorsal, medial y ventral del hipocampo fueron delimitadas como sigue respecto a Bregma (mm): región dorsal de -1.24 a -2.16, región medial de -2.36 a -2.96 y región ventral de -3.16 a -4.12 (Gaarskjaer, 1978; Vivar et al.

2016). Se consideraron células BrdU<sup>+</sup> aquellas que tenían un coloración café oscura y que se encontraban en la capa sub-granular a  $\frac{3}{4}$  de la capa granular del giro dentado.

#### 6.4 Inmunofluorescencia para determinar la expresión de PSD-95

Para determinar los cambios en la expresión de PSD-95 de los cerebros obtenidos de la condición control (n = 4) y ejercicio (n = 4) se realizó una inmunofluorescencia para PSD-95 utilizando el anticuerpo primario de ratón anti PSD-95 (1:250; Novusbio) y como anticuerpo secundario burro anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 488 como fluoróforo (1:250; Jackson Immunoresearch). Además, se realizó la tinción de los núcleos celulares con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1:20000; Sigma-Aldrich).

Se seleccionaron cortes de una serie de 1:6 cortes equidistantes y se cuantifico la expresión de PSD-95 en el giro dentado dorsal, medial y ventral. Dichas regiones fueron delimitadas respecto a Bregma (mm) como sigue: GD dorsal desde -1.24 a -2.16, GD medial desde -2.36 a -2.96 y GD ventral desde -3.16 a -4.12. De las rebanadas procesadas para detectar la expresión de PSD-95, se tomó 1 imagen representativa de los distintos niveles del giro dentado dorsal, medial y ventral (10X). Se tomaron 2 imágenes por área de giro dentado en la capa molecular externa y media del giro dentado (63X, zoom 2.0). Esta área es el lugar donde llegan las proyecciones de corteza entorrinal. Igualmente, se adquirieron 2 imágenes de las capas superficiales de la corteza entorrinal lateral y medial, región donde llegan los axones de múltiples áreas corticales hacia la corteza entorrinal.

Una vez adquiridas las imágenes, se realizó una segmentación de éstas utilizando el plugin “Trainable Weka Segmentation” del software ImageJ (versión 1.52d) y posteriormente se utilizó el plugin “Analyze Particles” para su cuantificación estableciendo un rango de 0.15 – 0.8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula de acuerdo a lo reportado (Prange et al. 2009). Por otra parte, se realizó un análisis del tamaño de partícula para determinar el impacto del ejercicio sobre el tamaño de PSD-95, para esto categorizamos en bins de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro

el número de partículas que encontrábamos por bin con el objetivo de determinar si la distribución de tamaño cambiaba con el ejercicio.

### 6.5 Cirugía estereotáxica

Para el marcaje anterógrado de las células de la corteza entorrinal, posterior a un mes de que los ratos estuvieron en sus respectivas condiciones control (n = 3) o de ejercicio (n = 3), éstos fueron sometidos a una cirugía estereotáxica en la cual se les inyectó 0.5 – 0.6  $\mu$ L del virus adeno-asociado pAAV-hSyn-mCherry (Diseñado por Karl Deisseroth, Stanford University, Stanford, CA) adquirido de la University of North Carolina Gene Therapy Center Vector Core. El virus fue inyectado en la corteza entorrinal medial en el hemisferio derecho utilizando las siguientes coordenadas respecto a Bregma (mm): anteroposterior (AP): -4.8, profundidad (D): -2.5, lateralidad (L): -3.3. Después de la cirugía, los ratones fueron mantenidos en sus respectivas condiciones experimentales hasta cumplir los dos meses para posteriormente ser perfundidos. Las rebanadas de cerebro obtenidas fueron procesadas para teñir los núcleos celulares con DAPI (1:20000; Sigma-Aldrich).

Para el marcaje retrógrado de las células de la corteza entorrinal se utilizaron micropartículas de látex que se transportan retrógradamente (Retrobeads, Lumafluor). Después de 2 meses de permanecer en condiciones control (n = 1) o ejercicio (n = 1), los ratones fueron sometidos a una cirugía estereotáxica en la cual se les inyectó 0.1 – 0.2  $\mu$ L de retrobeads (rojos) en el giro dentado dorsal utilizando las siguientes coordenadas respecto a Bregma (mm): AP: -2.1, D: -2.1, L: -1.8. Una vez realizada la cirugía los ratones fueron mantenidos en sus respectivas condiciones por 7 días más para permitir el transporte retrógrado de los retrobeads. Los ratones fueron perfundidos y una vez obtenidos los cerebros, se realizaron cortes horizontales de 40  $\mu$ m. Se realizó la tinción de los núcleos celulares con DAPI (1:20000; Sigma-Aldrich) y se procedió al análisis.

## 6.51 Análisis de imágenes

De los cerebros inyectados con el vector viral pAAV-hSyn-mCherry se tomaron imágenes representativas en los distintos niveles del giro dentado (dorsal, medial y ventral; 1 imagen por nivel; 10X) donde se observaban los axones de las células de la corteza entorrinal que expresaban mCherry en la capa molecular del giro dentado. Además, se adquirieron imágenes de las fibras de la capa molecular (63X, zoom 2.0). Al marcar a las neuronas de la corteza entorrinal, esta técnica nos permitió observar la morfología de las de las neuronas presentes en la corteza entorrinal medial, incluyendo dendritas apicales y basales, de las cuales se adquirieron imágenes representativas en cada condición (control y ejercicio).

De las rebanadas obtenidas de los cerebros inyectados con retrobeads se tomaron imágenes representativas del sitio de inyección del giro dentado dorsal (10X) y los sitios donde se observaron células trazadas retrógradamente, identificando el área de trazado.

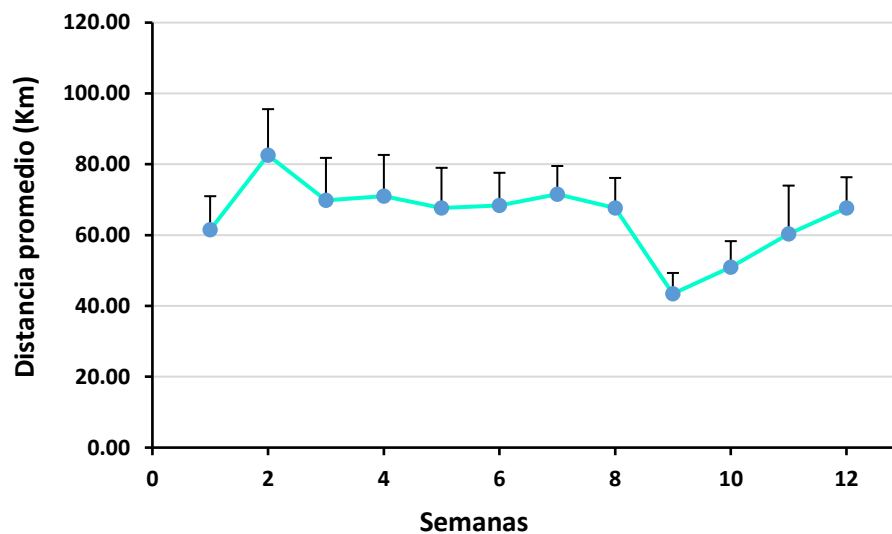
## 1.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 5.0. Las comparaciones entre grupos (control y ejercicio) se realizaron con la prueba t-Student, las comparaciones entre las distintas áreas dentro de un grupo se realizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y entre las áreas del grupo control y de ejercicio se realizó una ANOVA de dos vías, los análisis de distribución de frecuencia se realizaron con la prueba de Kolmogorov y el análisis de correlación con la prueba de correlación de Pearson. Los datos se muestran como la media  $\pm$  S. E. M.

## VII.RESULTADOS

### 7.1 Los ratones se mantienen corriendo por periodos largo de tiempo.

El análisis de la distancia corrida durante el procedimiento experimental mostró que los ratones ( $n = 13$ ) corren por periodos largos de tiempo (Figura 5), lo cual es importante para evaluar el efecto del ejercicio sobre la neurogénesis hipocampal y los cambios en conectividad de la corteza entorrinal. La Figura 5 muestra la distancia recorrida semanalmente. En la primer semana los ratones corren un promedio de 8.80 Km/día y en la última semana del estudio corren un promedio de 9.74 Km/día. Durante todo el procedimiento experimental los ratones corrieron en promedio  $9.36 \pm 0.43$  Km/día y un promedio de  $65.2 \pm 2.93$  Km/semana. Estos datos muestran que los ratones se mantienen corriendo por periodos prolongados de tiempo.

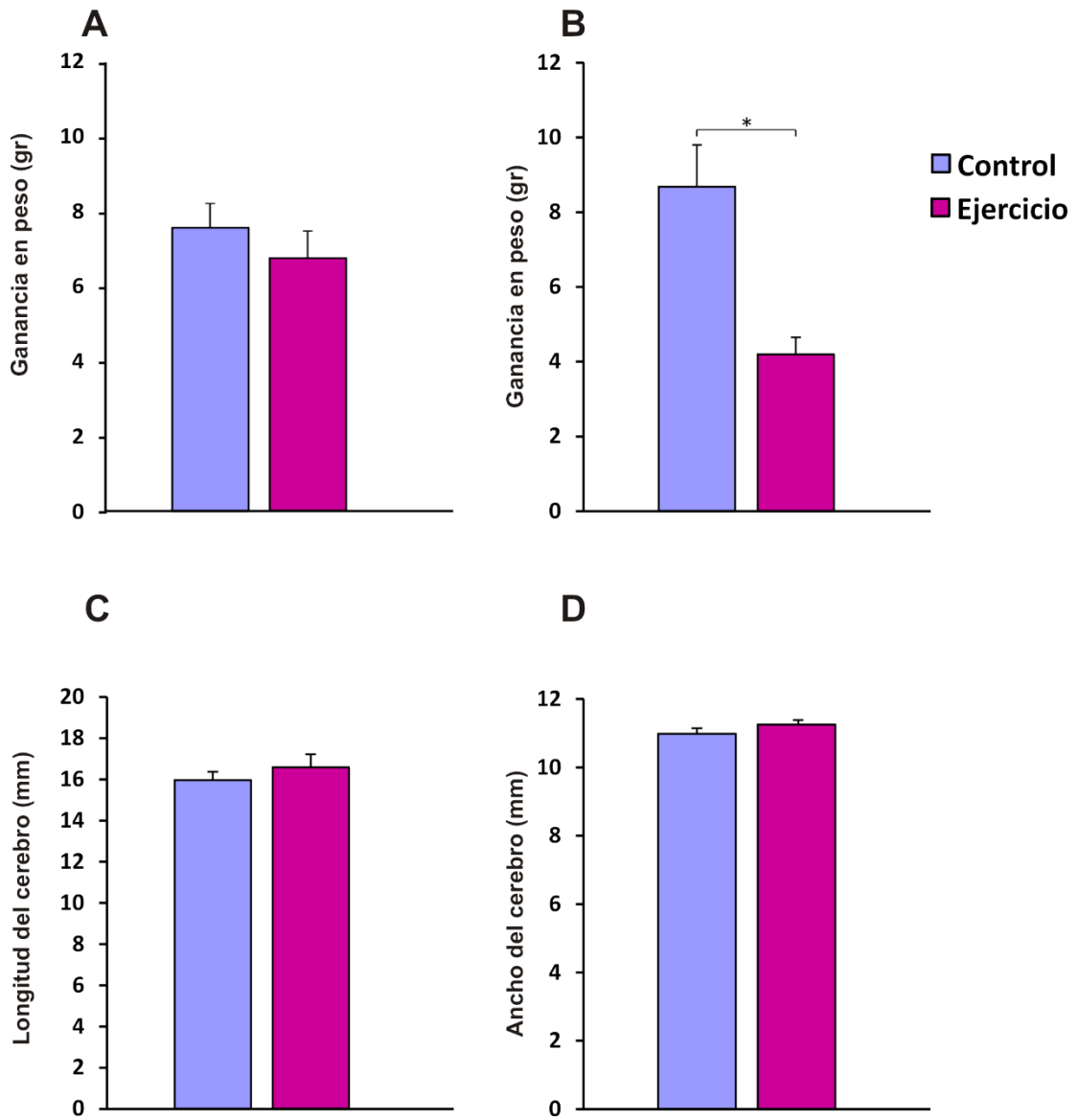


**Figura 5. Distancia recorrida durante 3 meses de ejercicio voluntario.** Distancia promedio por semana. En la primer semana los ratones corren un promedio de  $61.54 \pm 9.43$  Km y en la última semana del estudio corren un promedio de  $67.61 \pm 8.72$  Km. Media  $\pm$  S.E.M.

## 7.2 Dos meses de ejercicio no modifican los parámetros morfométricos corporales y cerebrales.

Una vez concluido el periodo de experimentación, se realizó un análisis morfométrico para determinar el impacto que el ejercicio tiene en el peso corporal de los animales y las dimensiones cerebrales (Figura 6). Para determinar el impacto del ejercicio en el peso corporal se midió el peso corporal al inicio y al final del procedimiento experimental de los animales control y en condición de ejercicio. Se determinó la ganancia en peso medida como la diferencia entre el peso final y el peso inicial. El análisis mostró que dos meses de ejercicio no modifican la ganancia en peso (Control,  $7.49 \pm 0.65$ ,  $n = 8$  vs ejercicio,  $6.84 \pm 1.28$ ,  $n = 8$ ;  $t_{(14)} = 0.5203$ ;  $p > 0.05$ ; Figura 6A). Sin embargo, 3 meses de ejercicio reducen significativamente la ganancia en peso (Control,  $8.68 \pm 1.1$ ,  $n = 5$  vs ejercicio,  $4.19 \pm 0.63$ ,  $n = 5$ ;  $t_{(8)} = 3.754$ ;  $p < 0.05$ ; Figura 6B). Estos resultados sugieren que entre mayor sea el tiempo que se realice ejercicio menor será la ganancia en peso con respecto a los sujetos control.

