



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Efecto del ejercicio a largo plazo sobre la
proliferación celular y la conectividad
dopaminérgica en el hipocampo”**

T E S I S

Que presenta

Enrique Vázquez Mendoza

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la Tesis:

Dra. María del Carmen Vivar Estudillo

Ciudad de México

Diciembre, 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por permitirme estudiar en esta gran institución, asimismo, a todos los profesores que fueron parte de esta formación académica.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría en el periodo de septiembre de 2016 a agosto de 2018.

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. María del Carmen Vivar Estudillo por todo el apoyo brindado para la elaboración de este proyecto de investigación, así como para mi formación académica y personal. Igualmente, mi agradecimiento a la M. en C. María del Socorro Islas Mendoza, por todo el apoyo metodológico en el laboratorio y el microscopio confocal, así como a Armando Sandoval Hernández, por su ayuda en el cuidado de animales y asistencia técnica. También agradezco a mis compañeras de laboratorio Marilyn, Carmen y Blanca por los buenos momentos que pasamos.

Asimismo, agradezco a mis sinodales, Dr. Jorge Aceves Ruíz y Dr. José Antonio Arias Montaña, por sus observaciones y recomendaciones para la mejor elaboración de este proyecto.

Finalmente, quiero agradecer profundamente a mis padres y hermano, así como a mis amigas Yess y Araceli y a mis amigos Alexis y José Antonio por todo el apoyo y ánimo que me han dado durante mucho tiempo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Ejercicio y el sistema nervioso central	4
2.2. El hipocampo en los procesos cognitivos y la regulación de las emociones	5
2.2.1. Estructura del hipocampo.....	5
2.2.2. El hipocampo y el ejercicio	8
2.2.3. El ejercicio y la neurogénesis hipocampal.....	8
2.3. El sistema dopaminérgico en el hipocampo.....	11
2.3.1. El sistema dopaminérgico en el hipocampo y los procesos cognitivos	13
2.3.2. El sistema dopaminérgico en el hipocampo y la regulación de las emociones	13
2.3.3. El efecto del ejercicio y dopamina en el hipocampo	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	
5.1. Objetivo general.....	16
5.2. Objetivos particulares	16
6. Materiales y métodos	
6.1. Animales y condiciones experimentales	16
6.2. Inyección de 5-bromo-2'-desoxiuridina	17
6.3. Perfusión.....	17
6.4. Inmunohistoquímica	

6.4.1. Determinación de la marca de BrdU.....	17
6.4.2. Expresión de la enzima tirosina hidroxilasa.....	18
6.4.2.1. Análisis de la densidad de fibras.....	18
6.5. Cirugía esterotáctica.....	20
6.6. Inmunofluorescencia.....	20
6.7. Análisis estadístico	21
7. RESULTADOS	
7.1. El ejercicio no modifica la ganancia de peso	22
7.2. El ejercicio no modifica las dimensiones del cerebro.....	23
7.3. Dos meses de ejercicio no mantienen elevados los niveles de proliferación celular.....	24
7.4. El nivel de proliferación celular es independiente de la distancia corrida	25
7.5. El ejercicio no modifica la densidad total de fibras TH ⁺ en el giro dentado	26
7.6. El ejercicio modifica la composición de densidad de fibras TH ⁺ de la cresta e hilus.....	28
7.7. Dos meses de ejercicio disminuyen la densidad de fibras TH ⁺ en el hilus de la región dorsal.....	29
7.8. El ejercicio previene la pérdida de fibras TH ⁺ inducida por el envejecimiento	31
7.9. Estandarización de las técnicas para evaluar la conectividad del área ventral tegmental hacia el giro dentado	36
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIÓN	50
10. PERSPECTIVAS	51
11. BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las capas del hipocampo y giro dentado.

Figura 2. Diagrama del circuito trisináptico del hipocampo.

Figura 3. Desarrollo de las nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo.

Figura 4. Esquema con los principales núcleos dopaminérgicos en el cerebro (A8-A16) con sus respectivas proyecciones.

Figura 5. Metodología para el análisis de la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado del hipocampo.

Figura 6. Dos meses de ejercicio voluntario no modificaron la ganancia de peso.

Figura 7. Los ratones se mantuvieron corriendo voluntario por dos meses.

Figura 8. Dos meses de ejercicio voluntario no modificaron los parámetros morfométricos del cerebro.

Figura 9. La proliferación celular regresa a sus niveles basales después de dos meses de ejercicio voluntario.

Figura 10. Fotomicrografías representativas del giro dentado del hipocampo a través del eje dorso-ventral, mostrando las fibras TH⁺, respectivamente, en animales de los grupos control y de ejercicio.

Figura 11. Dos meses de ejercicio no modifican la densidad total de fibras TH⁺ en el giro dentado.

Figura 12. Dos meses de ejercicio voluntario disminuyen la densidad de fibras TH⁺ en el hilus dorsal.

Figura 13. Diagrama de la densidad de fibras TH⁺ normalizada en animales control y de ejercicio a través del eje dorso-ventral.

Figura 14. Un mes de ejercicio incrementa la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado.

Figura 15. Tres meses de ejercicio incrementan la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado.

Figura 16. Tres meses de ejercicio previenen la pérdida de fibras TH⁺ inducida por el envejecimiento.

Figura 17. Las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (VTA) infectadas con pAAV-hSyn-mCherry inervan su principal blanco postsináptico, el núcleo accumbens.

Figura 18. El giro dentado recibe inervación dopaminérgica del área ventral tegmental (VTA).

Figura 19. Inyección de retrobeads en el giro dentado dorsal y ventral.

Figura 20. Imagen representativa de células trazadas retrógradamente desde el giro dentado.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt: proteína quinasa B	IGF: factor de crecimiento parecido a la insulina
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro	LTP: potenciación a largo plazo
BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina	M: medial
C: control	MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
CA: <i>Cornu Ammonis</i>	mRNA: ácido ribonucleico mensajero
CM I: capa molecular infrapiramidal	NMDA: N-metil-D-aspartado
CM S: capa molecular suprapiramidal	PNQ: progenitores neurales quiescentes
D: dorsal	PVA-DABCO: Alcohol de polivinilo 1,4-diazabicyclo-octano
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	Shh: Sonic hedgehog
DAT: transportador de dopamina	TBS: Tris-buffered saline (solución salina tamponada con Tris)
DNA: ácido desoxirribonucleico	TH: tirosina hidroxilasa
E: ejercicio	V: ventral
EC: corteza entorrinal	VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
EGF: factor de crecimiento epidérmico	VTA: área ventral tegmental
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos	
GSK: quinasa de glucógeno sintasa	
i.p.: intraperitoneal	

RESUMEN

Hasta el momento, no existen medicamentos que puedan detener o revertir el deterioro cognitivo inducido por el envejecimiento. Sin embargo, el ejercicio físico es una estrategia que mejora los procesos cognitivos y emocionales, la cual está relacionada con un incremento en la neurogénesis hipocampal (proliferación celular y sobrevivencia de las nuevas neuronas). Sin embargo, estudios en nuestro laboratorio muestran que 6 meses de ejercicio no mantienen el incremento en la neurogénesis. Así, estos resultados sugieren que mecanismos adicionales podrían participar en la mejora de los procesos cognitivos y emocionales. De hecho, se ha mostrado que un mes de ejercicio modifica la red neuronal de las nuevas neuronas, lo cual sugiere que cambios en la conectividad neuronal podrían participar en estas mejoras. Para dilucidar el mecanismo por el cual el ejercicio induce su efecto benéfico en la salud mental, el presente trabajo se enfocó en determinar el efecto de 2 meses de ejercicio en la proliferación celular y la conectividad neuronal, específicamente la conectividad dopaminérgica, en el giro dentado del hipocampo. Dopamina está implicada tanto en procesos cognitivos como emocionales, y se incrementa durante el ejercicio. Para ello se utilizaron ratones macho C57BL/6J de 4-6 semanas de edad, mantenidos en condición control o de ejercicio voluntario, en los cuales se inyectó BrdU (50 mg/Kg) para medir los niveles de proliferación tras 2 meses en sus respectivas condiciones. Para evaluar las modificaciones en la conectividad dopaminérgica se realizó una inmunohistoquímica contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y se cuantificó la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado. Los resultados mostraron que después de 2 meses de ejercicio los niveles de proliferación celular son similares al de los animales control, lo que sugiere que el incremento en la neurogénesis es transitorio. Adicionalmente, los resultados mostraron que la densidad de fibras TH⁺ en el hilus de la región dorsal disminuye significativamente con respecto al control. Sin embargo, esta disminución puede ser debida a modificaciones temporales en la conectividad dopaminérgica, ya que un mes de ejercicio incrementa la densidad de fibras TH⁺ y 3 meses de ejercicio previene su pérdida debido al envejecimiento. Estos resultados muestran la relevancia de estudiar los efectos del ejercicio más allá de la neurogénesis, lo cual permitirá entender la forma en que el ejercicio mejora la salud mental.

ABSTRACT

So far, there is no drug treatment stopping or reverting cognitive impairment induced by aging. However, physical exercise is a strategy that improves cognitive and emotional processes, improvement that has been related to the increment of hippocampal neurogenesis (including cell proliferation and new neurons survival). However, studies in our laboratory show that six months of exercise does not maintain the increment in neurogenesis. Thus, these results suggest that additional mechanisms may participate in the improvement of cognitive and emotional processes. Indeed, it has been shown one month of exercise modifies the neural network of the new neurons, suggesting changes in the neuronal connectivity may participate in this improvement. To elucidate the mechanism implicated in the improvement of mental health, we aim to determine the effect of two months of exercise on the cell proliferation and neuronal connectivity, specifically the dopaminergic connectivity, in the dentate gyrus. Dopamine is implied in both, cognitive and emotional, processes and is increased during exercise. We used male C57BL/6J mice, 4-6-week-old, individually housed under control or exercise conditions. Mice were injected with BrdU (50 mg/Kg/day, i.p.) to measure cell proliferation after two months in its respective conditions. To assess modification in dopaminergic connectivity, we performed immunohistochemistry against tyrosine hydroxylase (TH) and measured the TH⁺ fiber density in the dentate gyrus. Our results showed that after two months of exercise cell proliferation levels are similar to the controls, suggesting a transient increment of neurogenesis during exercise. Additionally, the results showed that two months of exercise decreases TH⁺ fiber density in the dorsal hilus. However, this reduction may be due to temporary modifications in the dopaminergic connectivity, as one month of exercise increases of TH⁺ fiber density and 3 months of exercise prevented the reduction of TH⁺ fiber density induced by aging. Together, these results show the relevance of study the effects of exercise beyond neurogenesis, which will allow us to understand the mechanism underlying the mental health benefits induced by exercise.