Para determinar el impacto del ejercicio en las dimensiones del cerebro se midió la longitud y ancho del cerebro de los animales en condición control ( $n = 13$ ) y de ejercicio ( $n = 13$ ). El análisis mostró que el ejercicio no modifica ni la longitud (Control,  $16.21 \pm 0.1977$ , vs ejercicio,  $16.79 \pm 0.2850$ ;  $t_{(24)} = 1.668$ ;  $p > 0.05$ ; Figura 6C), ni el ancho del cerebro (Control,  $10.94 \pm 0.1110$  vs ejercicio,  $18.81 \pm 7.672$ ;  $t_{(24)} = 1.026$ ;  $p > 0.05$ ; Figura 6D). Estos resultados demuestran que el ejercicio no modifica las dimensiones macroscópicas del cerebro.

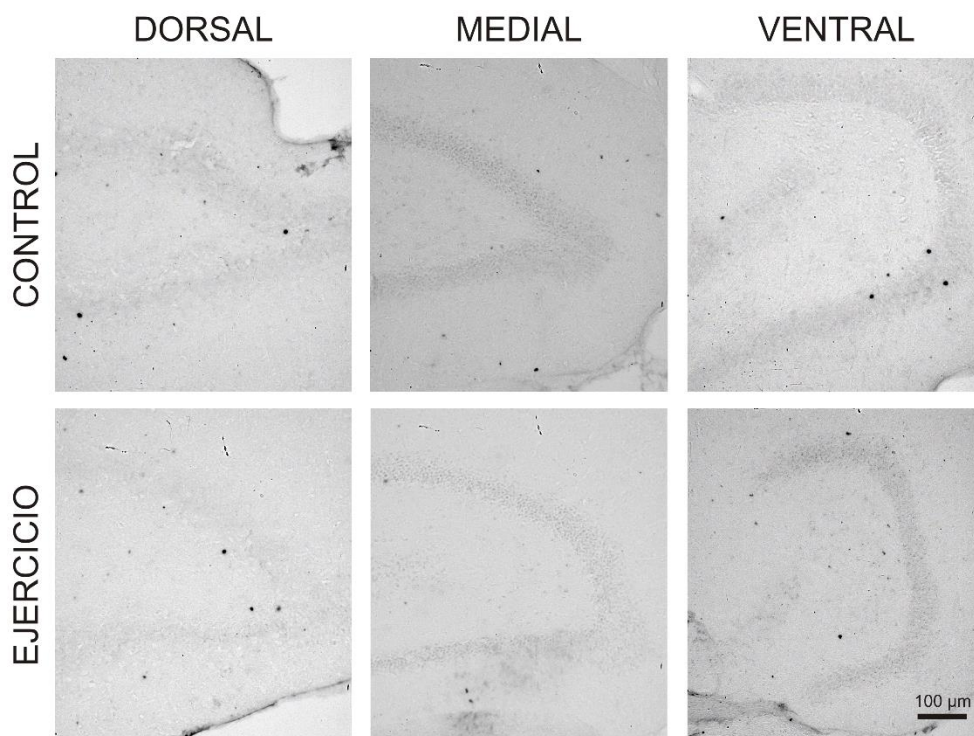


**Figura 6. Dos meses de ejercicio no modifican el peso corporal ni las dimensiones cerebrales.** **A, B** La ganancia en peso después de 2 meses de ejercicio (**A**) no disminuye, pero cuando los ratones se mantienen haciendo ejercicio por 3 meses (**B**), su ganancia en peso es menor con respecto a los controles. **C, D** La longitud y ancho del cerebro no se modifican por el ejercicio. (Media  $\pm$  S.E.M; \* $p < 0.05$ ).



### 7.3. Dos meses de ejercicio no mantiene elevado el número total de células BrdU<sup>+</sup>

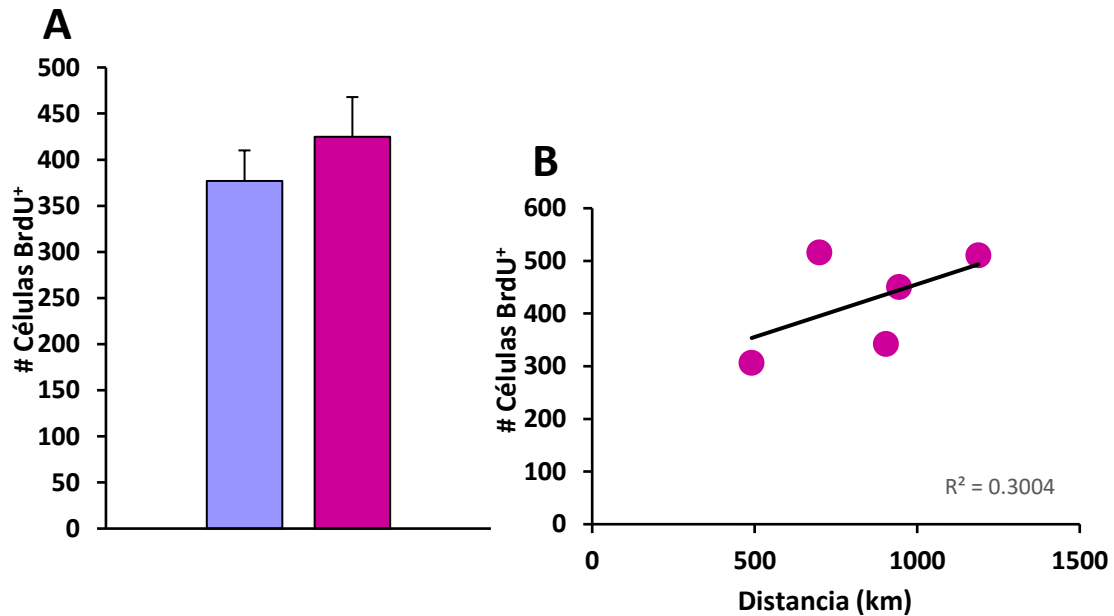
Para determinar el efecto de 2 meses de ejercicio sobre la neurogénesis hipocampal en los animales en condición control (n = 5) y de ejercicio (n = 5), se inyectó BrdU, un análogo de la timidina que se integra al DNA durante la fase de síntesis (Kuhn and Cooper-Kuhn 2007). Después de la inyección de BrdU los ratones fueron mantenidos en sus respectivas condiciones por un mes más, esto permitió cuantificar el número de células marcadas con BrdU que alcanzaron el estadio de neurona madura. En la Figura 7 se muestran imágenes representativas del giro dentado dorsal, medial y ventral de animales en condiciones control y ejercicio, donde se pueden apreciar las células BrdU<sup>+</sup> (puntos negros) después de dos meses de ejercicio.



**Figura 7. Efecto de dos meses de ejercicio en el número de células BrdU<sup>+</sup> a través del eje dorso-ventral.** Imágenes representativas del giro dentado donde se muestra el revelado de la marca de BrdU (puntos negros) en el giro dentado dorsal, medio y ventral de animales en condiciones control y de ejercicio.

La cuantificación del número total de células BrdU<sup>+</sup> en el giro dentado reveló que 2 meses de ejercicio no incrementan el número total de células BrdU<sup>+</sup> (Control, 376 ± 33.27, vs ejercicio, 424 ± 43.12;  $t_{(8)} = 0.8814$ ;  $p > 0.05$ ; Figura 8A).

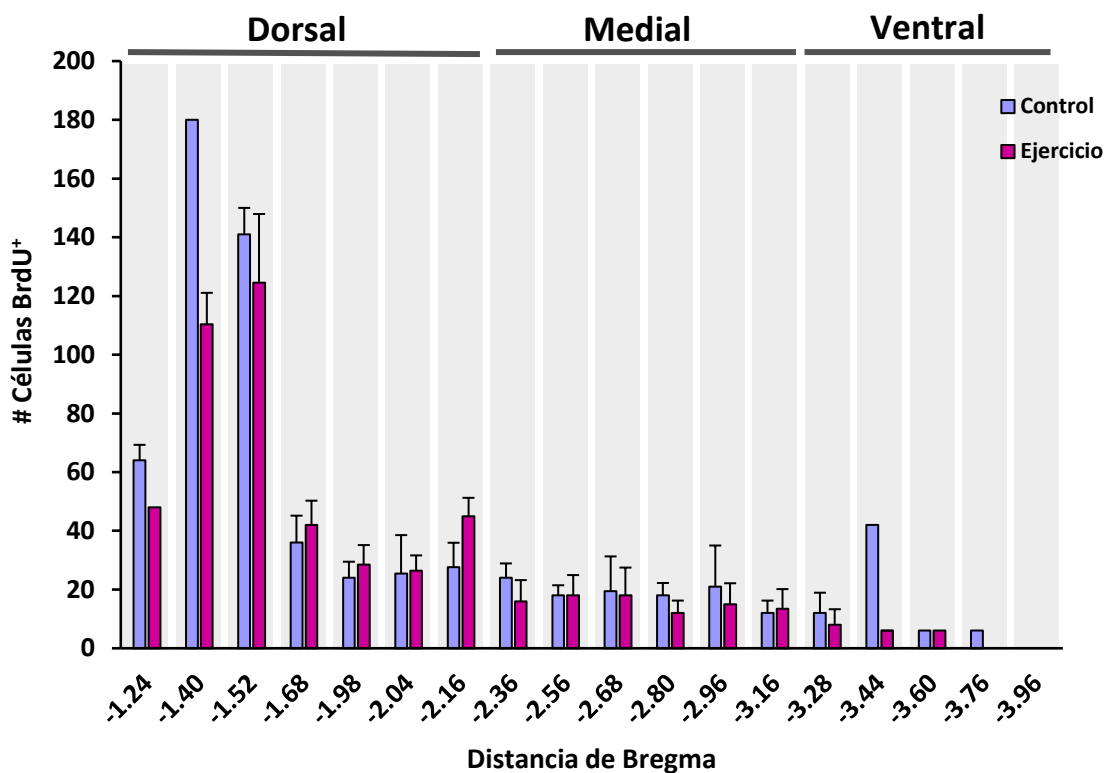
Posteriormente se realizó un análisis para determinar si existía una correlación entre la distancia recorrida (Km) por los ratones durante los 3 meses de ejercicio y el número total de células BrdU<sup>+</sup>. El análisis reveló que la distancia recorrida no influye sobre el número de nuevas neuronas generadas ( $R^2 = 0.3004$ ;  $p > 0.05$ ; Figura 8B). En conjunto, estos resultados muestran que aunque los ratones hayan seguido corriendo voluntariamente, esto no incrementa los niveles de neurogénesis, lo que sugiere que el incremento en la neurogénesis durante el ejercicio podría ser transitorio.



**Figura 8. El ejercicio a largo plazo no incrementa el número total de células BrdU<sup>+</sup>.** **A)** El número total de células BrdU<sup>+</sup> en el giro dentado no difiere entre ratones en condiciones control y de ejercicio. ( $t_{(8)} = 0.8814$ ;  $p > 0.05$ ). **B)** No existe una correlación entre la distancia recorrida durante el experimento y el número de células BrdU<sup>+</sup>. Cada punto representa la correlación entre la distancia y el número total de células BrdU<sup>+</sup> por ratón. Correlación de Pearson;  $R^2=0.3004$ .

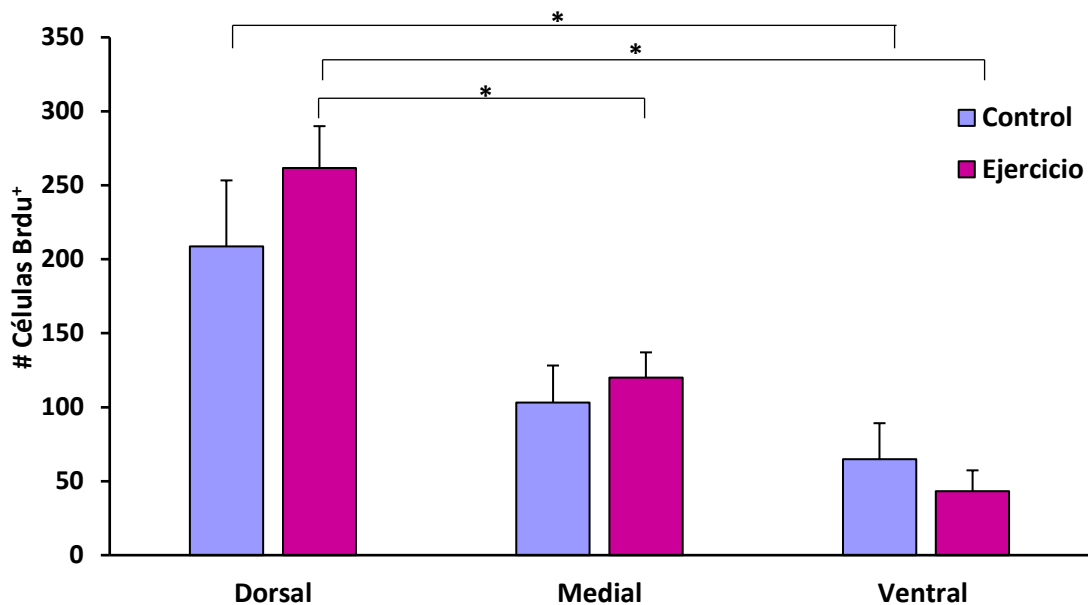
### 7.3.1 El ejercicio a largo plazo no modifica la distribución de células BrdU+ a través del eje dorso-ventral.

Estudios previos han mostrado que un mes de ejercicio incrementa significativamente el número de células BrdU+ en el giro dentado dorsal (Vivar et al. 2016). Para determinar si el ejercicio induce un incremento en el número de células BrdU+ a través del eje dorso-ventral, las rebanadas procesadas para la detección de BrdU+ de los grupos control (n = 5) y en condición de ejercicio (n = 5) fueron pareadas con respecto al atlas de ratón (Ver metodología; Figura 9). Posteriormente, el giro dentado fue dividido en región dorsal, medial y ventral (Ver metodología) y se realizó la cuantificación del número de células BrdU+ en cada una de estas regiones (Figura 9 y 10).



**Figura 9. Número de células BrdU+ a través del eje dorso-ventral del giro dentado.** Dos meses de ejercicio no incrementan el número de células BrdU+ en ninguna de las áreas del giro dentado. Cada barra representa el de número de células BrdU+ por coordenada respecto a Bregma.

El análisis mostró que en condiciones control el número de células BrdU<sup>+</sup> en el giro dentado es diferente a través del eje dorso-ventral ( $F_{(2,12)} = 0.7508$ ,  $p < 0.05$ ; Figura 10). Una prueba post-hoc de comparaciones múltiples reveló que el número de células BrdU<sup>+</sup> en el giro dentado dorsal es mayor en comparación con el giro dentado ventral ( $p < 0.05$ ), mientras que no hay diferencias significativas con el giro dentado medial ( $p > 0.05$ ) (GD dorsal:  $208.8 \pm 44.51$ , GD medial;  $103.2 \pm 24.98$ , GD ventral:  $64.8 \pm 24.40$ ). Asimismo, el análisis mostró que en condiciones de ejercicio el número de células BrdU<sup>+</sup> es diferente a través del eje dorso-ventral ( $F_{(2,12)} = 0.6920$ ;  $p < 0.05$ ; Figura 10). La prueba post-hoc de comparaciones múltiples mostró que el número de células BrdU<sup>+</sup> es significativamente mayor en la región dorsal en comparación con la región medial ( $p < 0.05$ ) y ventral ( $p < 0.05$ ) (GD dorsal:  $261.6 \pm 28.37$ , GD medial;  $120 \pm 17.076$ , GD ventral:  $43.2 \pm 14.122$ ). Al comparar el número de células BrdU<sup>+</sup> entre condiciones (control y ejercicio), en las regiones dorsal, medial y ventral, los resultados confirmaron que 3 meses de ejercicio no mantienen elevado el número de células BrdU<sup>+</sup> y tampoco modifican su distribución a través del eje dorso ventral ( $F_{(2, 24)} = 0.9235$ ;  $p > 0.05$ ) (Figura 10), contrario a lo observado con un mes de ejercicio (Vivar et al. 2016). Estos resultados sugieren que el incremento de la neurogénesis podría ser transitorio y que otros mecanismos, adicionales al incremento de la neurogénesis, podrían estar involucrados en el mantenimiento de la mejora cognitiva.

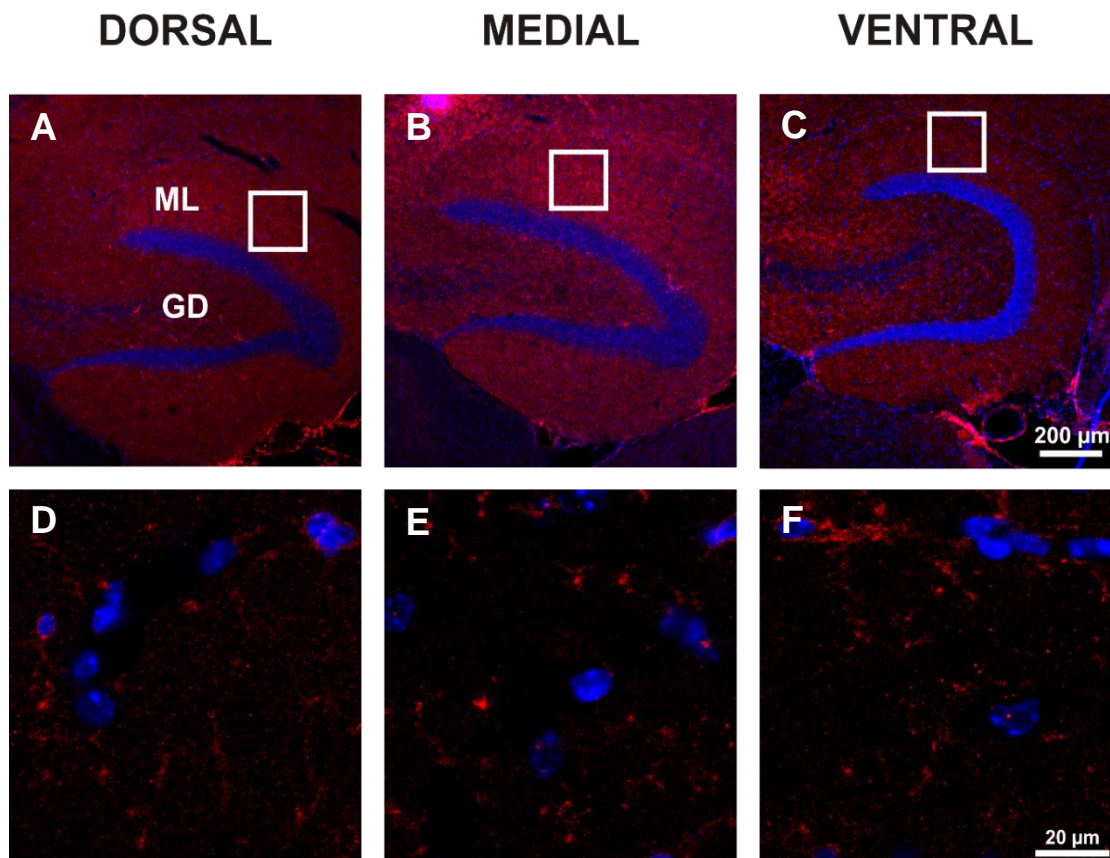


**Figura 10. La distribución de las células BrdU<sup>+</sup> en el eje dorso-ventral del giro dentado no se modifica por 2 meses de ejercicio.** La distribución de células BrdU<sup>+</sup> por área de giro dentado es similar en ambas condiciones (control y ejercicio). El número de células BrdU<sup>+</sup> es mayor en el giro dentado dorsal con respecto al área medial y ventral en ambos grupos. \* $p < 0.05$ .

#### **7.4 Dos meses de ejercicio no modifican la densidad de partículas PSD-95 en la capa molecular del giro dentado.**

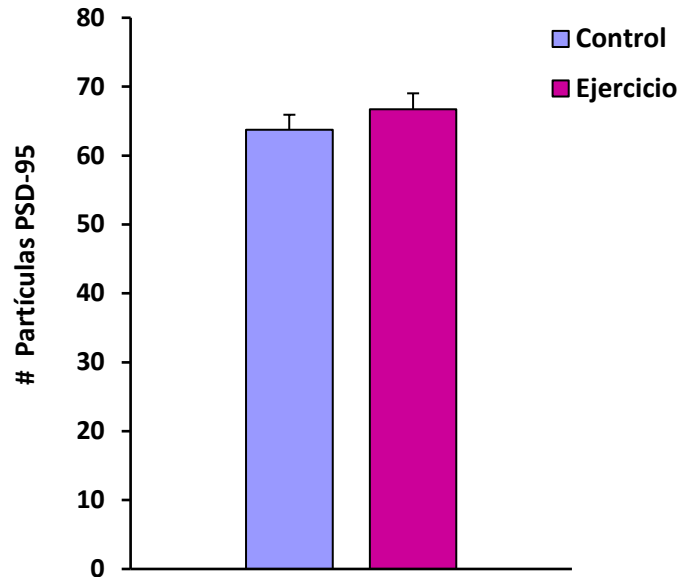
Los resultados previos sugieren que mecanismos adicionales al incremento de la neurogénesis podrían estar involucrados en la mejora cognitiva inducida por el ejercicio a largo plazo. Es por ello que analizamos los posibles cambios en la conectividad neuronal en el giro dentado y la corteza entorrinal inducidos por 2 meses de ejercicio, a través de la determinación de la expresión de PSD-95. La proteína PSD-95 se localiza en la hendidura post-sináptica y participa (de manera indirecta) en cambios de plasticidad sináptica, al permitir el anclaje de receptores NMDA a la hendidura sináptica a través de una interacción con la subunidad NR2 (Kornau et al. 1995). Además, interactúa

con proteínas como neuroligina y sinaptofisina implicadas en cambios presinápticos cuya interacción con PSD-95 puede tener un efecto sobre plasticidad sináptica (Prange et al. 2004; Nithianantharajah et al. 2004). En ratones control (n = 4) y en condición de ejercicio (n = 4) se cuantificó el número de partículas PSD-95 en la capa molecular del giro dentado a través del eje dorso-ventral (Figura 11). Esta capa del giro dentado es el área donde llegan los axones de la corteza entorrinal y establecen conexión con las neuronas granulares del giro dentado.



**Figura 11. Imágenes representativas de la expresión de PSD-95 en el giro dentado.** Las imágenes muestran la densidad de partículas de PSD-95 en el giro dentado. **A, B, C.** Vista panorámica del giro dentado (GD) dorsal (**A**), medial (**B**) y ventral (**C**) de un animal control (10X). El recuadro muestra el área donde se adquirieron las imágenes en **D, E** y **F**. **D, E, F.** Fotomicrografías de la capa molecular (ML) del giro dentado dorsal (**D**), medial (**E**) y ventral (**F**) donde se muestra la expresión de PSD-95 (rojo) en forma de puntillero. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI.

Los resultados mostraron que dos meses de ejercicio no modifican la densidad de partículas PSD-95 en la capa molecular del giro (Control,  $63.73 \pm 2.193$ , vs ejercicio,  $66.27 \pm 2.305$ ;  $t_{(6)} = 0.7988$ ;  $p > 0.05$ ; Figura 12).



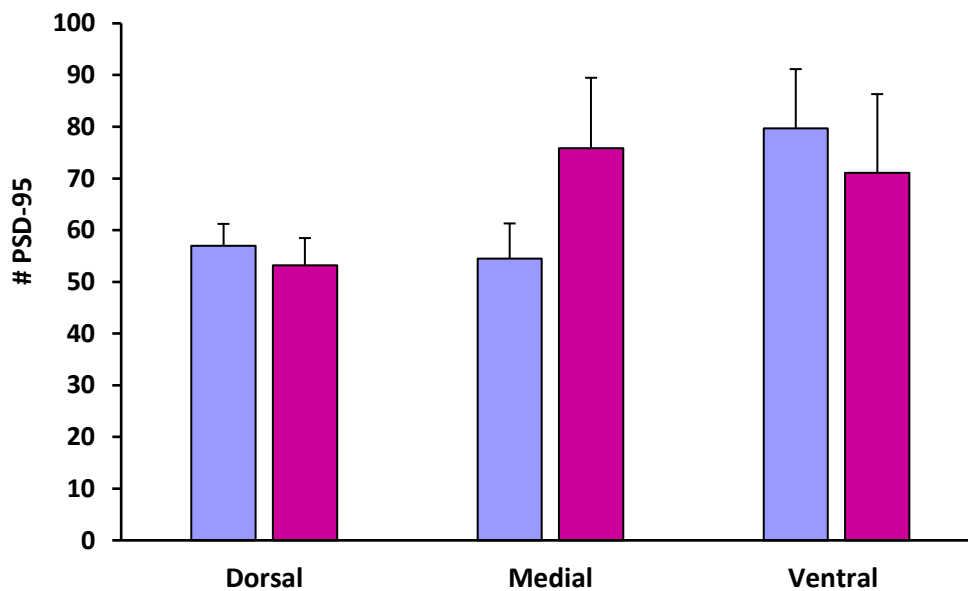
**Figura 12. Dos meses de ejercicio no modifican el número total de partículas PSD-95 en la capa molecular del giro dentado.** La densidad de partículas de PSD-95 es similar en ambas condiciones.  $t_{(6)} = 0.7988$ ;  $p > 0.05$ .

#### **7.4.1 Dos meses de ejercicio no modifican el número de partículas de PSD-95 en la capa molecular del giro dentado a través del eje dorso-ventral.**

Para determinar si el ejercicio induce cambios en la expresión de PSD-95 a través del eje dorso-ventral del giro dentado, se tomaron las rebanadas procesadas para la detección de la proteína PSD-95 en ratones control ( $n = 4$ ) y en condición de ejercicio ( $n = 4$ ). Posteriormente, el giro dentado fue dividido en región dorsal, medial y ventral (Ver metodología) y se realizó la cuantificación de partículas PSD-95 en cada una de estas regiones (Figura 13 y 14) para determinar si las diferencias de expresión de PSD-95 se evidenciaban en alguna de las regiones del giro dentado.