1. INTRODUCCIÓN

El ejercicio físico tiene efectos benéficos sobre la salud física de las personas, disminuyendo los problemas cardiacos, el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, la obesidad, entre otros (Penedo y Dahn, 2005). Adicionalmente, el ejercicio genera efectos benéficos en la salud mental, induciendo cambios neuroplásticos que favorecen el aprendizaje y memoria (Colcombe y Kramer, 2003), los estados emocionales, y evita la progresión o aparición de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, así como de demencias (Babyak *et al.*, 2000; Dishman *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2013).

La salud mental es un componente esencial del bienestar, permitiendo al individuo realizar sus habilidades como trabajar, contribuir a su comunidad, interactuar con otras personas y disfrutar de la vida. Este componente de la salud está determinado por múltiples factores sociales, psicológicos y biológicos (WHO, 2016). La Organización Mundial de la Salud estima que 1 de cada 4 personas en el mundo sufre de algún desorden mental (WHO, 2001), incluyendo la depresión, desorden afectivo bipolar, esquizofrenia, psicosis, demencias, autismo y enfermedad de Parkinson (WHO, 2017). Aunque la presencia de un declive en los procesos cognitivos con la vejez es común y normal, éste puede llegar a casos extremos como el deterioro cognitivo leve e incluso la enfermedad de Alzheimer o demencias, afectando así la salud mental y la calidad de vida del individuo (Harada *et al.*, 2013).

El principal tratamiento de los desórdenes mentales es la administración de fármacos; sin embargo, hasta el momento presentan la desventaja de alterar la química cerebral, así como provocar efectos secundarios que pueden dañar la salud y no ser administrables a cualquier persona (p. ej. a personas con problemas cardiacos; Cooney *et al.*, 2013).

Afortunadamente, dado el amplio beneficio del ejercicio ciertas agencias de salud en el mundo (p. ej. *Socialstyrelsen* en Suecia, *National Institute for Health and Clinical Excellence*, en Reino Unido y la *American Psychiatric Association* en Estados Unidos) han comenzado a dar un mayor énfasis al ejercicio físico como una

estrategia para el tratamiento de los desórdenes mentales y para prevenir el declive cognitivo inducido por la edad (Hallgren *et al.*, 2017). Sin embargo, aún no se han logrado determinar los mecanismos por los que el ejercicio induce dichos efectos benéficos, lo cual podría permitir la creación de tratamientos alternativos para aquellas personas con impedimentos motores y emocionales.

Si bien el efecto más notorio del ejercicio sobre el hipocampo es el aumento de la neurogénesis (van Praag *et al.*, 1999), estudios recientes del laboratorio han mostrado que el ejercicio a largo plazo (6 meses) no mantiene el mismo aumento de neurogénesis que se observa con el ejercicio de corto plazo (1 mes), sugiriendo que el mantenimiento de los efectos observados a largo plazo del ejercicio sobre la regulación emocional, así como de aprendizaje y memoria podrían deberse a otros factores como los cambios plásticos en la conectividad neuronal.

Uno de los sistemas muy poco explorados en el hipocampo y que podría tener un papel relevante durante el ejercicio es el sistema dopaminérgico, el cual está implicado tanto en procesos cognitivos como emocionales (Beaulieu *et al.*, 2015). En pacientes con la enfermedad de Parkinson, donde existe una pérdida de inervación dopaminérgica, además de los síntomas motores, es común la presencia de síntomas no motores como depresión y ansiedad, así como problemas cognitivos (Schrag y Taddei, 2017). Una estructura relevante en la regulación emocional y los procesos cognitivos que recibe inervación dopaminérgica, es el hipocampo (Höglinger *et al.*, 2014). Esta estructura es altamente influenciada por el ejercicio físico (van Praag, 2009), lo que sugiere que los efectos benéficos sobre la memoria y aprendizaje, así como la regulación de las emociones podrían estar mediados, en parte, por cambios en la conectividad dopaminérgica en el hipocampo.

Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del ejercicio a largo plazo (2 meses) en la proliferación celular y la conectividad dopaminérgica que llega al giro dentado, lo cual podría dar pauta a futuras investigaciones para generar terapias que reproduzcan el efecto del ejercicio físico en aquellas personas que no puedan realizar esta actividad. Nuestros resultados mostraron que dos meses de ejercicio no mantienen el incremento de la

proliferación celular, lo cual sugiere que el incremento en la neurogénesis durante el ejercicio es transitorio. Adicionalmente, nuestros resultados mostraron que dos meses de ejercicio disminuyen la densidad de fibras TH⁺ en el hilus dorsal. Sin embargo, esta disminución podría ser temporal, ya que resultados preliminares sugieren que un mes de ejercicio incrementa la densidad de fibras TH⁺ y tres meses de ejercicio previene la pérdida de fibras TH⁺ inducida por el envejecimiento.

2. ANTECEDENTES

Actualmente la población del mundo está en un proceso de envejecimiento, se estima que para 2050 el 22% de la población mundial tendrá una edad mayor a 60 años (WHO, 2018). El envejecimiento, es el resultado de la acumulación de daños a nivel celular y molecular; lo cual conlleva a una disminución gradual de las capacidades físicas y mentales (WHO, 2018). Hasta el momento no existe un tratamiento que detenga dicha disminución; sin embargo, el ejercicio físico ha demostrado tener un efecto benéfico sobre la salud física y mental, por lo cual se ha recomendado como un tratamiento para prevenir este deterioro (Hallgren *et al.*, 2017). No obstante, aún se desconocen los mecanismos mediante los cuales el ejercicio previene el deterioro de las funciones cognitivas y emocionales.

2.1. Ejercicio y el sistema nervioso central

Una propiedad del cerebro de los mamíferos es la neuroplasticidad, es decir, la capacidad de generar modificaciones a nivel de circuitos y neuronas individuales inducidos por cambios positivos (p. ej. aprendizaje y ejercicio) o negativos (p. ej. adicción) al nivel orgánico. Las formas más comunes de neuroplasticidad son cambios en expresión de receptores, arborización dendrítica, espinas dendríticas, sinaptogénesis y neurogénesis (Perederiy y Westbrook, 2013).

Mediante modificaciones neuroplásticas el ejercicio genera cambios sobre el sistema nervioso central. En general, el ejercicio incrementa el flujo sanguíneo cerebral, el metabolismo, factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), la galanina, los niveles de glucosa cerebral, así como la concentración de ciertos neurotransmisores (p. ej. serotonina y norepinefrina; Dishman *et al.*, 2005). Igualmente, el ejercicio promueve un aumento en la materia gris y blanca de diversas áreas, destacando el hipocampo (Gujral *et al.*, 2017), estructura donde el ejercicio físico aumenta la neurogénesis hipocámpal (van Praag *et al.*, 1999).

Dichos cambios se han propuesto como el posible mecanismo mediante el cual el ejercicio mejora los procesos cognitivos y la salud mental, previniendo y/o

deteniendo la progresión de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer, así como la depresión (Mello *et al.*, 2013).

2.2. El hipocampo en los procesos cognitivos y la regulación de las emociones

Los primeros estudios para determinar la función del hipocampo mostraron que éste está implicado en la memoria; su mal funcionamiento o lesiones conllevaban a amnesia (p. ej. Scoville y Milner, 1957). Con base a su conectividad, Papez (1937) propuso al hipocampo como un elemento del circuito de las emociones, lo que en conjunto sugirió que el hipocampo podría llevar a cabo estas dos funciones, los procesos de memoria y emocionales. De hecho, estudios recientes sugieren que el hipocampo no es una estructura homogénea y que puede dividirse en dorsal y ventral de acuerdo a sus características funcionales y de conectividad. Funcionalmente, el hipocampo dorsal está implicado en el aprendizaje y memoria, locomoción, movimientos de orientación, navegación, exploración y procesamiento visoespacial; mientras que la parte ventral está involucrada en regulación emocional, manejo del estrés y ansiedad, comportamiento motivado, miedo aprendido y función ejecutiva (Fanselow y Dong, 2010; O'leary y Cryan, 2014). En cuanto a su conectividad básica ésta es similar a lo largo del eje dorso-ventral del hipocampo, sin embargo, la conectividad con estructuras extrahipocampales difiere, el hipocampo dorsal recibe mayormente información sensorial polimodal de distintas áreas corticales, mientras que el hipocampo ventral es innervado por estructuras como la amígdala, núcleos mesencefálicos y del tallo cerebral (Bannerman *et al.*, 2014).

2.2.1. Estructura del hipocampo

El hipocampo es una estructura del sistema nervioso central conformada de dos elementos, *Cornu Ammonis* (CA1, CA2 y CA3) y el giro dentado, ambas estructuras implicadas en el aprendizaje y memoria, así como en la regulación emocional (Hennerici, 2014). Cada una de las regiones CA1, CA2 y CA3 se divide en 4 capas (Fig. 1): *Stratum lacunosum-moleculare* (en ocasiones dividido en *stratum moleculare* y *stratum lacunosum*), el cual recibe aferentes principalmente

de la corteza entorrinal. El *stratum radiatum*, que contiene las conexiones asociativas (CA3-CA3) y las colaterales de Schaffer (CA3-CA1). El *stratum pyramidale*, comprende las células piramidales y el *stratum oriens*, contiene las dendritas basales de las células piramidales y varias clases de interneuronas. El área CA3 tiene una capa adicional, el *stratum lucidum*, localizada superiormente al *stratum pyramidale*, donde corren las fibras musgosas (Amaral y Lavenex, 2007). El giro dentado se compone de tres capas (Fig. 1): capa granular, la cual contiene los somas de las neuronas granulares, el hilus, que contiene a las células musgosas e interneuronas y por el cual corren los axones de las células granulares, llamados fibras musgosas, y la capa molecular, donde se localizan las dendritas de las células granulares (Amaral *et al.*, 2007).