El análisis mostró que en condiciones control el número de partículas PSD-95 en el giro dentado es homogéneo a través del eje dorso-ventral (GD

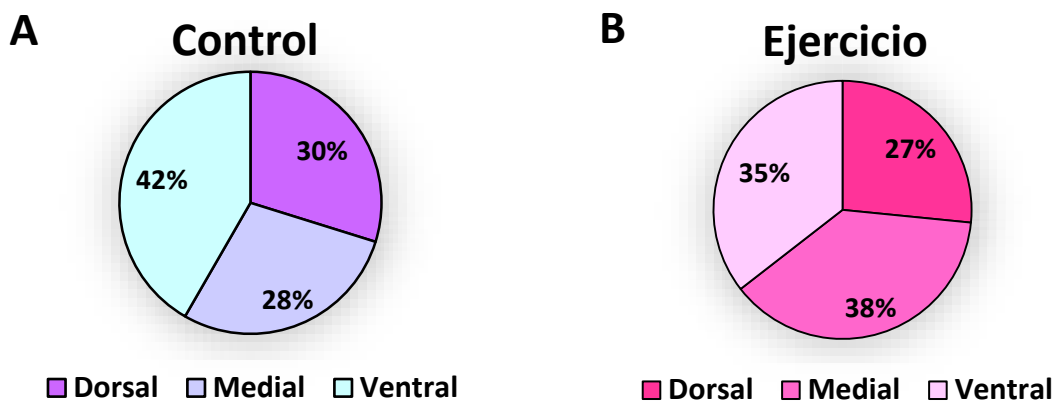
dorsal:  $57 \pm 4.41$ , GD medial;  $54.50 \pm 6.804$ , GD ventral:  $79.69 \pm 11.47$ ;  $F_{(2,9)} = 2.954$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 13). De la misma forma, el análisis mostró que en la condición de ejercicio no existía diferencia en la expresión de PSD-95 a lo largo del eje dorso-ventral (GD dorsal:  $53.19 \pm 5.28$ , GD medial;  $75.88 \pm 13.60$ , GD ventral:  $71.06 \pm 15.26$ ;  $F_{(2,9)} = 0.9618$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 13). Al comparar el número de partículas PSD-95 entre condiciones (control y ejercicio), en las regiones dorsal, medial y ventral, los resultados confirmaron que la densidad de partículas PSD-95 no se modifica a través del eje dorso-ventral después de 2 meses de ejercicio ( $F_{(2, 18)} = 1.214$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 13). Estos resultados sugieren que quizá los cambios en conectividad mediados por cambios en la expresión de PSD-95 en el giro dentado no se mantengan con el tiempo o que sean necesarios periodos de ejercicio mayores para ver cambios en la expresión de PSD-95.



**Figura 13. Dos meses de ejercicio no modifican la densidad de partículas PSD-95 en la capa molecular del giro dentado a través del eje dorso-ventral.** Promedio de partículas PSD-95 en condición control y ejercicio.  $F_{(2, 18)} = 1.214$ ;  $p > 0.05$ .



Al realizar un análisis porcentual de la distribución de la proteína PSD-95 en las regiones dorsal, medial y ventral del giro dentado de animales control o en condición de ejercicio, se observó que esta es homogénea a lo largo del eje dorso-ventral en ambas condiciones (Figura 14). En conjunto, estos resultados muestran que la densidad de partículas PSD-95 es homogénea a través del eje dorso-ventral y que el ejercicio no modifica su distribución.

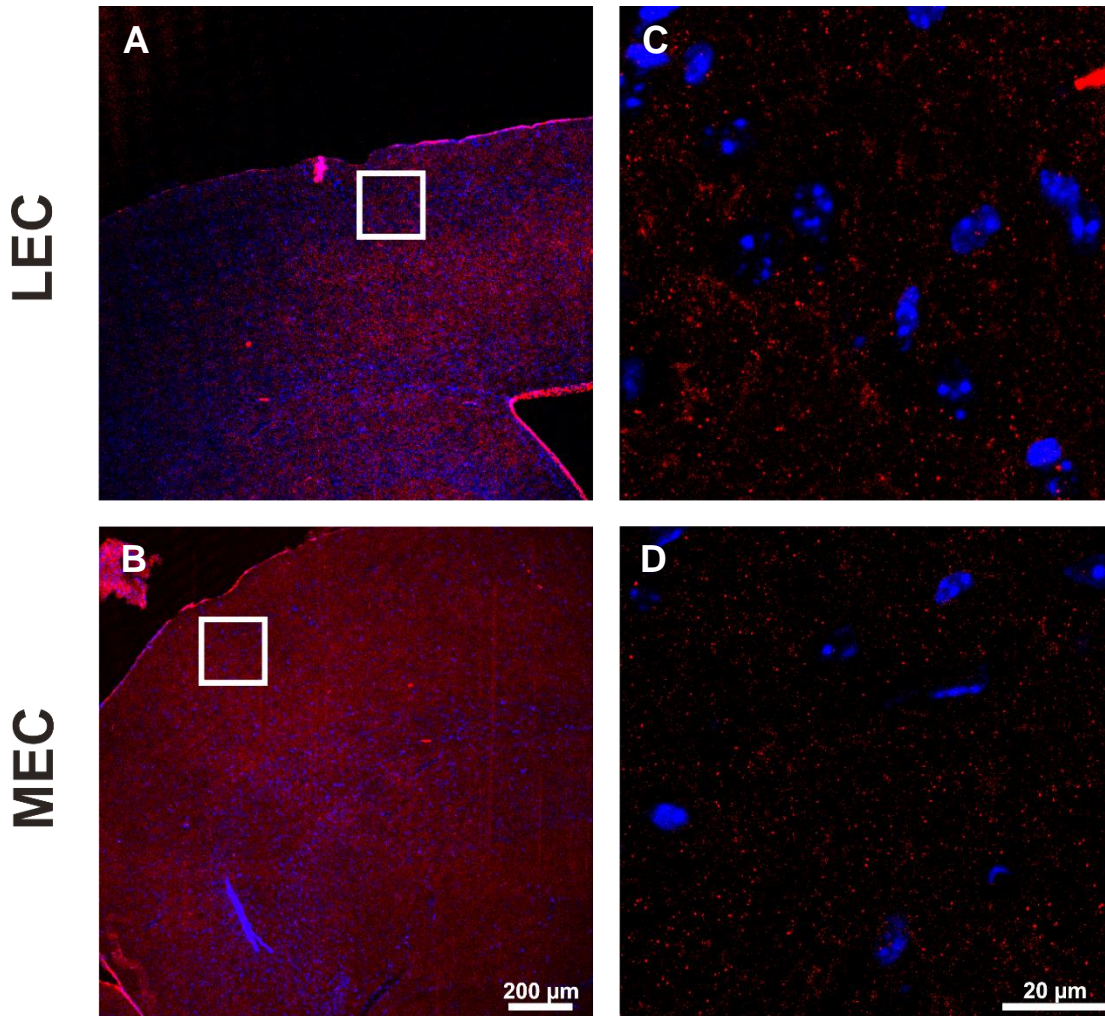


**Figura 14.** La proteína PSD-95 se distribuye equitativamente a lo largo del eje dorso-ventral en condiciones control y de ejercicio. Distribución porcentual de la proteína PSD-95 en la capa molecular del giro dentado de animales en condiciones control (A) y de ejercicio (B).

### 7.5 Dos meses de ejercicio modifican la expresión de la proteína PSD-95 en la corteza entorrinal lateral.

Para determinar si dos meses de ejercicio tienen efecto sobre la expresión de PSD-95 en la corteza entorrinal en ratones control ( $n = 4$ ) y en condición de ejercicio ( $n = 4$ ). Siguiendo el mismo protocolo utilizado para la detección de PSD-95 en el giro (para más detalles ver metodología), se realizó el análisis de la expresión de PSD-95 en la capa II de la corteza entorrinal

lateral y medial (Figura 15), capa donde llegan las entradas somatosensoriales de distintas áreas corticales.

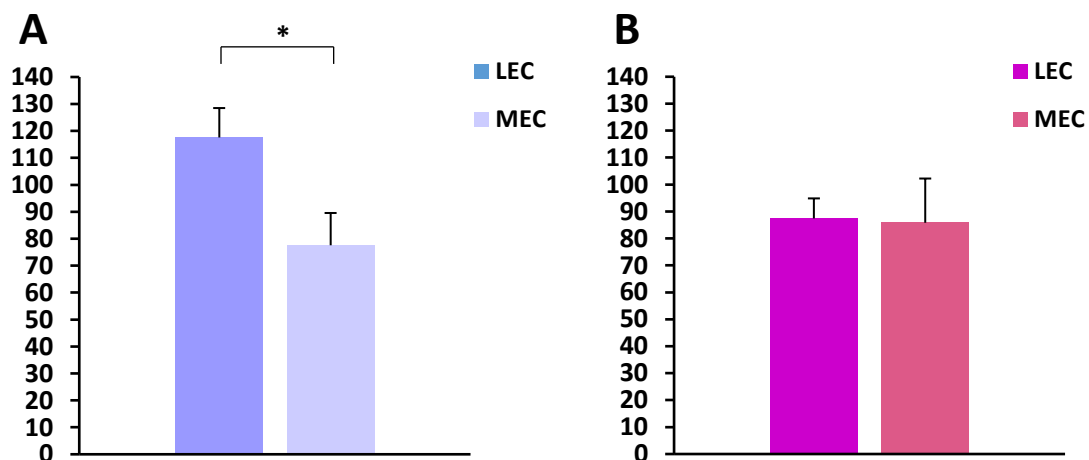


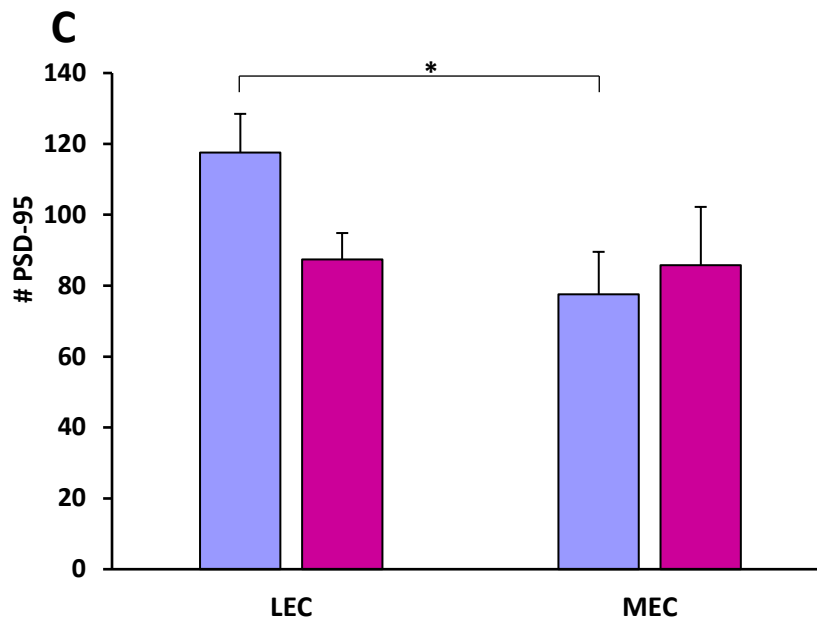
**Figura 15. Imágenes representativas de la expresión de PSD-95 en la corteza entorrinal.** Las imágenes muestran la densidad de partículas PSD-95 en la corteza entorrinal lateral (LEC) y medial (MEC). **A, B.** Vista panorámica de la corteza entorrinal lateral (**A**) y medial (**B**) de un animal control. El recuadro muestra el área donde se adquirieron las imágenes en **C** y **D**. **C, D.** Fotomicrografías de las capas superficiales de la corteza entorrinal del lateral (**C**) y medial (**D**) donde se muestra la expresión de PSD-95 (rojo) en forma de puntillero. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI (azul).

Los resultados del análisis revelaron que no existe diferencia en el número de partículas PSD-95 entre los grupos control y ejercicio en la corteza entorrinal lateral (Control,  $117.6 \pm 10.91$  vs ejercicio,  $87.42 \pm 7.436$ ;  $t_{(6)} = 2.468$ ,

$p > 0.05$ ; Figura 16A,B) ni tampoco en la corteza entorrinal medial (Control  $77.56 \pm 11.98$  vs ejercicio,  $85.81 \pm 16.41$ ;  $t_{(6)} = 0.4060$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 16B).

Posteriormente, se determinó si hay diferencias en la distribución de las partículas PSD-95 entre la corteza entorrinal medial y lateral de los ratones control ( $n = 4$ ) y en condición de ejercicio ( $n = 4$ ). El análisis de la densidad de partículas PSD-95 reveló que en el grupo control hay mayor densidad de partículas de PSD-95 en la corteza entorrinal lateral con respecto a la corteza entorrinal medial (LEC  $117.6 \pm 10.91$ , MEC  $77.56 \pm 11.98$ ;  $t_{(6)} = 2.468$ ,  $p < 0.05$ ; Figura 16A). No obstante, en la condición de ejercicio esta diferencia se pierde y encontramos una densidad de partículas PSD-95 similar entre LEC y MEC (LEC  $87.42 \pm 7.436$ , MEC  $85.81 \pm 16.41$ ;  $t_{(6)} = 0.08904$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 16B). Al analizar las diferencias en la expresión de PSD-95 entre las áreas de la corteza entorrinal entre ambos grupos (control y ejercicio) los resultados mostraron que el número de partículas PSD-95 en las áreas de la corteza entorrinal es similar entre grupos ( $F_{(1, 12)} = 2.510$ ,  $p > 0.05$ ). Estos resultados sugieren que 2 meses de ejercicio modifica la conectividad de la corteza entorrinal lateral influyendo sobre la información cortical que esta área recibe.



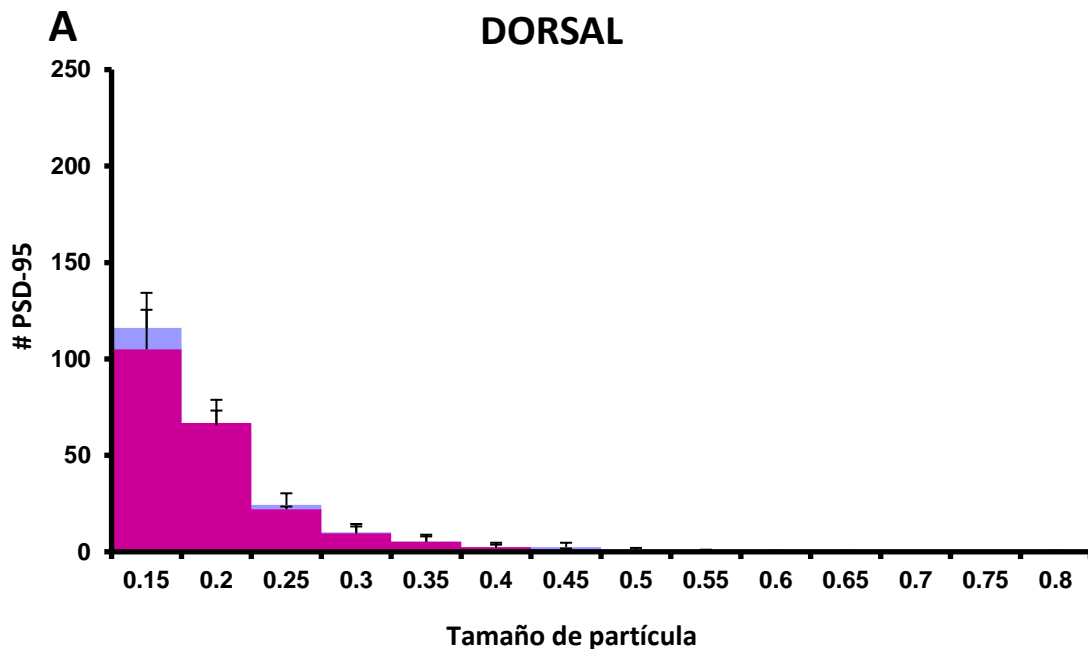


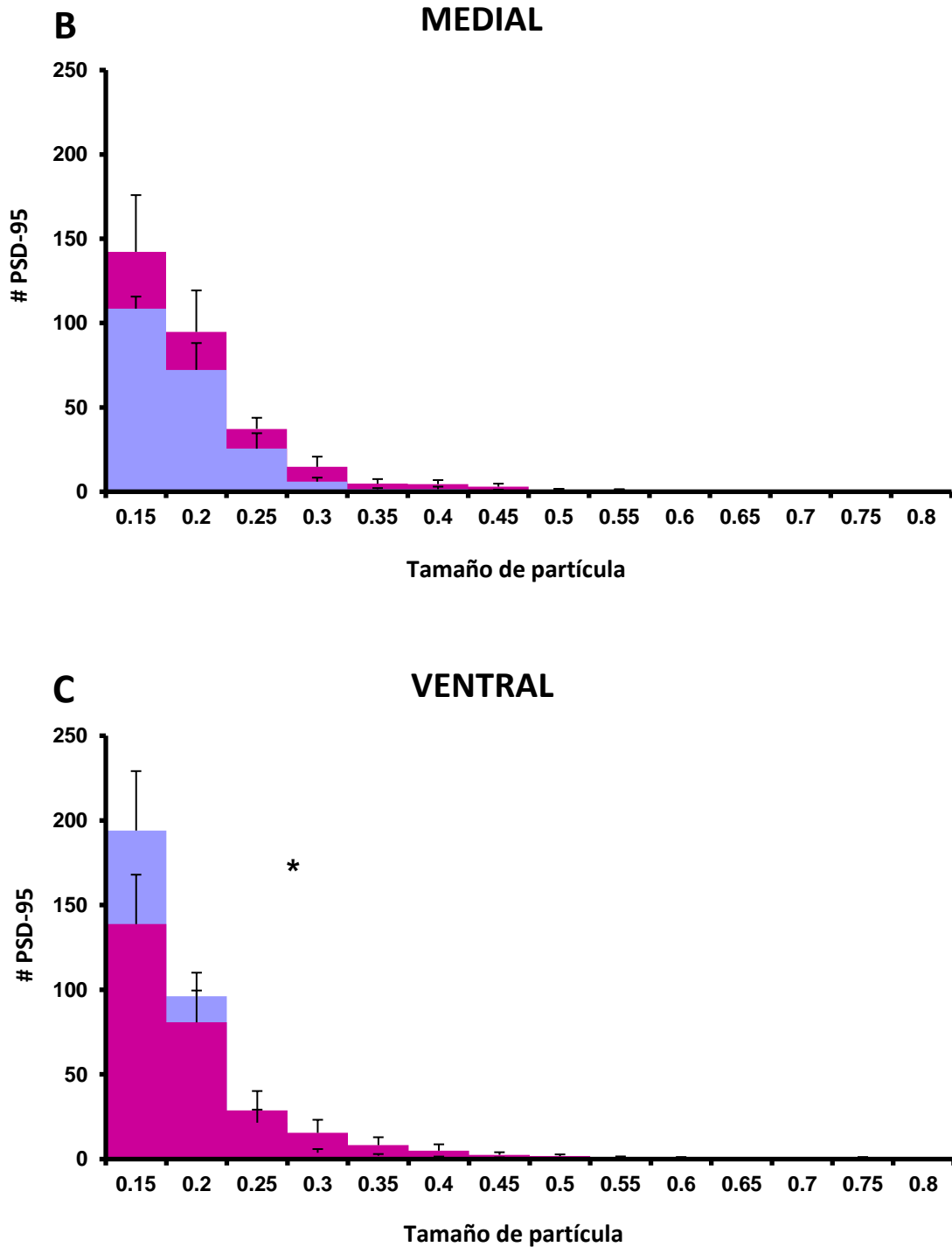
**Figura 16. Dos meses de ejercicio modifican la densidad de partículas PSD-95 en la corteza entorrinal. A, B.** Densidad de partículas PSD-95 en corteza entorrinal lateral (LEC) y medial (MEC) en condición control (**A**) y de ejercicio (**B**). **C** La distribución de la densidad de partículas PSD-95 entre LEC y MEC es diferente en condiciones control, mientras que en condiciones de ejercicio esta diferencia desaparece ( $t_{(6)} = 2.468$ ,  $*p < 0.05$ ;  $t_{(6)} = 0.08904$ ,  $p > 0.05$ ;  $F_{(1, 12)} = 2.510$ ,  $p > 0.05$  ).

## 7.6 La distribución del tamaño de partículas PSD-95 es distinta en el giro dentado ventral después de 2 meses de ejercicio

Cambios en el tamaño de las partículas PSD-95 son un indicativo indirecto de cambios en la conectividad, ya que el tamaño de los clúster que forma PSD-95 establecen relación con espinas dendríticas de mayor tamaño (Isshiki et al. 2014), las cuales se vuelven más estables, permitiendo un mayor flujo de información (Berry y Nevidi, 2017). Debido a lo anterior, analizamos si el ejercicio induce cambios en el tamaño de las partículas PSD-95 que fueron cuantificadas en la capa molecular del giro dentado dorsal, ventral y medial de

animales control (n = 4) y en condición de ejercicio (n = 4). Para ello, las partículas PSD-95 cuantificadas fueron agrupadas de acuerdo a su tamaño en bins de 0.5 $\mu$ m (rangos de tamaño de 0.15  $\mu$ m hasta 0.8  $\mu$ m; Prange et al. 2004). Posteriormente, se realizó un análisis para determinar si existía una diferencia en la distribución total (test de Kolmogorov) y por cada rango de tamaño de partícula PSD-95 (ANOVA). El análisis mostró que 2 meses de ejercicio no modifican la distribución del tamaño de las partículas PSD-95 en la capa molecular del giro dentado dorsal ni medial (GD dorsal,  $p > 0.05$ , Chi cuadrada = 0.300; GD medial,  $p > 0.05$ , Chi cuadrada = 1.633; Figura 17 A,B), pero si lo hace en la capa molecular del giro dentado ventral, aumentando el número de partículas en los rangos de mayor tamaño (GD ventral,  $p < 0.05$ , Chi cuadrada = 7.5000; Figura 17 C). Estos datos sugieren que 2 meses de ejercicio modifican la conectividad de la corteza entorrinal hacia el giro dentado ventral al aumentar el número de partículas PSD-95 de mayor tamaño.

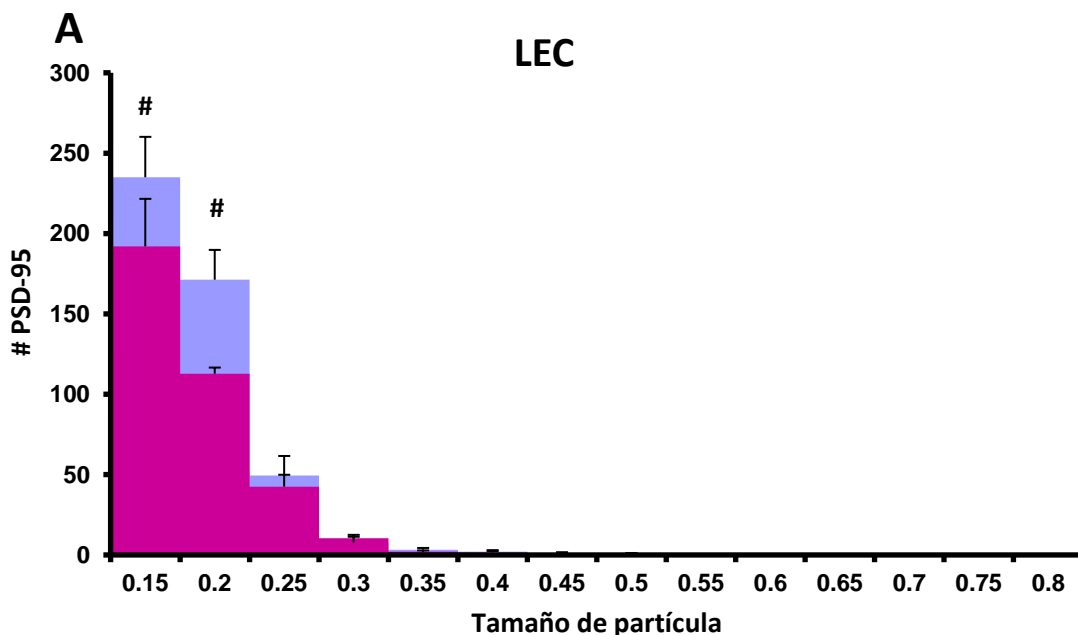


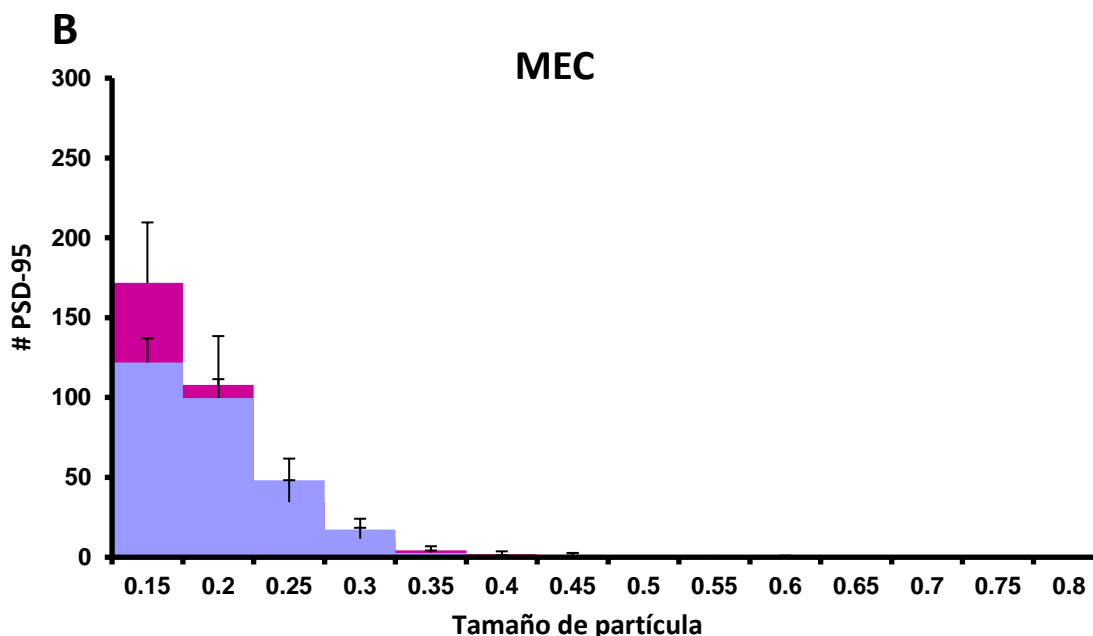


**Figura 17. Dos meses de ejercicio incrementan el tamaño de las partículas PSD-95 en la capa molecular del giro dentado ventral. A, B, C.** Rango de tamaño de las partículas PSD-95 en giro dentado dorsal (A), medial (B) y ventral (C). **C.** Dos meses de ejercicio incrementaron el tamaño de partículas PSD-95 en la capa molecular del giro dentado ventral. Distribución de la muestra: test de Kolmogorov; \* $p < 0.05$ .

### 7.7 Dos meses de ejercicio modifican el tamaño de las partículas de PSD-95 en la corteza entorrinal lateral.

Siguiendo el mismo protocolo utilizado para la clasificación de partículas PSD-95 en el giro dentado, se clasificaron y cuantificaron las partículas PSD-95 de la corteza entorrinal de acuerdo al rango de tamaño (0.15 – 0.8  $\mu\text{m}$ ) en ratones control (n = 4) y en condición de ejercicio (n = 4). Los resultados de los análisis mostraron que dos meses de ejercicio no modifica la distribución del tamaño de partículas PSD-95 en la corteza entorrinal medial ( $F_{(14,90)} = 0.8870$ ,  $p > 0.05$ ; Figura 18B). Sin embargo, en la corteza entorrinal lateral se observó una disminución en el número de partículas PSD-95 en rangos de menor tamaño (0.2  $\mu\text{m}$ ) ( $F_{(14,90)} = 2.339$ ,  $p < 0.05$ ;Figura 18 A) lo cual correlaciona con la disminución del número de partículas totales en la corteza entorrinal lateral después de 2 meses de ejercicio (ver Figura 16C). Estos resultados sugieren que dos meses de ejercicio modifica la conectividad de la corteza entorrinal lateral mediada por entrada de información de otras áreas corticales.