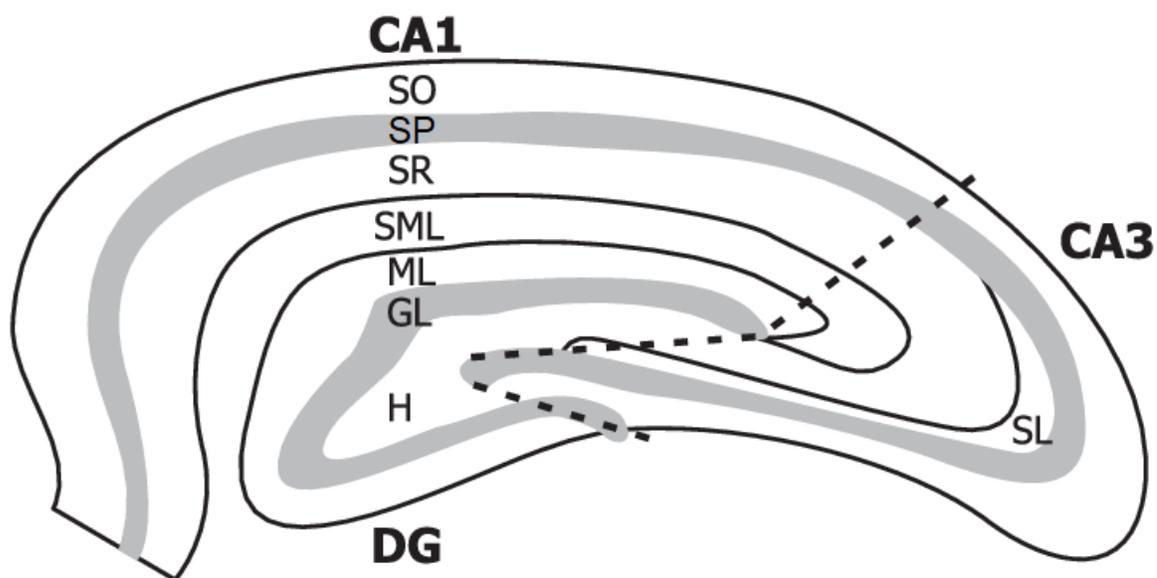


Figura 1. Representación esquemática de las capas del hipocampo y del giro dentado. Capas del Cornu Ammonis (CA): *Stratum laconosum-moleculare* (SML), *Stratum radiatum* (SR), *Stratum pyramidale* (SP), *Stratum oriens* (SO), *Stratum lucidum* (SL). Capas del giro dentado (DG): capa molecular (ML), capa granular (GL) y hilus (H). Modificada de Jiang y Swann (1997).

El circuito principal del hipocampo es trisináptico, el cual forma un circuito glutamatérgico unidireccional que inicia en la capa II de la corteza entorrinal (EC), que envía información espacial (EC medial) y de contexto (EC lateral) hacia el giro dentado a través de la vía perforante (medial y distal, respectivamente). El giro dentado a su vez envía información al área CA3 vía las fibras musgosas, de ahí se

2.2.2. El hipocampo y el ejercicio

Como se mencionó anteriormente, el ejercicio puede inducir modificaciones al cerebro a través de cambios neuroplásticos. Estudios en humanos muestran que el ejercicio físico aumenta el volumen de hipocampo (Gujral *et al.*, 2017), el cual está asociado con el incremento en los niveles séricos de BDNF (Erickson *et al.*, 2011), inducido por el ejercicio regular (Szuhany *et al.*, 2014). Además, en modelos animales el ejercicio incrementa los niveles de BDNF en el hipocampo, el cual está relacionado con cambios en la plasticidad neuronal, mediando la expresión de sinapsina, proteína involucrada en el mantenimiento y formación de sinapsis, la liberación de neurotransmisores y la elongación axonal (Vaynman *et al.*, 2004). Asimismo, el ejercicio promueve una mayor potenciación a largo plazo (LTP) en el giro dentado, relacionada con un aumento en la expresión del receptor a glutamato *N*-metil-D-aspartado (NMDA) tipo NR2B (van Praag, 2009). Adicionalmente, el ejercicio aumenta la densidad de espinas dendríticas en el giro dentado, el área CA1 y la capa III de la corteza entorrinal (Stranahan *et al.*, 2007), así como los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual induce un aumento en la proliferación de células endoteliales y de angiogénesis (van Praag, 2009).

2.2.3. El ejercicio y la neurogénesis hipocampal

Una característica relevante del hipocampo de los mamíferos, y específicamente del giro dentado, es su capacidad de seguir generando neuronas durante toda la vida, proceso denominado neurogénesis del cerebro adulto (Gage y van Praag, 2002). La neurogénesis de la zona subgranular (SGZ) del giro dentado da como resultado neuronas granulares.

El proceso neurogénico comprende tres estadios: proliferación, diferenciación y maduración, con dos periodos críticos para la sobrevivencia celular, uno entre la proliferación y la diferenciación, y otro entre la diferenciación y la maduración. El estadio de proliferación comprende a los progenitores neurales quiescentes (PNQ), los cuales generan por división asimétrica a progenitores neurales de amplificación, que presentan una alta tasa de proliferación. Éstos a su

vez mediante división asimétrica dan origen a los neuroblastos tipo 1, iniciando el estadio de diferenciación. Posteriormente, los neuroblastos tipo 1 comienzan a migrar hacia la capa granular, donde se convierten en neuroblastos tipo 2 y a continuación hacia neuronas inmaduras, comenzando aquí el estadio de maduración y finalmente, llegando a neuronas granulares maduras. El proceso neurogénico desde que una célula PNQ es activada hasta alcanzar su estado de madurez tarda aproximadamente 30 días (Fig. 3; Ming y Song, 2011).

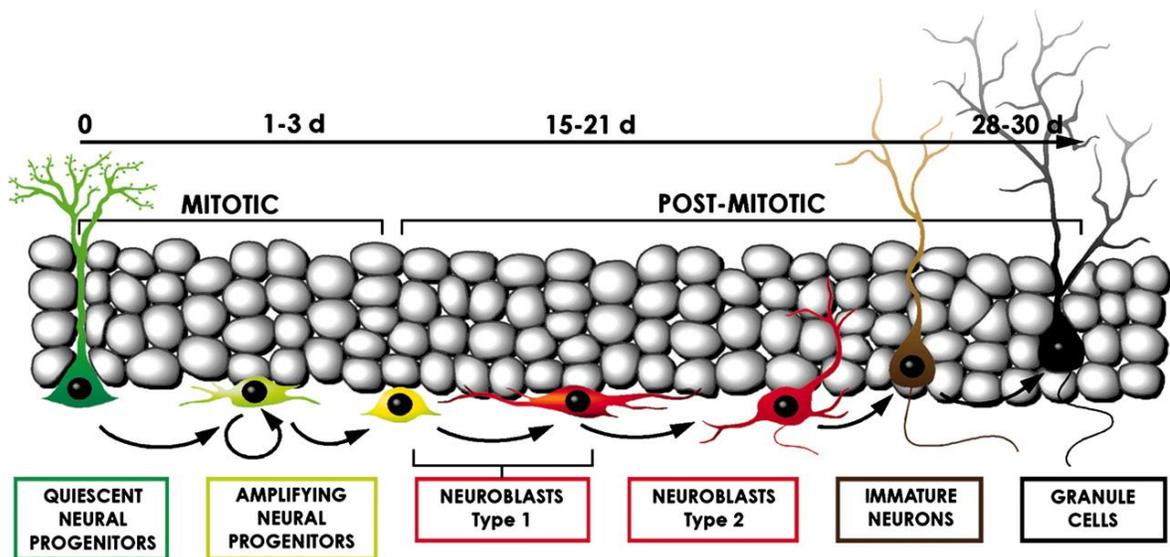


Figura 3. Desarrollo de las nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo. Tomado de Encinas *et al.* (2006).

Dada la división funcional que presenta el hipocampo, no es de extrañar que las nuevas neuronas generadas en el giro dentado también ejerzan funciones e incluso presenten características diferentes. Las nuevas neuronas del giro dentado ventral presentan una maduración más lenta, comparada con las del giro dentado dorsal, asimismo, las nuevas neuronas del giro dentado ventral son más susceptibles al estrés. Adicionalmente, la densidad de nuevas neuronas es mayor en el giro dentado dorsal y con la edad existe una mayor disminución de neurogénesis en la parte ventral (O’Leary y Cryan, 2014).

En cuanto a la función de la neurogénesis en el giro dentado dorsal, las nuevas neuronas están implicadas en algunas formas de aprendizaje dependientes del hipocampo, como miedo condicionado, memoria espacial a largo plazo y

memoria de trabajo (Sahay y Hen, 2007). En cambio, la neurogénesis del giro dentado ventral está implicada en la regulación de las emociones. Uno de los mecanismos propuestos para la acción de los antidepresivos es el incremento de nuevas neuronas, que sucede, principalmente, en el giro dentado ventral (Malberg *et al.*, 2000; Sahay y Hen, 2007; Kheirbek y Hen, 2011; Zhou *et al.*, 2016).