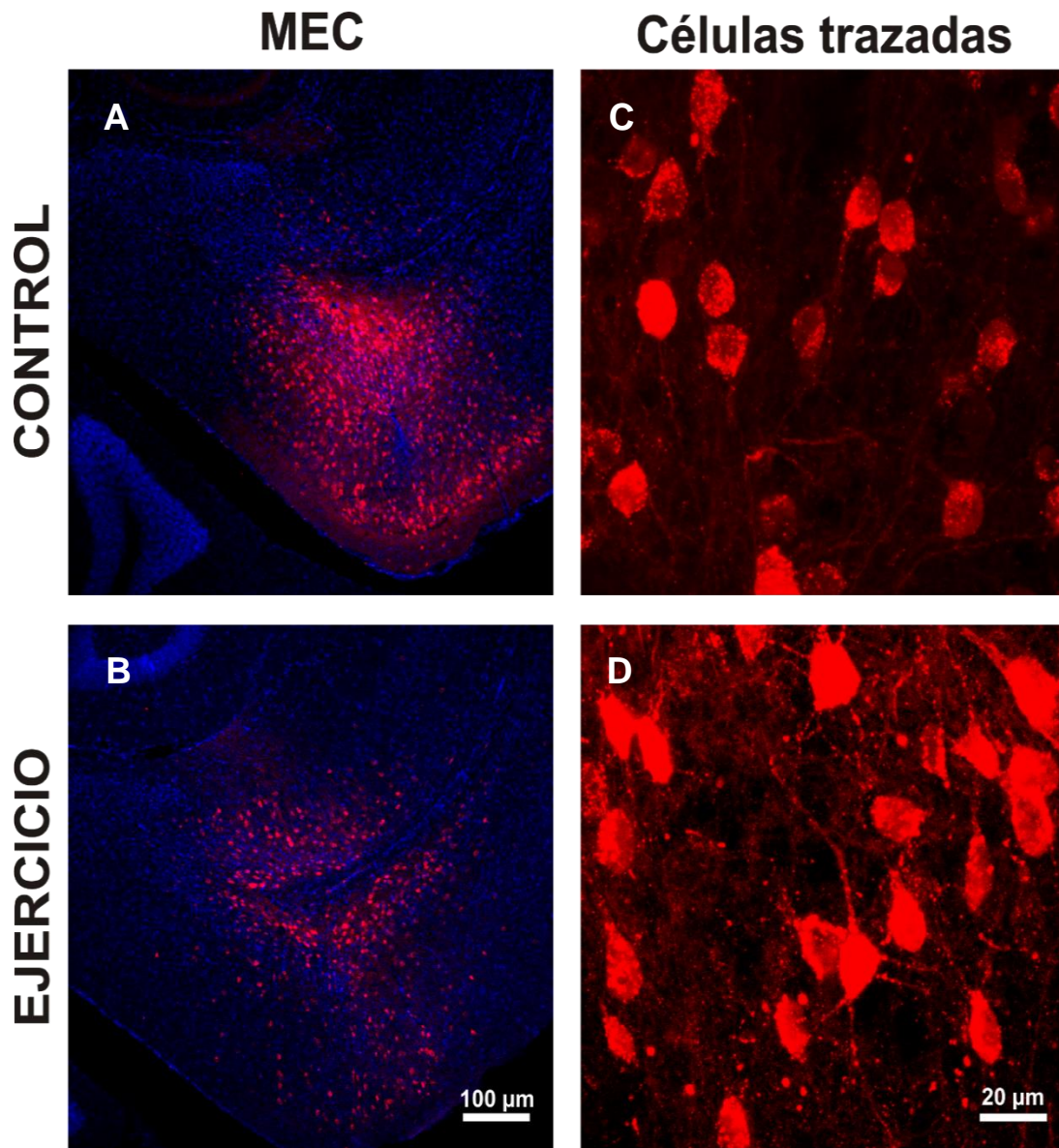
**Figura 18. El tamaño de las partículas PSD-95 en la corteza entorrinal lateral se modifica como efecto de 2 meses de ejercicio. A, B.** Rango de tamaño de partículas PSD-95 en la corteza entorrinal lateral (A) y medial (B). A, Disminución del número de partículas PSD-95 en el rango de tamaño de 0.15 y 0.2  $\mu\text{m}$  en la corteza entorrinal lateral. Distribución de la muestra: test de Kolmogorov;  $p > 0.05$ . Diferencias entre rangos de tamaño: ANOVA;  $\#p < 0.05$ .

### 7.8 Estandarización de las técnicas para el trazado selectivo de las neuronas de la corteza entorrinal

Si bien los resultados anteriores nos permiten evidenciar cambios en la expresión de PSD-95 en la capa molecular del giro dentado y la corteza entorrinal, esto no nos permite determinar si estas modificaciones son debidas exclusivamente a los cambios en la conectividad de la corteza entorrinal. Una estrategia que permite el marcaje selectivo de las células de la corteza entorrinal, incluyendo sus proyecciones dendríticas y axonales, es el uso de vectores virales como el adenovirus-asociado pAAV-hSyn-mCherry, el cual permite el marcaje anterógrado de las neuronas cuando estos son inyectados en el área blanco, como la corteza entorrinal. Utilizando esta metodología en ratones control ( $n = 3$ ) y en condición de ejercicio ( $n = 3$ ) se logró la infección de células de la corteza entorrinal medial. En la figura 19 observamos

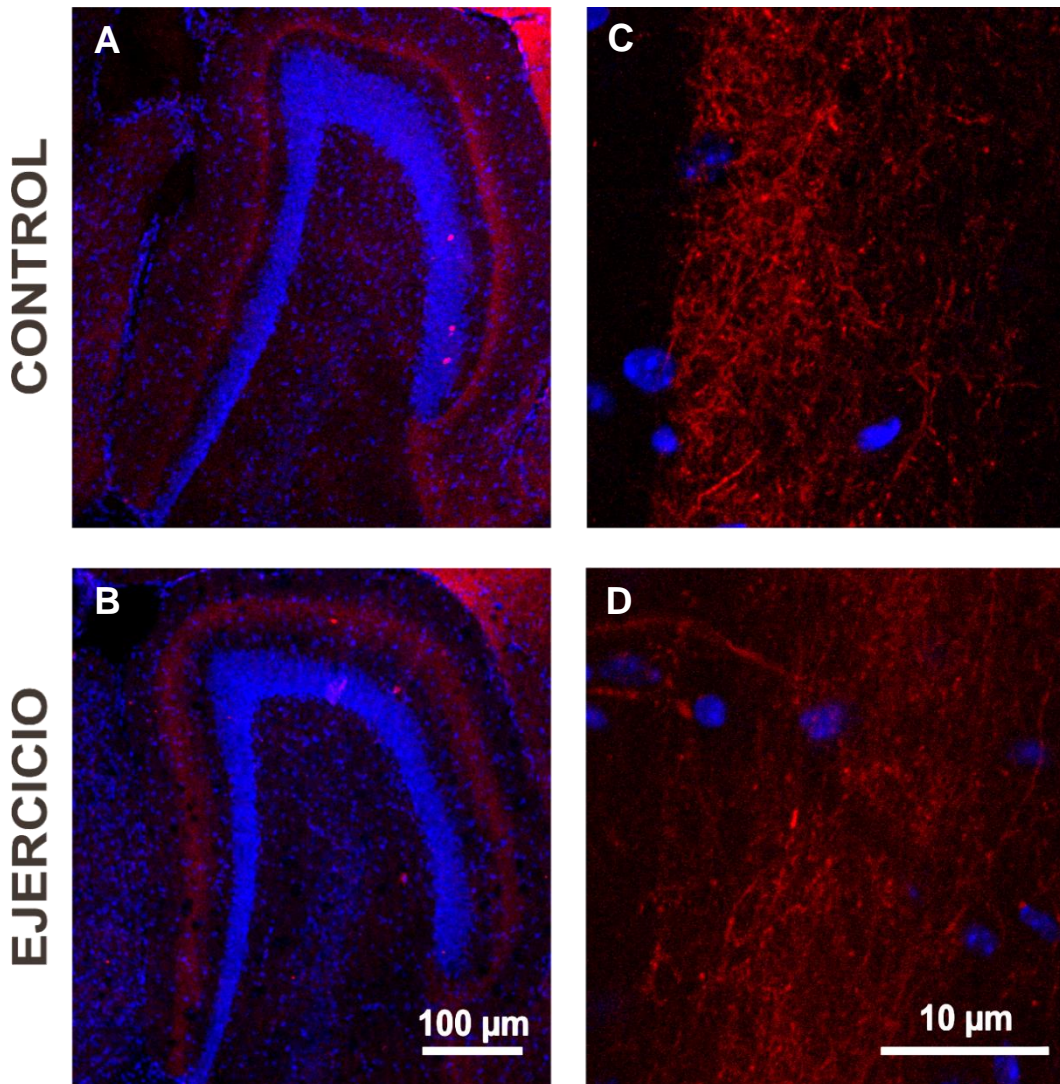


fotomicrografías representativas del sitio de inyección de la corteza entorrinal medial, donde se observa la expresión de la proteína fluorescente mCherry en las células infectadas de rebanadas de cerebros de ratones control (Figura 19 A) y en condición de ejercicio (Figura 19 B).



**Figura 19. Imágenes representativas del sitio de inyección y las células trazadas en la corteza entorrinal medial. A, B.** Sitio de inyección del vector viral en la corteza entorrinal medial de un ratón control (A) y en condiciones de ejercicio (B). **C, D.** Población neuronal que expresa la proteína fluorescente mCherry (rojo) selectivamente en la corteza entorrinal medial en rebanadas de ratones control (C) y condición de ejercicio (D).

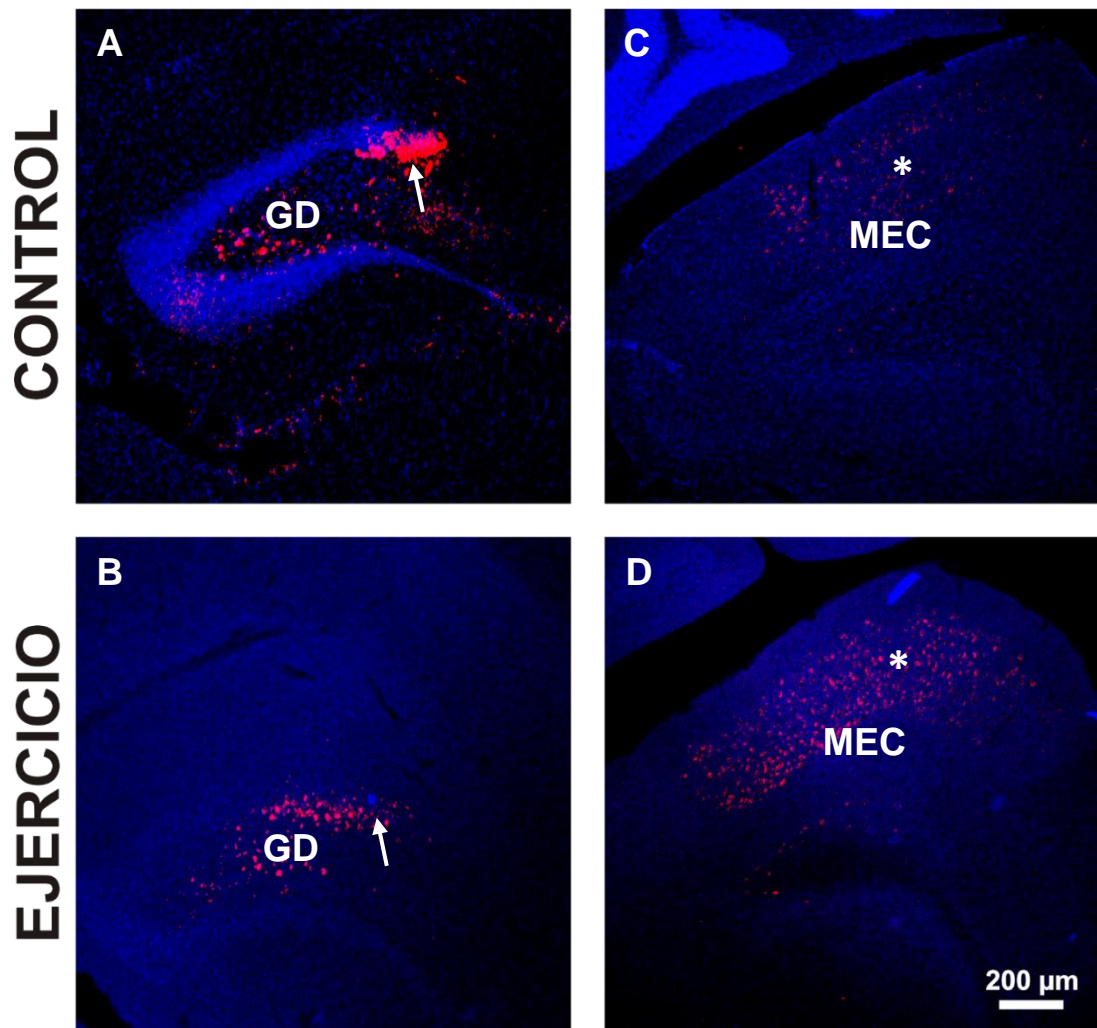
El trazado de las células de la corteza entorrinal medial, nos permitió observar las proyecciones axonales de estas células en la capa molecular media del giro dentado de ratones control (Figura 20 A, C) y en condición de ejercicio (Figura 20 B, D). Estos resultados sientan la base para futuros trabajos donde se podrá determinar la relación de las proyecciones terminales de la corteza entorrinal y la expresión postsináptica de la proteína PSD-95, permitiéndonos así determinar de manera selectiva los cambios en la conectividad de la corteza entorrinal y las células del giro dentado inducidos por el ejercicio.