La neurogénesis en el giro dentado es un proceso altamente modulado por factores externos e internos. El ejercicio es un factor externo que modula positivamente este proceso. La primera evidencia fue presentada por van Praag y colaboradores (1999), en la cual mostraron que la neurogénesis hipocampal incrementa en animales que tuvieron libre acceso a una rueda para correr. Diferentes estudios han mostrado que el ejercicio influye en cada fase de la neurogénesis, incrementando los niveles de proliferación, sobrevivencia y favoreciendo el fenotipo neuronal (Vivar *et al.*, 2013). Al hacer un análisis del incremento de la neurogénesis por el ejercicio a través del eje dorso-ventral, Vivar y colaboradores (2016) mostraron que el incremento en la neurogénesis ocurre, principalmente, en la región dorsal del giro dentado, mientras que el número de nuevas neuronas en la región ventral no se modifica, lo que ha sugerido que el efecto del ejercicio sobre la regulación emocional, regulado en la parte ventral del giro dentado, podría deberse a cambios en la plasticidad sináptica o la conectividad neuronal, más que un incremento en el número de nuevas neuronas en esta región.

Por otra parte, el ejercicio produce diversos cambios que pueden contribuir al efecto benéfico sobre el aprendizaje y memoria, así como en la regulación emocional. Análisis genómicos y proteómicos del hipocampo completo han mostrado que 1-3 semanas de ejercicio inducen o aumentan la presencia de genes y proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica, como proteínas sinápticas, del citoesqueleto y chaperonas (Tong *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2006), sugiriendo que el ejercicio además de favorecer la generación de nuevas neuronas, induce otros cambios en éstas y otras neuronas (las generadas durante el desarrollo embrionario), así como en su conectividad.

De hecho, el ejercicio modifica la conectividad neuronal sobre las nuevas neuronas del hipocampo. Utilizando el virus de la rabia como trazador trans-sináptico, se mostró que 1 mes de ejercicio modifica significativamente la conectividad que reciben las nuevas neuronas, aumentando principalmente la inervación de la corteza entorrinal medial y de los núcleos mamilar medial y supramamilar y en menor medida la del septum medial, banda diagonal de Broca y de la corteza entorrinal lateral (Vivar *et al.*, 2016). De éste y otros estudios se ha mostrado que diferentes sistemas de neurotransmisores se ven modificados en el hipocampo con el ejercicio, incluyendo el sistema glutamatérgico, GABAérgico, colinérgico y serotoninérgico (Vivar y van Praag, 2017). Si bien el sistema dopaminérgico está relacionado con procesos cognitivos y emocionales, hasta el momento no se han evaluado los posibles cambios del sistema dopaminérgico en el hipocampo durante el ejercicio, donde podría jugar un papel relevante en la mejora cognitiva y emocional inducida por el ejercicio. Evidencias hasta el momento muestran que la concentración de dopamina se incrementa en el cerebro completo y el estriado durante el ejercicio y aumenta el mRNA de tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental (de Castro y Duncan, 1985; Gerecke *et al.*, 2010; Greenwood *et al.*, 2011).

2.3. El sistema dopaminérgico en el hipocampo

El principal grupo de neurotransmisores implicados en la modulación del estado de ánimo, así como del aprendizaje son las monoaminas, que comprende a las catecolaminas (dopamina, norepinefrina y epinefrina) e indolamina (serotonina). Las catecolaminas son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina, en una reacción secuencial: de tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA) mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH), de DOPA a dopamina por la descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (AADC), de dopamina a norepinefrina (noradrenalina) a través de la dopamina- β -hidroxilasa y finalmente, de norepinefrina a epinefrina (adrenalina) mediante la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT; Nestler *et al.*, 2009).

En el sistema nervioso central, la dopamina se produce mayormente en nueve núcleos (A8-A16; Fig. 4; Björklund y Dunnett, 2007). La formación hipocampal

recibe aferencias particularmente del campo retrorubral (RRF, A8), la *substantia nigra pars compacta* (SNpc, A9) y el área ventral tegmental (VTA, A10). Específicamente, el giro dentado recibe inervación del VTA y en menor medida de la SNpc, preferencialmente en la región ventral, en la capa molecular interna de la hoja superior e hilus del giro dentado (Höglinger *et al.*, 2014).

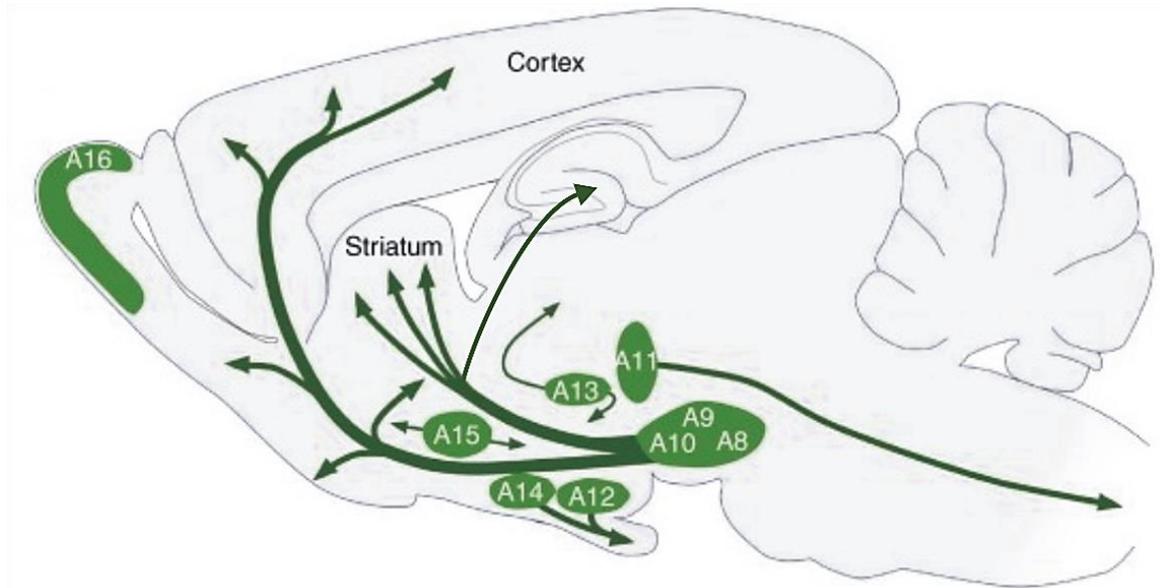


Figura 4. Esquema con los principales núcleos dopaminérgicos en el cerebro (A8-A16) con sus respectivas proyecciones. Modificado de Björklund y Dunnett (2007).

Las funciones atribuidas a dopamina, como movimiento voluntario, recompensa, regulación del sueño, apetito, afecto, atención, función cognitiva, olfacción, visión, regulación hormonal, entre otras, son mediadas por sus 5 receptores acoplados a proteínas G, clasificados en dos familias de acuerdo al tipo de proteína G, D1-like (D1 y D5; $G\alpha_{s/olf}$) y D2-like (D2, D3 y D4; $G\alpha_{i/o}$). Sin embargo, éstos también pueden formar heterodímeros entre ellos (p. ej. D1-D2, D2-D3, D2-D4) o heterómeros con otros receptores (NMDA, adenosina, ghrelina, etc.), generando una mayor diversidad de sitios de acción para dopamina (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Beaulieu *et al.*, 2015). En el giro dentado se puede encontrar el mRNA de los cinco receptores dopaminérgicos, aunque con mayor expresión de los receptores tipo D1 y D5 (Mu *et al.*, 2011). Específicamente los receptores D1-like se encuentran principalmente en células granulares y algunas interneuronas de la

capa molecular e hilus; mientras que los receptores D2-like se encuentran principalmente en células musgosas (Gangarossa *et al.*, 2012).

Posterior a su acción en los receptores, la dopamina es transportada del espacio extracelular hacia el citosol mediante el transportador de dopamina (DAT) y una vez ahí ésta puede reincorporarse a vesículas de neurotransmisión a través del transportador vesicular de monoaminas (VMAT) o degradarse mediante las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y catecol-O-metiltransferasa (COMT; Nestler *et al.*, 2009).

2.3.1. El sistema dopaminérgico en el hipocampo y los procesos cognitivos

Una función del hipocampo es la formación de memorias episódicas. Se ha descrito que para que un evento sea almacenado a largo plazo debe haber liberación de dopamina en el hipocampo cerca del tiempo de codificación, pues ésta activa a los receptores D1-like (O'Carroll *et al.*, 2006; Bethus *et al.*, 2010), los cuales modulan la LTP, sugerido como el proceso fisiológico del aprendizaje, en la región de CA1 (Granado *et al.*, 2008). Otro efecto de la dopamina en el hipocampo es servir como modulador de la entrada glutamatérgica de la EC lateral (información contextual) hacia el giro dentado y CA1 (Ito y Schuman, 2012), lo cual se sugirió permite almacenar preferencialmente aquella información que sea más relevante.

2.3.2. El sistema dopaminérgico en el hipocampo y la regulación de emociones

La regulación de las emociones por parte de hipocampo ha sido menos estudiada. Se ha demostrado que la eliminación de neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) disminuye la inervación dopaminérgica y la neurogénesis en el giro dentado (Höglinger *et al.*, 2004), principalmente en la porción ventral. Esta disminución correlaciona con un mayor tiempo de inmovilidad en pruebas de nado forzado y suspensión de cola, sugiriendo un estado similar a la depresión (Zhang *et al.*, 2016). De manera similar, en pacientes con enfermedad de Parkinson, donde hay una

pérdida de la inervación dopaminérgica, también se presentan casos de depresión y ansiedad (Schrag y Taddei, 2017).