**Figura 20. Imágenes representativas de la proyección de la corteza entorrinal medial hacia el giro dentado. A, B.** Proyecciones de las células trazadas en la corteza entorrinal medial hacia el giro dentado de un animal control (A) y en condiciones de ejercicio (B). **C, D.** proyecciones terminales de las neuronas piramidales de corteza entorrinal medial en condición de control (C) y ejercicio (D).

Como segunda estrategia para determinar cambios en la conectividad de la corteza entorrinal y el giro dentado, se utilizaron micropartículas de látex (Retrobeads) que viajan a través de los axones hacia los somas de las neuronas, lo que permite el marcaje retrógrado de las neuronas de las áreas que conectan con el área blanco, en este caso el giro dentado. Utilizando esta metodología en ratones control (n = 1) y en condición de ejercicio (n = 1) se logró la inyección del trazador retrógrado en el giro dentado dorsal y la observación de las células de la corteza entorrinal medial. En la Figura 21 se muestran fotomicrografías del sitio de inyección donde se observa la expresión de los retrobeads en el giro dentado dorsal (Figura 21 A, B) y las células de la corteza entorrinal medial que conectan con el giro dentado dorsal (Figura 21 C, D). Los resultados preliminares de esta técnica sugieren que 2 meses de ejercicio fortalece la conectividad de la corteza entorrinal medial hacia el giro dentado dorsal. Sin embargo, es necesario incrementar el número de muestras para determinar si la conectividad cambiándose modifica con el ejercicio.





**Figura 21. Imágenes representativas del sitio de inyección de los retrobeads en el giro dentado y su transporte retrógrado hacia la corteza entorrinal medial. A, B.** Sitios de inyección de retrobeads (marcados por flecha) en el giro dentado (GD) dorsal en condición control (A) y de ejercicio (B). **C, D.** Células trazadas (marcadas en asterisco) en la corteza entorrinal medial (MEC) en condición control (C) y ejercicio (D).

## VIII. DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que aunque los ratones se mantienen corriendo voluntariamente durante todo el estudio, los niveles de neurogénesis hipocampal no se mantienen elevados y regresan a sus niveles basales. Al analizar los posibles cambios en la conectividad de la corteza entorrinal hacia el giro dentado encontramos que 2 meses de ejercicio no modifican la densidad de partículas PSD-95 en la capa molecular del giro dentado a través del eje dorso-ventral, pero si incrementa el tamaño de éstas en el giro dentado ventral. Los resultados del análisis del número de partículas PSD-95 en la corteza entorrinal mostraron que la densidad de partículas PSD-95 disminuye en la corteza entorrinal lateral pero no en la medial. Adicionalmente, mostramos que las partículas PSD-95 de menor tamaño disminuyen en la corteza entorrinal lateral lo que coincide con la reducción en densidad de partículas en ésta área. Finalmente, estandarizamos las técnicas de trazado selectivo de las células de la corteza entorrinal con trazadores anterógrados rAAV-hSyn-mCherry y el trazador retrógrado retrobeads.

Durante los 2 meses del experimento, se registró la distancia recorrida (Km) por los ratones, lo cual nos indicó que éstos se mantienen corriendo por periodos largos de tiempo, lo cual coincide con múltiples estudios que han reportado que los ratones tanto jóvenes como de edad avanzada son capaces de mantenerse en estas condiciones por periodos cortos (1 mes) (Bono et al. 2006; van Praag et al. 2005; Vivar et al. 2016) y largos (5 meses) de tiempo (Marlatt et al. 2012; Cahill et al 2018).

Estudios en humanos han mostrado que el ejercicio puede controlar la ganancia de peso (Swift et al. 2014; Lee et al. 2010) e incrementar el volumen hipocampal (Erickson et al. 2011). Al analizar el efecto del ejercicio sobre los parámetros morfométricos corporales y cerebrales observamos que aunque 2 meses no reducen el peso corporal, 3 meses son suficientes para disminuir

significativamente la ganancia de peso. Es probable que en modelos animales se requiera de un periodo de tiempo mayor para observar el impacto del ejercicio en el peso corporal, como ha sido observado cuando los animales permanecen bajo condiciones de ejercicio durante periodos largos (10 semanas; Bradley et al. 2008). De hecho, se ha mostrado que si bien 2 meses de ejercicio no tienen un impacto en el peso corporal, éste modifica el porcentaje de masa magra (incluye músculos, huesos y órganos) con respecto a la grasa corporal en animales sujetos a ejercicio voluntario (Bradley et al. 2008), lo que sugiere que con 2 meses de ejercicio los cambios se den en la composición corporal y con 3 meses se pueden observar cambios en el peso corporal.

La relación entre el ejercicio y la neurogénesis hipocampal fue determinada desde 1997 cuando se demostró en roedores una asociación positiva entre el incremento de nuevas neuronas generadas en la zona subgranular del giro dentado y el ambiente enriquecido, que consiste en un ambiente con combinación compleja de estimulación social, cognitiva y física, (Kempermann et al. 1997; Voss et al. 2013), y de manera particular con el ejercicio voluntario que incrementa los niveles de neurogénesis neta impactando principalmente la etapa de proliferación celular (van Praag et al. 1999a). Sin embargo, la mayoría de los estudios que reflejan un aumento de la neurogénesis con el ejercicio se han analizado durante periodos cortos de ejercicio (1 mes; van Praag et al. 1999; Gage y van Praag 2002). De manera interesante, en nuestro laboratorio se demostró que 6 meses de ejercicio no mantienen elevados los niveles de neurogénesis (Jasso, 2017). Y en el presente estudio demostramos que 2 meses de ejercicio son suficientes para regresar la neurogénesis hipocampal a los niveles basales.

Una posible explicación a estos resultados, es que los ratones no se mantuvieran corriendo durante todo el periodo experimental. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los ratones se mantuvieron corriendo durante todo el periodo experimental con distancias similares a lo ya reportado en otros estudios (van Praag et al. 2005; Cahill et al 2018). Otra posible explicación es que el ejercicio a largo plazo induzca estrés y que esto impida un incremento sostenido de la neurogénesis. El estrés induce la liberación de corticoesteroides, y niveles altos de éste tienen un impacto negativo en la neurogénesis hipocampal (Mirescu y Gould, 2006). No obstante, Hare y colaboradores en 2013 mostraron que el ejercicio favorece la regulación de los niveles de corticoesteroides (Hare et al. 2013).

La otra posibilidad es que el incremento en la neurogénesis hipocampal sea transitorio. De hecho, se ha mostrado que la proliferación celular en el hipocampo se incrementa en un 50% 3 días después de realizar ejercicio manteniéndose hasta los 10 días, pero que el incremento no es sostenido regresando a los niveles basales 32 días después (Kronenberg et al. 2006). Como mostramos en este estudio, el regreso de la neurogénesis hipocampal a sus niveles basales se mantiene aun cuando el ejercicio se realice por un periodo igual o mayor a 2 meses. En conjunto, estos resultados refuerzan la hipótesis de que el ejercicio induce un incremento transitorio de la neurogénesis hipocampal.

Aunque los posibles mecanismos que expliquen porque la neurogénesis regresa a sus niveles basales después de periodos largos de ejercicio son desconocidos, existen distintas moléculas que pudieran estar involucradas en el incremento transitorio de la neurogénesis hipocampal. Se sabe que en condiciones control, la quimiocina CX3CL1 y la proteína Efrina-B2 juegan un papel en la regulación de la proliferación y supervivencia neuronal en el hipocampo adulto (Pérez-Domínguez et al. 2017). Adicionalmente, la sobreexpresión de factores que en condición de ejercicio inducen proliferación celular como el BDNF y serotonina y/o la activación de la vía de señalización Wnt también podrían estar involucrados (Pérez-

Domínguez et al. 2017). Se requerirán de futuras investigaciones para dilucidar los mecanismos implicados en la regulación transitoria de la neurogénesis hipocampal.

Por otra parte, se sabe que el ejercicio causa un incremento en los niveles de neurogénesis preferencialmente sobre el área dorsal del giro dentado (Tanti et al. 2012; Vivar et al. 2016), lo cual puede estar asociado a la diferencia funcional de estas áreas (Moser y Moser, 1998). Nuestros resultados mostraron que el ejercicio no modificaba la distribución de células BrdU<sup>+</sup> a través del eje dorso-ventral. Por lo que estos resultados refuerzan la hipótesis de que el ejercicio induce un incremento transitorio de la neurogénesis hipocampal.

Se sabe que el ejercicio tiene un efecto positivo en la mejora de las funciones cognitivas en modelos animales (van Praag et al. 1999b; Creer et al. 2010; Fordyce y Wehner 1993) y en humanos (Erickson et al. 2011; Voss et al. 2013). El efecto benéfico en la cognición se incrementa a medida que se incrementa el periodo de ejercicio (Berchtold et al. 2010; Colcombe y Kramer, 2003). Este efecto benéfico ha sido atribuido principalmente al incremento en la neurogénesis hipocampal. Sin embargo, nuestros resultados muestran que este incremento es transitorio. Por lo tanto, es posible que otros mecanismos, adicionales a la neurogénesis, como cambios en la plasticidad sináptica o conectividad neuronal estén mediando este efecto benéfico. De hecho, estudios han mostrado que 2 meses de ejercicio inducen un aumento en la densidad de espinas dendríticas (lo cual se asocia con cambios en conectividad) en áreas más allá del giro dentado, como la corteza entorrinal, la cual es la principal fuente de entrada de información al giro dentado del hipocampo (Stranahan et al. 2007; Canto et al. 2008). Nuestros resultados mostraron que dos meses de ejercicio inducen cambios en la conectividad de la corteza entorrinal y sus proyecciones hacia el giro dentado, medido a través de la expresión de la proteína PSD-95 en la capa molecular del giro dentado. La capa molecular del giro dentado es el área donde llegan las proyecciones



axonales de las células de la corteza entorrinal (Andersen et al. 2007; Canto et al. 2008).

Nuestros resultados mostraron que la densidad de partículas PSD-95 en las distintas áreas del giro dentado, se distribuyen homogéneamente a lo largo del eje dorso-ventral y que 2 meses de ejercicio no modifica la densidad de partículas pero si incrementa el número de partículas de mayor tamaño en la región ventral del giro dentado. Sin embargo, estudios previos han mostrado que la exposición a un ambiente enriquecido, el cual incluye una rueda de ejercicio, o la exposición solo a ejercicio por periodos cortos de tiempo (2 días a 1 mes) si incrementan la expresión de PSD-95 en el hipocampo (Rampon et al. 2000; Hu et al. 2009; Nithianantharajah et al. 2004). Es probable que el incremento de la expresión de PSD-95 en el hipocampo se dé solo en periodos cortos de ejercicio y que este regrese a sus niveles basales cuando el ejercicio es realizado durante periodos mayores a un mes, como lo mostraron nuestros resultados. De hecho, se ha mostrado que 6 meses de ejercicio voluntario no incrementa los niveles de expresión de PSD-95 (Revilla et al. 2014). En conjunto, estos resultados sugieren que el incremento en la expresión de PSD-95 podría ser transitorio. Un posible mecanismo encargado de regular los niveles de expresión en el giro dentado del hipocampo durante el ejercicio es la “plasticidad sináptica homeostática” que participa en la estabilización de la actividad y del circuito neuronal, después de que poblaciones neuronales son sometidas a un periodo de mayor actividad (Turrigiano 2012). Por lo tanto, es probable que durante periodos cortos de ejercicio, los niveles de expresión de PSD-95 se incrementen, sin embargo, el mismo sistema actúa y regula la expresión de esta proteína que tiene impacto sobre el número de receptores NMDA en la hendidura sináptica (Sheng, 2001).

Por otro lado, el análisis de la expresión de PSD-95 en la capa II de la corteza entorrinal lateral y medial, capa donde llegan las entradas somatosensoriales de distintas áreas corticales (Canto et al. 2008), mostraron

que 2 meses de ejercicio disminuyen la densidad de partículas PSD-95 y el número de éstas en rangos de menor tamaño en la corteza entorrinal lateral, sin producir cambios en la corteza entorrinal medial. Nuestros resultados establecen una relación entre el ejercicio y su efecto en los cambios de expresión de la proteína PSD-95 en la corteza entorrinal y sugieren que 2 meses de ejercicio podría estar modificando la entrada de información de múltiples áreas corticales como la corteza insular, perirrinal y frontal hacia la corteza entorrinal lateral y que esto a su vez puede tener un impacto sobre la información que esta área envía hacia el giro dentado del hipocampo, ya que la corteza entorrinal lateral es el área que establece mayor conexión con el giro dentado preferencialmente con la región dorsal (Canto et al. 2008).

Si bien los resultados anteriores nos permiten evidenciar cambios en la expresión de PSD-95 en la capa molecular del giro dentado y la corteza entorrinal, lo cual sugiere cambios en la conectividad neuronal de estas dos áreas, esto no nos permite determinar si estas modificaciones son debidas exclusivamente a los cambios en la conectividad de la corteza entorrinal o de otras áreas corticales. Existen herramientas moleculares que permiten el trazado selectivo de áreas cerebrales para determinar cambios específicos en áreas como la corteza entorrinal. Un ejemplo de eso son los vectores virales adenoasociados que se han utilizado ampliamente para el mapeo, monitoreo y manipulación de circuitos neurales, permitiendo el marcaje de poblaciones neuronales específicas (con la utilización de promotores) en regiones determinadas del cerebro. Además de permitir una transfección no toxica (Betley y Sternson, 2011). Por otra parte, también existen trazadores retrógrados “Retrobeads” que al ser inyectados de manera selectiva (al no difundir más allá del sitio de inyección) en un área blanco se transportan a través del axón (de las neuronas en el sitio de inyección) hacia los somas de neuronas que conecten con el área blanco (Katz y Iarovici, 1990). Por lo anterior, nos propusimos estandarizar una técnica que nos permitiera realizar un trazado selectivo de las neuronas de la corteza entorrinal. Para esto, utilizamos un vector viral (rAAV-hSyn-mCherry) que trazó selectivamente a la

población neuronal de la corteza entorrinal medial, además de trazar sus dendritas y axones terminales en la capa molecular media del giro dentado. Como una segunda estrategia, utilizamos el trazador retrógrado “Retrobeads” que nos permitió marcar los somas de neuronas de la corteza entorrinal medial que enviaban sus proyecciones hacia el giro dentado. En conjunto, estas técnicas nos permiten determinar cambios en la conectividad de corteza entorrinal hacia el giro dentado del hipocampo a través del trazado neuronal selectivo de las células de la corteza entorrinal.