2.3.2.1. El efecto del ejercicio y dopamina en el hipocampo

Si bien, se ha mostrado que dopamina participa en los procesos cognitivos y emocionales y que su concentración en el cerebro completo incrementa durante el ejercicio, fueron Klein y colaboradores (2016) quienes, utilizando dos protocolos de ejercicio voluntario, corto (10 días) y largo plazo (28 días), encontraron que, en el hipocampo, el ejercicio a corto plazo no afecta la concentración de dopamina, pero sí aumenta su metabolismo. Sin embargo, el ejercicio a largo plazo no induce cambios en la concentración ni en el metabolismo. En ninguno de los dos periodos de ejercicio se indujo un aumento en la expresión de los receptores D1, D2 o D5. Estos datos sugirieron que debido al incremento en el metabolismo de dopamina el ejercicio a corto plazo podría inducir una mayor liberación de dopamina, la cual estaría siendo rápidamente recapturada por las neuronas presinápticas, donde una parte es degradada y otra concentrada nuevamente en las vesículas, optimizándose la sinapsis dopaminérgica, la cual podría estar involucrada en la mejora en procesos cognitivos y emocionales. Sin embargo, dado que el ejercicio a un mes no induce cambios en la concentración de dopamina en el hipocampo y no aumenta la neurogénesis en la parte ventral (Vivar *et al.*, 2016), se sugiere que el efecto sobre la modulación de las emociones, así como la mejora en la memoria y aprendizaje observada con tiempos mayores de ejercicio podría implicar otras formas de neuroplasticidad, como cambios en la conectividad de los núcleos dopaminérgicos hacia el giro dentado.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ejercicio aeróbico produce una serie de efectos benéficos sobre la salud física y mental, sobre todo en procesos cognitivos, mejorando la memoria y el aprendizaje, y procesos emocionales, previniendo o revirtiendo ciertos desórdenes mentales, como depresión, enfermedad de Parkinson y de Alzheimer. Una de las áreas mayormente influenciadas por el ejercicio es el hipocampo, donde un mes de ejercicio aumenta la neurogénesis. Trabajos en el laboratorio han mostrado que 6 meses de ejercicio no mantienen elevados los niveles de neurogénesis. Sin embargo, mientras mayor tiempo sea el periodo de ejercicio, mayores son los efectos benéficos en los procesos cognitivos y emocionales. Por lo tanto, esto sugiere que podrían ser otros los mecanismos, adicionales al incremento de la neurogénesis, los involucrados en inducir los efectos benéficos del ejercicio sobre la salud mental. Estos mecanismos podrían implicar cambios en la plasticidad sináptica y la conectividad neuronal que recibe el hipocampo. Destacando el sistema dopaminérgico, el cual está implicado en los procesos cognitivos y emocionales y más aún su concentración incrementa por el ejercicio, lo que apoya la idea de que el sistema dopaminérgico podría estar participando en la mejora cognitiva y emocional inducida por el ejercicio.

Es por ello que el presente proyecto de investigación está enfocado a determinar el efecto que 2 meses de ejercicio voluntario tienen sobre la proliferación celular y la inervación dopaminérgica hacia el giro dentado a través del eje dorso-ventral. Esto nos permitirá determinar el curso temporal de los cambios en los niveles de proliferación celular y conectividad dopaminérgica en el giro dentado para dilucidar los mecanismos por lo que el ejercicio induce sus efectos benéficos en el cerebro.

4. HIPÓTESIS

Dos meses de ejercicio voluntario no mantienen el incremento de proliferación celular y modifican la conectividad dopaminérgica hacia el giro dentado.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar el efecto de dos meses de ejercicio voluntario sobre la proliferación celular y la conectividad dopaminérgica en el giro dentado a través del eje dorso-ventral.

5.2. Objetivos particulares

- 1) Evaluar el efecto de dos meses de ejercicio voluntario sobre la proliferación celular del giro dentado.
- 2) Determinar si dos meses de ejercicio voluntario cambian la densidad de fibras dopaminérgicas (TH⁺) en el giro dentado a través del eje dorso-ventral.
- 3) Establecer técnicas que permitan el marcaje selectivo de la inervación dopaminérgica del área ventral tegmental hacia el giro dentado.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron 24 ratones machos de 4-6 semanas de edad de la cepa C57BL/6J, asignados aleatoriamente a los grupos control (C, n = 11) o de ejercicio voluntario (E, n = 13). Todos los ratones fueron individualmente alojados durante 2 meses en una caja Super Mouse 750 con acceso al agua y alimento *ad libitum*, con un ciclo luz/oscuridad de 12/12 h (encendido de luces a las 6:00 h). Las cajas de los ratones del grupo E tuvieron, adicionalmente, una rueda de ejercicio (diámetro 12.5 cm) acoplada a un odómetro digital para registrar la distancia y velocidad. De todos los animales se realizó la medición de los parámetros morfométricos de peso corporal al inicio y final del protocolo. Se determinó la ganancia de peso (calculada

como la diferencia del peso inicial y final). De manera análoga se midieron los siguientes parámetros de los cerebros: peso, longitud y ancho.

6.2. Inyección de 5-bromo-2'-desoxiuridina

Dos meses después de iniciar los protocolos experimentales (C, n = 4; E, n = 5) se inyectó 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU a una dosis de 50 mg/Kg) de forma intraperitoneal (i.p.), cada 24 horas durante los últimos cinco días del protocolo a todos los ratones.

6.3. Perfusión

Al final del protocolo de dos meses en sus respectivas condiciones, los animales fueron anestesiados y perfundidos con solución salina al 0.9%, seguida de paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M. Los cerebros fueron extraídos, post-fijados en solución de PFA al 4% durante 24 horas y posteriormente crioprotegidos con solución de sacarosa al 30% en buffer de fosfatos 0.1 M. Estos cerebros fueron cortados en un micrótopo de deslizamiento (Leica SM2010 R), de manera coronal con un grosor de 40 µm. Los cortes fueron almacenados a 4 °C en cajas multipozos con una solución salina tamponada con Tris (TBS) 1X estéril.

6.4. Inmunohistoquímica

6.4.1. Determinación de la marca de BrdU

Para cuantificar el número de células que incorporaron BrdU (BrdU⁺) se procesó una serie 1:6 de secciones equidistantes de 240 µm utilizando el anticuerpo primario de rata anti-BrdU (1:200; Accurate Chemical) y el anticuerpo secundario de burro anti-rata biotinilado (1:250 Jackson ImmunoResearch), usando el método de peroxidasa (sistema ABC, Vector Laboratories) y 3,3'-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) como cromógeno. De estas muestras se adquirieron fotomicrografías digitales en campo claro del hemisferio completo (4X) y del giro dentado (10X). De las fotomicrografías obtenidas se realizó la reconstrucción del hemisferio y del giro dentado, con el programa CorelDraw X4 (Corel, Ontario, Canadá). Las imágenes obtenidas fueron pareadas con el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos (2007) para determinar el nivel dorso-ventral de cada una de las rebanadas de

acuerdo a Snyder y colaboradores (2012). Las regiones dorsal, media y ventral del hipocampo fueron delimitadas como sigue (respecto a Bregma): región dorsal: entre -0.94 y -1.94 mm; región media: entre -2.06 y -2.7 mm y región ventral: entre -2.8 y -4.04 mm. En las imágenes del giro dentado se realizó el conteo de las células BrdU⁺, determinadas como puntos café-negro que se encontraban en la zona subgranular (definida como el área entre la capa granular y el hilus, con un grosor de 2 células granulares a partir del borde de la capa granular) utilizando el software ImageJ (v. 1.52g, National Institutes of Health, E. U. A.). El número de células BrdU⁺ cuantificado fue multiplicado por 6.

6.4.2. Expresión de la enzima tirosina hidroxilasa

Para determinar la densidad de fibras tirosina hidroxilasa (TH⁺) se procesó una serie 1:6 de secciones equidistantes de 240 µm utilizando el anticuerpo primario de conejo anti-TH (1:500; Millipore) y el anticuerpo secundario de burro anti-rata biotinilado (1:200; Jackson ImmunoResearch). El tejido fue procesado mediante el método de peroxidasa (sistema ABC, Vector Laboratories) con y 3,3'-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) como cromógeno. Se obtuvieron fotomicrografías en campo claro del hemisferio completo (4X) y del giro dentado (10X). De las fotografías obtenidas se realizó la reconstrucción del hemisferio y del giro dentado con el programa CorelDraw X4 (Corel, Ontario, Canadá). Las imágenes obtenidas fueron pareadas con el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos (2007) para determinar el nivel dorso-ventral de cada una de las rebanadas.

6.4.2.1. Análisis de la densidad de fibras

Para evaluar la densidad de fibras dopaminérgicas (TH⁺) se tomaron dos cortes representativos del nivel dorsal (-1.46 y -1.82 mm, respecto a Bregma), medial (-2.18 y -2.54 mm, respecto a Bregma) y ventral (-3.08 y -3.52 mm, respecto a Bregma). Las fotomicrografías del giro dentado (Fig. 5A) fueron procesadas con el programa ImageJ (v. 1.52g, National Institutes of Health, E. U. A.), utilizando el plugin Trainable Weka Segmentation (v. 3.2.28, The University of Waikato Hamilton, Nueva Zelanda) para identificar exclusivamente las fibras TH⁺ (Fig. 5B y C). Posteriormente se determinó la densidad de fibras TH⁺ como el porcentaje del área

ocupada por las fibras en una región de interés (ROI) de $10000 \mu\text{m}^2$ (Fig. 5C). Las mediciones se realizaron por duplicado en la capa molecular interna y externa, tanto supra- como infrapiramidal (con un duplicado), la cresta, el hilus y la zona subgranular (supra- e infrapiramidal) (Fig. 5D).

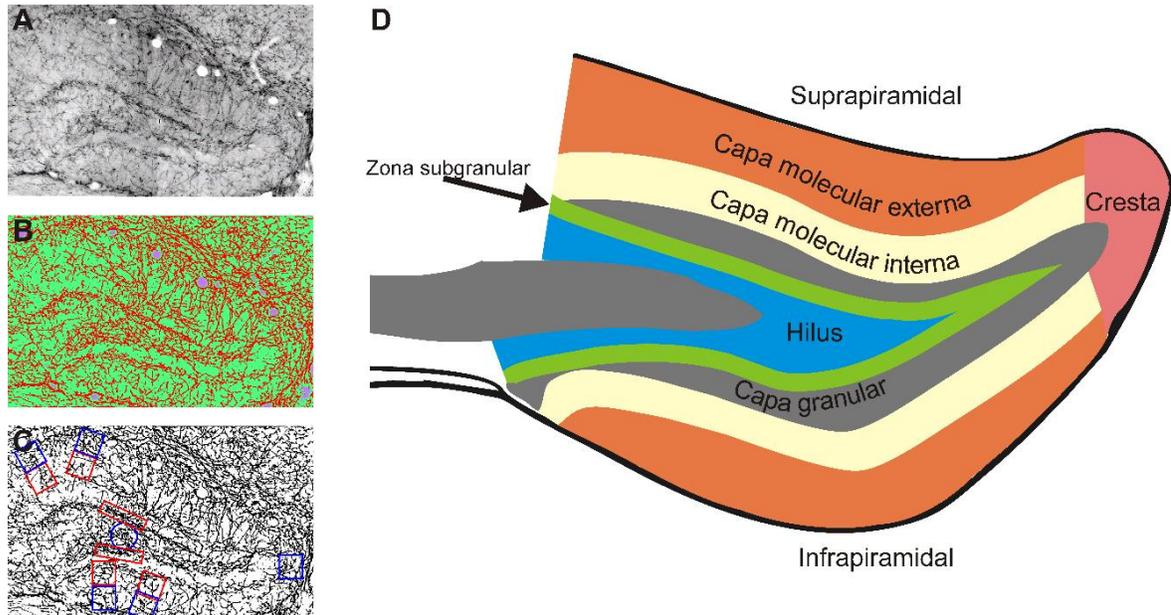


Figura 5. Metodología para el análisis de la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado del hipocampo. **A)** Fotomicrografía representativa del giro dentado donde se observan las fibras TH⁺. **B)** Imagen segmentada de A, obtenida con el plugin Trainable Weka Segmentation, donde se observan las fibras TH⁺ en rojo. **C)** Imagen que muestra exclusivamente las fibras TH⁺ y los distintos ROI para medir la densidad de fibras en las distintas capas **D)** Esquema del giro dentado donde se muestran las diferentes capas analizadas.

A partir de los promedios de la densidad de fibras TH⁺ de las capas del giro dentado, se realizaron esquemas de la densidad de fibras TH⁺ normalizada, para lo cual se tomó el valor promedio más alto encontrado en las capas del giro dentado del grupo control, el cual se consideró como el 100% y a partir de éste se normalizaron las densidades del resto de capas para ambas condiciones experimentales. Se utilizó una escala de colores de violeta a rojo, asignando un color cada 5%, donde los colores más cálidos representan las mayores densidades; mientras que los colores más fríos a las menores densidades. Con lo anterior se asignó el color correspondiente para cada capa en ambas condiciones experimentales.

6.5. Cirugía estereotáxica

Para llevar a cabo el marcaje anterógrado de las células del área ventral tegmental, a los animales de los grupos control y de ejercicio se les realizó una cirugía estereotáxica 3 semanas antes de cumplir los dos meses en sus respectivas condiciones. Los animales fueron anestesiados con Avertin (10 mg/mL) vía i.p. y se les inyectó 0.5 μ L del virus adeno-asociado pAAV-hSyn-mCherry (construcción de Karl Deisseroth, Stanford University, Stanford, Ca., adquirido de la University of North Carolina Gene Therapy Center Vector Core). El virus adeno-asociado fue inyectado en el área ventral tegmental utilizando las siguientes coordenadas relativas a Bregma (mm): anteroposterior (AP): -3.1, lateralidad (L): 0.6 y dorsoventral (DV): -4.3. Estas coordenadas fueron obtenidas del atlas del cerebro de ratón (Franklin y Paxinos, 2007). Después de la cirugía los animales fueron mantenidos en sus respectivas condiciones experimentales hasta cumplir los dos meses para posteriormente ser perfundidos.

Para llevar a cabo el marcaje retrógrado de las células del área ventral tegmental se inyectó a través de cirugía estereotáxica 0.1 μ L de retrobeads rojos o verdes (Lumafluor) en la capa molecular interna del giro dentado, utilizando las siguientes coordenadas relativas a Bregma (mm): giro dentado dorsal, AP: -2.1, L: 1.8 y DV: -2.0; giro dentado ventral, AP: -3.1, L: 2.8 y DV: -3.0. Estas coordenadas fueron modificadas del atlas del cerebro de ratón (Franklin y Paxinos, 2007). Una semana después de la cirugía los animales fueron anestesiados y perfundidos.

6.6. Inmunofluorescencia

Para identificar el fenotipo de las fibras provenientes de las neuronas mCherry⁺ del área ventral tegmental se procesó una serie 1:6 de secciones equidistantes de 240 μ m. Brevemente, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-TH (1:500; Millipore) y subsecuentemente, se incubaron con el anticuerpo secundario de burro anti-conejo Alexa-488 (1:200; Thermo Fisher Scientific). Los núcleos fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1:20000). Las secciones fueron montadas en cubreobjetos gelatinizados usando alcohol de polivinilo 1,4-diazabicyclo-octano (PVA-DABCO) como medio de

montaje. Se obtuvieron las imágenes del giro dentado y área ventral tegmental (10X, PL Fluotar, NA 0.30), así como de neuronas del área ventral tegmental y fibras en el giro dentado, en las capas molecular supra- e infrapiramidal e hilus (63X, PL APO CS2, NA 1.40) en el microscopio confocal SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). De manera similar al análisis de TH para inmunohistoquímica, se analizaron dos cortes representativos del nivel dorsal, medial y ventral del giro dentado.

6.7. Análisis de estadístico

Los parámetros morfométricos de los animales y sus cerebros, así como los conteos del análisis de imágenes de inmunohistoquímica de BrdU y TH se analizaron mediante la prueba estadística de t de Student no pareada comparando los datos entre ambos grupos. Para los análisis a través del eje dorso-ventral se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de una vía o Kruskal-Wallis (seguidas de una prueba *post-hoc* de Tukey o Dunn, respectivamente), dependiendo la normalidad de los datos. Las correlaciones entre el número de células BrdU⁺ o densidad de fibras TH⁺ con la distancia total recorrida o velocidad promedio se realizaron mediante la prueba de correlación de Pearson. La normalidad de los datos se analizó con la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Todas las pruebas se realizaron en GraphPad Prism (v. 6.00 para Windows, GraphPad Software, California, E. U. A.). Se consideraron diferencias significativas cuando la probabilidad fuese $P \leq 0.05$. Los datos se muestran como la media \pm S. E. M.

7. RESULTADOS

7.1. El ejercicio no modifica la ganancia de peso

Los animales de los grupos control (C, $n = 11$) y de ejercicio (E, $n = 13$), tuvieron un peso inicial similar (C, 20.46 ± 0.62 g vs. E, 19.72 ± 0.70 g; $t_{22} = 0.78$; $P > 0.05$; Fig. 6A). Tras dos meses bajo sus respectivas condiciones los animales de ambos grupos presentaron una ganancia de peso similar (C, 6.91 ± 0.55 g vs. E, 6.20 ± 0.80 g; $t_{22} = 0.71$; $P > 0.05$; Fig. 6B y C).

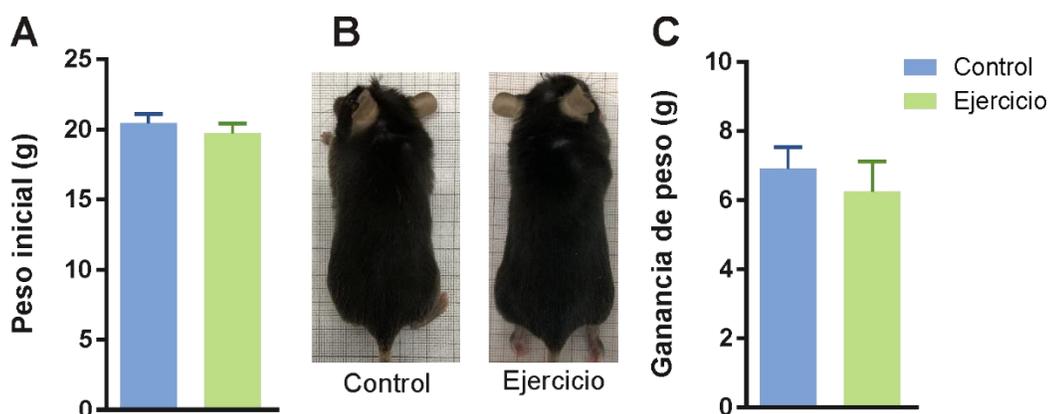


Figura 6. Dos meses de ejercicio voluntario no modificaron la ganancia de peso. A) El peso corporal de los animales del grupo control y de ejercicio fue similar al inicio del proceso experimental. B) Fotografías representativas de ratones del grupo control y de ejercicio. C) La ganancia de peso corporal al finalizar los 2 meses del procedimiento experimental fue similar entre ambos grupos (C, $n = 11$, E, $n = 13$). Los datos muestran la media \pm S. E. M. Prueba de t ($P > 0.05$).

Los ratones del grupo de ejercicio se mantuvieron corriendo voluntariamente durante los dos meses (Fig. 7A y B); iniciando con una distancia promedio de 8.68 ± 1.01 Km/día, alcanzando una distancia máxima de 12.61 ± 1.24 Km/día en la segunda semana. Al finalizar las 10 semanas de experimentación los ratones corrieron una distancia de 7.43 ± 0.93 Km/día (Fig. 7A). Los ratones corrieron a una velocidad promedio de 3 Km/h durante todo el protocolo experimental (Fig. 7B).