## IX. CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que 2 meses de ejercicio son suficientes para regresar la neurogénesis a los niveles basales y que la distribución de las células BrdU<sup>+</sup> no se modifica con 2 meses de ejercicio reforzando la hipótesis de que el efecto del ejercicio sobre la neurogénesis hipocampal es transitorio. Por otra parte, podemos concluir que 2 meses de ejercicio no modifican la densidad de PSD-95 en el giro dentado pero si aumentan el número de partículas de mayor tamaño en la región ventral, esto sugiere que la expresión de PSD-95 puede ser regulada por el ejercicio y que su incremento podría ser transitorio. Sin embargo, en la corteza entorrinal lateral mostramos una disminución en la densidad de PSD-95 así como el número de partículas de menor rango de tamaño, lo cual puede estar asociado a cambios en la información de distintas áreas corticales que LEC recibe. Si bien el análisis de la expresión de PSD-95 en el giro dentado nos permitió determinar los cambios post-sinápticos, no nos permite determinar si el número de partículas de PSD-95 que cuantificamos en el giro dentado sea exclusivo de proyecciones que provienen de la corteza entorrinal, para lo cual, se realizó la estandarización de técnicas para el trazado selectivo de las neuronas de la corteza entorrinal.

## **X. PERSPECTIVAS**

Una vez que hemos estandarizado las técnicas para el trazado selectivo las perspectivas de este proyecto son realizar un análisis del número de proyecciones de la corteza entorrinal que llegan al giro dentado utilizando el virus rAAV-hSyn-mCherry y su co-localización con PSD-95 a 1 y 2 meses de ejercicio para determinar el curso temporal de los cambios en la conectividad de la corteza entorrinal hacia el hipocampo. Esto requerirá incrementar el número de animales con marcaje anterógrado (AAV-Syn-MCh) en la corteza entorrinal lateral y medial. Además, es necesario incrementar el número de animales con marcaje retrógrado (retrobeads) de giro dentado dorsal para ambas condiciones e incrementar el número de animales para el giro dentado ventral para determinar cambios en la conectividad de la corteza entorrinal hacia el giro dentado. Finalmente, es necesario cuantificar y clasificar el número de espinas de las células de la corteza entorrinal en condición control y de ejercicio ya que se sabe que la densidad dendrítica de áreas como la corteza entorrinal se modifica después de 2 meses de ejercicio.

## XI. Bibliografía

Itman J y GD Das. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*. 1965; 207(5000): 953–56.

Andersen, Per et al. 2007. *The Hippocampus Book*. Oxford Uni. New York.

Baiano M, C Perlini, Rambaldelli G, R Cerini, Dusi N, M Bellani, Spezzapria G, A Versace, Balestrieri M, R Pozzi Mucelli, Tansella M y P Brambilla. Decreased entorhinal cortex volumes in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2008; 102: 171–180.

Barnes DE y K Yaffe. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurology*. 2011; 10: 819–828.

Barnes JN. Exercise, cognitive function, and aging. *Advice Physiological education*. 2015; 39: 55-62.

Berchtold NC, N Castello y Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*. 2010; 167(3): 588–597.

Berry KP y E Nevidi. Spine dynamics: are they all the same?. *Neuron*. 2017; 96.

Betley N y M Scott. Sternsen adeno-associated viral vectors for mapping, monitoring, and manipulating neural circuits. *Human gene therapy*. 2011; 22: 669–677.

Bono JP, D Adlam, Paterson DJ y KM Channon. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *American Physiological Society*. 2006; 290: R926–R934.

Bradley RI, JY Jeon, Liu FF y MF Eleftheria. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008; 295: E586–E594.

Cahill SP, JD Cole, Yu RQ, J Clemans-Gibbon y Snyder JS. Differential effects of extended exercise and memantine treatment on adult neurogenesis in male and female rats. *Neuroscience*. 2018; 390: 241-255.

Canto CB, FG Wouterlood y Witter MP. What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us?. *Neural Plasticity*. 2008; 18p.

Colcombe S y AF Kramer. Fitness effects on the cognitive function of older adults: A Meta-Analytic Study. *American Psychological Society*. 2003; 14 (2): 125.

Creer DJ, C Romberg, Saksida LM, H van Praag y Bussey TJ. Running enhances spatial pattern separation in mice. *PNAS*. 2010; 107 (5): 2367–2372.

Dhikav, Vikas y Anand. Hippocampus in health and disease: an overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2012; 15(4): 239. <http://www.annals-ofian.org/text.asp?2012/15/4/239/104323>.

Du AT, N Schuff, Amend D, MP Laakso, Hsu YY, WJ Jagust, K Yaffe, Kramer JH, B Reed, Norman D, HC Chui y Weiner MW. Magnetic resonance imaging of the entorhinal cortex and hippocampus in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Neurological, Neurosurgery and Psychiatry*. 2001; 71:441–447.

Eadie B, V Redila y Christie BR. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *The journal of comparative neurology*. 2005; 486:39–47.

EI-Husseini A, E Schnell, DM Chetkovich, Nicoll RA y DS Bredt. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*. 2000; 290.

Erickson KI, CA Raji, Lopez OL, JT Becker, Rosano C, AB Newman, Gach HM, PM Thompson, Ho AJ y LH Kuller. Physical activity predicts gray matter volume in late adulthood. *Neurology*. 2010; 75(16): 1415–1422.

Erickson KI, MW Voss, Prakash RS, C Basak, Szabo A, L Chaddock, Kim JS, S Heo, Alves H, SM White, Wojcicki TR, E Mailey, Vieira VJ, SA Martin, Pence BD, JA Woods, McAuley E y AF Kramer. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *PNAS*. 2011; 108 (7) 3017–3022.

Fordyce DE y JM Wehner. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Research*. 1993; 619 (1993) 111-119.

Fyhn M, S Molden, Witter MP, EI Moser y Moser MB. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*. 2004; 305: 1258–1264. doi: 10.1126/science.1099901.

Gaarskjaer FB. Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. *Journal of comparative Neurology*. 1978; 178: 49-72.

Gage FH y H Van Praag. 2002. Neurogenesis in adult brain. In *neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, ed. Fred H. Gage And Henriette Van Praag. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott, Williams & Wilkins, 109–17.

Goldman JG, GT Stebbins, Bernard B, TR Stoub, Goetz CG y L de Toledo-Morrell. Entorhinal cortex atrophy differentiates parkinson's disease patients with and without dementia. *Movement Disorders*. 2012; 27 (6).

Harada CN, MC Natelson y Triebel K. Normal cognitive aging. *Clinical Geriatrics Medicine*. 2013; 29(4): 737–752. doi:10.1016/j.cger.2013.07.002.

Hare BD, JA Beierle, DJ Toufexis, Hammack SE y WA Falls. Exercise-associated changes in the corticosterone response to acute restraint stress: evidence for increased adrenal sensitivity and reduced corticosterone response duration. *Neuropsychopharmacology*. 2014; 39: 1262–1269.

Hiura M, T Nariai, Ishii K, M Sakata, K Oda, Toyohara J y K Ishiwata. Changes in cerebral blood flow during steady-state cycling exercise: a study using oxygen-15-labeled water with PET. *Journal Cerebral Blood Flow Metabolism*. 2014; 34: 389–396.

Hu S, Y Zhe, Gomez-Pinilla F y SA Frautschy. Exercise can increase small heat shock proteins (sHSP) and pre and post-synaptic proteins in the hippocampus. *Brain Research*. 2009; 1249: 191–201.

Huijbers W, EC Mormino, Wigman SE, AM Ward, Vannini P, DG McLaren, Becker JA, AP Shultz, Hedden T, KA Johnson y Sperling RA. Amyloid deposition is linked to aberrant entorhinal activity among cognitively normal older adults. *The Journal of Neuroscience*. 2014; 34(15):5200 –5210

Isshiki M, STanaka, Kuriu T, K Tabuchi, Takumi T y S Okabe. Enhanced synapse remodelling as a common phenotype in mouse models of autism. *Nature communications*. 2014; 5:4742.

Jasso F. Efecto del ejercicio a corto y a largo plazo en la neurogénesis hipocampal. 2017. Tesis de maestría.

Jinno S. Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse hippocampus: a stereology-based study using endogenous markers. *Hippocampus*. 2011; 21: 467-480.

Katz LC y DM Iarovici. Green fluorescent latex microspheres: a new retrograde tracer. *Neuroscience*. 1990; 34(2):511-20.



Kempermann G, G Kuhn y Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997; 336.

Kornau HC, LT Schenker, Kennedy MB y PH Seeburg. Domain interaction between nmda receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*. 1995; 269.

Kronenberg G, A Bick-Sander, Bunk E, C Wolf, Ehninger D y G Kempermann. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiology of Aging*. 2006; 27: 1505–1513.

Kuhn HG y CM Cooper-Kuhn. Bromodeoxyuridine and the detection of neurogenesis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2007; 8: 127-131.

Laurin D, R Verreault, Lindsay J, K MacPherson y Rockwood K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Archives of Neurology*. 2001; 58: 498-504.

Lee IM, L Djoussé, HD Sesso, Wang L y JE Buring. Physical activity and weight gain prevention. *JAMA*. 2010; 303(12):1173-9.

Marlatt MW, MC Potter, Lucassen PJ y H van Praag. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis and BDNF levels in female C57Bl/6J mice. *Developmental Neurobiology*. 2012; 72(6): 943–952.

Ming G y H Song. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011; 70.

Mirescu C y E Gould. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*. 2006; 16:233–238.

Moser MB y EI Moser. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*. 1998; 8: 608-619.

Neeper SA, F Gómez-Pinilla, Choi J y C Cotman. Exercise and brain neurotrophins. *Nature*. 1995; 373: p109.

Nithianantharajah J, H Levis y Murphy M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2004; 81: 200–210.

Palmer TD, AR Willhoite y Gage FH. Vascular Niche for Adult Hippocampal Neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*. 2000; 425(4): 479–94.

Paxinos G y K Franklin. Paxinos and franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. 2007. Academic Press. 4th Edition

Pereira AC, DE Huddleston, Brickman AM, AA Sosunov, Hen R, GM McKhann, Sloan R, FH Gage, Brown TR y SA Small. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *PNAS*. 2007; 104(13): 5638–5643.

Pérez-Domínguez M, LB Tovar-y-Romo y Zepeda A. Neuroinflammation and physical exercise as modulators of adult hippocampal neural precursor cell behavior. *Reviews in the Neurosciences*. 2017; 29: 1-20.

Prange O, TP Wong, Gerrow K, YT Wang y EI-Husseini A. A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *PNAS*. 2004; 101(3): 13915–13920.

Rampon C, CH Jiang, Dong H, YP Tang, Lockhart DJ, PG Schultz, Tsien JZ y Y Hu. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *PNAS*. 2000; 97(23): 12880–12884.

Revilla S, C Suñol, García-Mesa Y, L Giménez-Llort, Sanfeliu C y R Cristòfol. Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain. *Neuropharmacology*. 2014; 81: 55-63.

Sheng M. The postsynaptic NMDA-receptor–PSD-95 signaling complex in excitatory synapses of the brain. *Journal of cell science*. 2001; 114(7):1251.

Stranahan, Alexis M, D Khalil y E Gould. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*. 2007; 17(11): 1017–22.

Swift DL, NM Johannsen, Lavie CJ, Earnest CP y TS Church. The role of exercise and physical activity in weight loss and maintenance. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2014; 56(4): 441–447.

Tanti A, Q Rainer, Minier F, A Surget y Belzung C. Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Neuropharmacology*. 2012; 63: 374-384.

Toledo-Morell L, I Goncharova, Dickerson B, RS Wilson y Bennett DA. From healthy aging to early Alzheimer's disease: in vivo detection of entorhinal cortex atrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000; 911:240-53.

Turrigiano G. Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012; 4:a005736.

Van Praag, Kempermann G y FH Gage (a). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*. 1999; 2(3).

Van Praag H, BR Christie, Sejnowski TJ y FH Gage (b). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *PNAS*. 1999; 96 (23): 13427–13431.

Van Praag H, T Shubert, Chunmei Z y FH Gage. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of Neuroscience*. 2005; 25(38):8680–8685.

Vivar C, MC Potter, Choi J, J Lee, Stringer TP, EM Callaway, Gage FH, H Suh y van Praag H. Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nature communications*. 2012; 3: 1107.

Vivar C, BD Peterson y van Praag H. Running rewires the neuronal network of adult-born dentate granule cells. *NeuroImage*. 2016; 131: 29–41.

Voss MW, C Vivar, Kramer AF y H Van Praag. Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends in Cognitive Sciences*. 2013; 17(10): 525–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2013.08.001>

Whiteman AS, B.A., DE Young, Budson AE, CE Stern y Schon K. Entorhinal volume, aerobic fitness, and recognition memory in healthy young adults: a voxel-based morphometry study. *NeuroImage*. 2016; 126: 229–38.

Witter MP y DG Amaral. Hippocampal formation in the rat nervous system. 3, G. Paxinos, Ed., chapter 21, pp. 635–704, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 3rd edition, 2004.

Witter MP, TP Doan, Jacobsen B, ES Nilssen y Ohara S. Architecture of the entorhinal cortex a review of entorhinal anatomy in rodents with some comparative notes. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2017;11: 1–12.