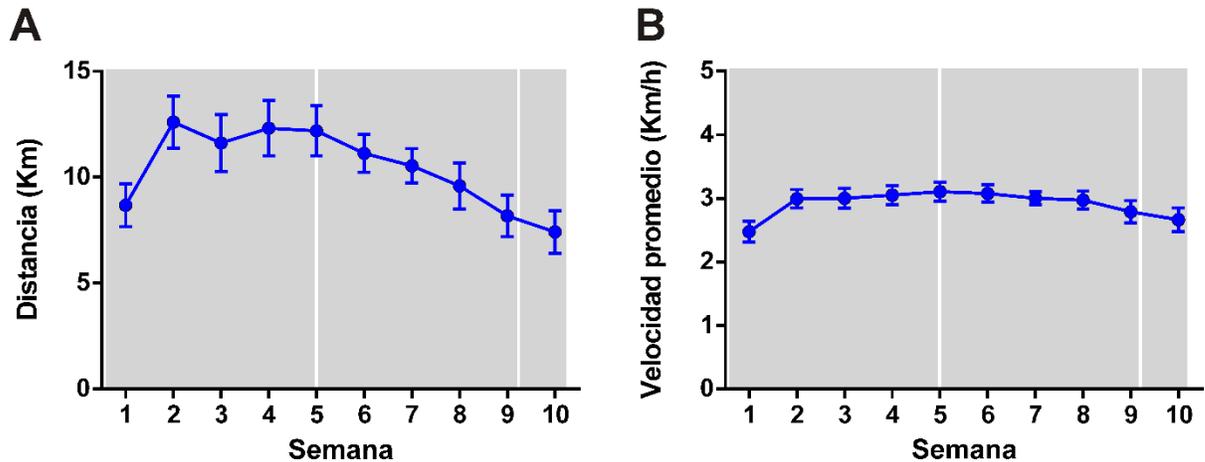


Figura 7. Los ratones se mantuvieron corriendo voluntariamente por dos meses. A) Distancia promedio semanal por el periodo de experimentación (n = 13). **B)** Velocidad promedio por semana. Las barras grises representan los meses. Los datos muestran la media \pm S. E. M.

7.2. El ejercicio no modifica las dimensiones del cerebro

Para determinar si dos meses de ejercicio inducen modificaciones macroscópicas en el cerebro se determinó el peso y las dimensiones de los cerebros de los ratones del grupo control (n = 11) y de ejercicio (n = 13; Fig. 8A). Los resultados mostraron que ni el peso (C, 0.45 ± 0.01 g vs. E, 0.46 ± 0.01 g; $t_{22} = 0.90$; $P > 0.05$; Fig. 8B) ni las dimensiones [largo (C, 1.57 ± 0.02 cm vs. E, 1.58 ± 0.02 cm; $t_{22} = 0.44$; $P > 0.05$; Fig. 8C) y ancho (C, 1.11 ± 0.01 cm vs. E, 1.11 ± 0.003 cm; $t_{22} = 0.05$; $P > 0.05$; Fig. 8D)] fueron modificadas por el ejercicio.

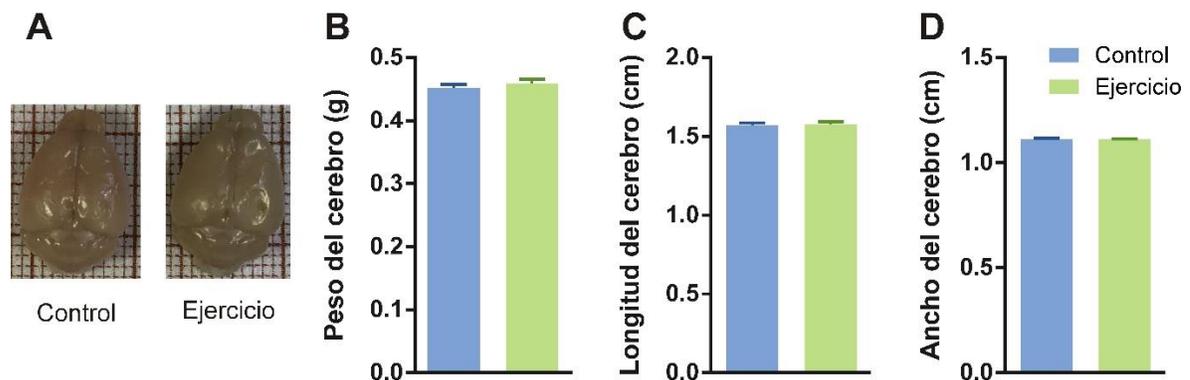


Figura 8. Dos meses de ejercicio voluntario no modificaron los parámetros morfométricos del cerebro. A) Fotografías representativas de cerebros de animales control y de ejercicio. **B)** El peso del cerebro no difirió entre los grupos. **C)** Los cerebros de los animales de ambos grupos tuvieron una longitud similar. **D)** El ancho de los cerebros de animales control y de ejercicio no mostraron diferencia (C, n = 11, E, n = 13). Los datos muestran la media \pm S. E. M. Prueba de t ($P > 0.05$).

7.3. Dos meses de ejercicio no mantienen elevados los niveles de proliferación celular

Un mes de ejercicio aumenta la neurogénesis hipocámpal hasta un 200%, incrementando la proliferación y la sobrevivencia celular (van Praag *et al.*, 1999). Sin embargo, estudios previos de nuestro laboratorio muestran que 6 meses de ejercicio no mantienen elevados los niveles de neurogénesis. Para determinar el momento en el que la neurogénesis regresa a su nivel basal, aún en condiciones de ejercicio, determinamos el efecto de dos meses de ejercicio en la proliferación celular. Para ello, los ratones de los grupos control ($n = 4$) y de ejercicio ($n = 5$) recibieron una inyección de BrdU (50 mg/Kg/día, i.p.) durante los últimos 5 días del protocolo de experimentación (2 meses) en sus respectivas condiciones. Los ratones fueron sacrificados el día de la última inyección. El tejido se procesó para evidenciar las células que incorporaron BrdU en su DNA (BrdU⁺; Fig. 9A). La cuantificación del número total de células BrdU⁺ en el giro dentado mostró que no hay diferencias significativas entre el grupo control y de ejercicio (C, 3471 ± 115 vs. E, 3128 ± 175 ; $t_7 = 1.54$; $P > 0.05$; Fig. 9B).

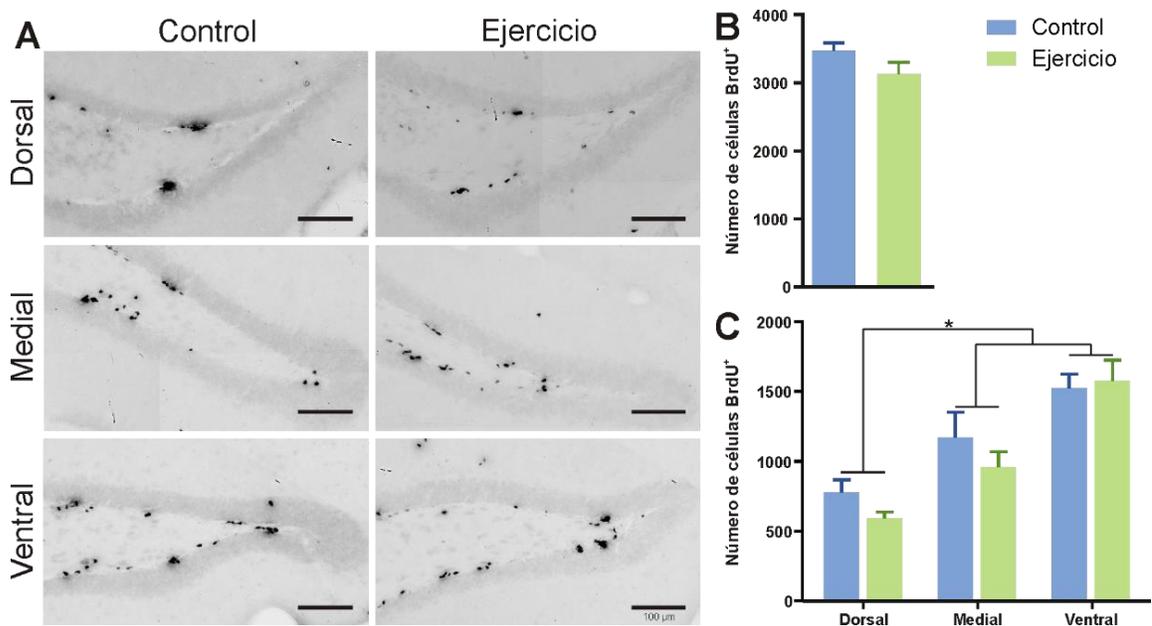


Figura 9. La proliferación celular regresa a sus niveles basales después de dos meses de ejercicio voluntario. A) Fotomicrografías representativas de células BrdU⁺ en el giro dentado de ratones control y en condición de ejercicio a través del eje dorso-ventral. **B)** El número total de células BrdU⁺ en el giro dentado es similar en animales control y en condición de ejercicio (C, $n = 4$; E, $n = 5$). **C)** Dos meses de ejercicio no modifica el número de células BrdU⁺ a través del eje dorso-ventral.

Los datos muestran la media \pm S. E. M. Prueba de t ($P > 0.05$) y ANOVA de dos vías ($*P < 0.05$), seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey.

Estudios previos muestran que el efecto neurogénico del ejercicio se lleva a cabo principalmente en el giro dentado dorsal en rebanadas cortadas horizontalmente (Vivar *et al.*, 2016). Para determinar si existen diferencias en el número de células BrdU⁺ a través del eje dorso-ventral, el hipocampo fue dividido en región dorsal, media y ventral (ver Metodología). El análisis mostró que en rebanadas coronales el nivel dorsal tiene menor número de células BrdU⁺ que el nivel medial ($P < 0.05$) y ventral ($P < 0.0001$; $F_{2,21} = 26.34$), en ambos grupos. Asimismo, mostró que no hay diferencias significativas en el número de células BrdU⁺ a nivel dorsal (C, 777.00 ± 92.51 vs. E, 592.80 ± 44.72 ; $t_7 = 1.92$; $P > 0.05$), medial (C, 1170.00 ± 180.20 vs. E, 957.60 ± 112.00 ; $t_7 = 1.05$; $P > 0.05$) ni ventral (C, 1524.00 ± 100.80 vs. E, 1578.00 ± 146.80 ; $t_7 = 0.29$; $P > 0.05$; Fig. 9C) entre los ratones del grupo control y de ejercicio. En conjunto, estos resultados sugieren que el incremento de la neurogénesis inducido por el ejercicio es transitorio, ya que después de 2 meses de ejercicio los niveles de proliferación regresan a sus valores basales, similares a los observados en los animales del grupo control.

7.4. El nivel de proliferación celular es independiente de la distancia corrida

Para determinar si la distancia total corrida por los animales del grupo de ejercicio tenía una influencia en el nivel de proliferación celular se realizó una correlación entre el número total de células BrdU⁺ y la distancia total corrida (Km). El análisis mostró que la distancia corrida no influye sobre la proliferación celular ($R^2 = 0.35$; $P > 0.05$). De la misma forma se analizó la correlación entre el número de células BrdU⁺ en cada uno de los niveles y la distancia total corrida, encontrando que la distancia corrida no influye sobre la proliferación a nivel dorsal ($R^2 = 0.55$; $P > 0.05$), medial ($R^2 = 0.04$; $P > 0.05$) ni ventral ($R^2 = 0.11$; $P > 0.05$). Estos resultados muestran que, aunque los ratones se hayan mantenido corriendo voluntariamente durante 2 meses, esto no incrementa los niveles de proliferación celular, lo que apoya la hipótesis de que el incremento en la neurogénesis es transitorio.

7.5. El ejercicio no modifica la densidad total de fibras TH⁺ en el giro dentado

Un sistema de neurotransmisión involucrado tanto en procesos cognitivos como emocionales, aunque poco estudiados durante el ejercicio, es el dopaminérgico. Para determinar los posibles cambios inducidos por el ejercicio en la innervación dopaminérgica que recibe el giro dentado se evaluó la densidad de fibras tirosina hidroxilasa (TH⁺), la cual es la enzima limitante de la síntesis de dopamina, así como del resto de catecolaminas (norepinefrina y epinefrina), ya que no es posible visualizar de forma directa la innervación dopaminérgica.

El giro dentado recibe innervación dopaminérgica proveniente de diferentes áreas en capas específicas. La innervación dopaminérgica podría ser modificada por el ejercicio dependiendo de la función que cada una de estas entradas sinápticas lleva a cabo. Es por ello que el análisis de la densidad de fibras TH⁺ se llevó a cabo, en los ratones del grupo control (n = 6) y de ejercicio (n = 6), en las siguientes áreas/caspas: cresta y capa molecular externa (vía de entrada de la corteza entorrinal), capa molecular interna (entrada de la vía comisural asociativa), hilus (cruce de las fibras musgosas y ubicación de las células musgosas) y zona subgranular (lugar del nicho neurogénico).

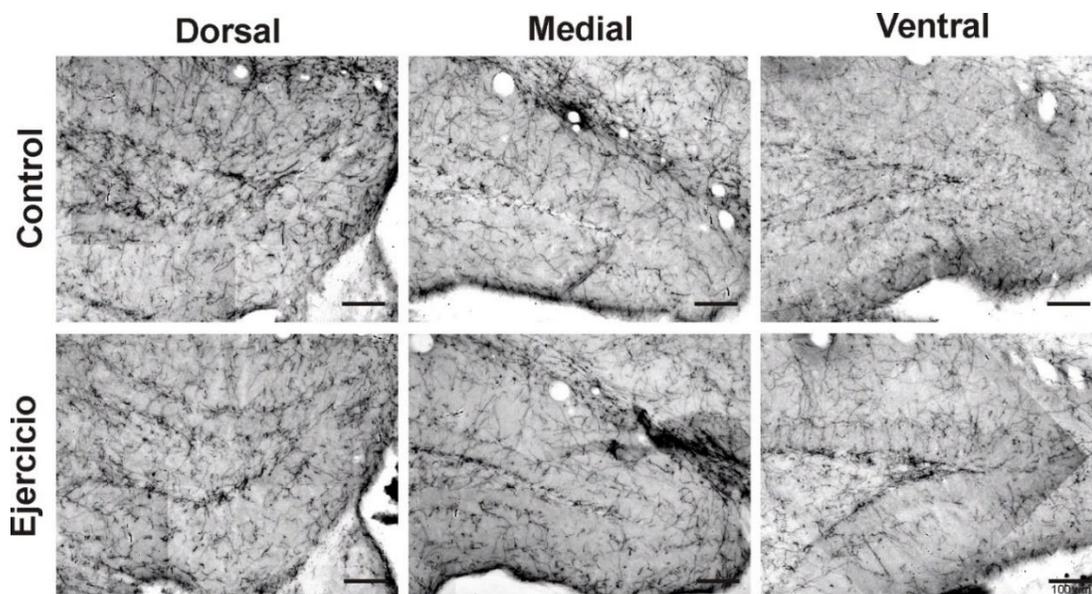


Figura 10. Fotomicrografías representativas del giro dentado del hipocampo a través del eje dorso-ventral, mostrando las fibras TH⁺ en el giro dentado, en animales de los grupos control y de ejercicio.

El análisis de la densidad de fibras TH⁺ total (de todas las áreas/capas) mostró que el ejercicio no modifica significativamente la densidad de fibras TH⁺ (C, 39.84 ± 1.00% vs. E, 37.58 ± 1.45%; $t_{10} = 1.28$; $P > 0.05$; Fig. 10 y 11A). Para determinar si existen diferencias en la densidad de fibras TH⁺ a través del eje dorso-ventral, se analizó la densidad de fibras TH⁺ (de todas las áreas/capas) en la región dorsal, media y ventral del giro dentado (ver Metodología). El análisis mostró que la densidad de fibras TH⁺ fue homogénea a través del eje dorso-ventral en el giro dentado de ratones del grupo control ($P > 0.05$; $F_{2,15} = 1.67$) y de ejercicio ($P > 0.05$; $F_{2,15} = 0.89$). Al comparar la densidad de fibras TH⁺ a través del eje dorso-ventral entre los grupos tampoco se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$; Fig. 11B).

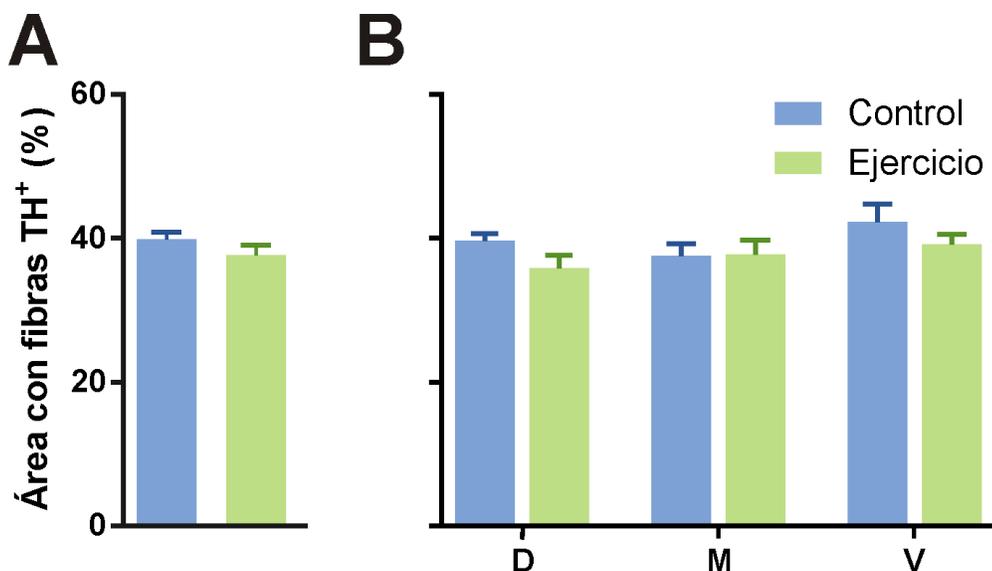


Figura 11. Dos meses de ejercicio no modifican la densidad total de fibras TH⁺ en el giro dentado. **A)** La densidad de fibras TH⁺ total en el giro dentado es similar entre los grupos (C, n = 6, E, n = 6). **B)** La densidad de fibras TH⁺ a través del eje dorso-ventral (D, dorsal; M, medial; V, ventral) no difiere entre los grupos. Los datos muestran la media ± S. E. M. Prueba de t ($P > 0.05$), ANOVA de una vía ($P > 0.05$).

Posteriormente, se evaluó si el ejercicio podría influir sobre la densidad de fibras TH⁺ en alguna de las regiones del giro dentado a través del eje dorso-ventral. Para ello, analizamos la correlación entre la distancia total recorrida o la velocidad promedio y la densidad de fibras TH⁺ de todas las capas en la región dorsal, media

y ventral. El análisis mostró que ninguna de las regiones del giro es influenciada por la velocidad promedio (Dorsal, $R^2 = 0.03$, $P > 0.05$; Medial, $R^2 = 0.03$, $P > 0.05$; Ventral, $R^2 = 0.10$, $P > 0.05$) o la distancia total recorrida (Dorsal, $R^2 = 0.04$, $P > 0.05$; Medial, $R^2 = 0.17$, $P > 0.05$; Ventral, $R^2 = 0.001$, $P > 0.05$).

Estos resultados muestran que dos meses de ejercicio no modifican la densidad total ni la densidad de fibras TH⁺ de las regiones dorsal, medial y ventral y, además, esto es independiente de la cantidad de ejercicio que se realice.

7.6. El ejercicio modifica la composición de densidad de fibras TH⁺ de la cresta e hilus

Para determinar si existen diferencias en la densidad de fibras TH⁺ en las capas/áreas a través del eje dorso-ventral se analizó la densidad de fibras TH⁺ de cada capa/área en la región dorsal (D), medial (M) y ventral (V) del giro dentado. El análisis mostró que en los animales del grupo control la densidad de fibras TH⁺ es homogénea a través del eje dorso-ventral en la capa molecular externa supra- (D, $40.39 \pm 2.51\%$, M, $35.33 \pm 2.41\%$, V, $38.44 \pm 2.58\%$; $F_{2,15} = 1.04$; $P > 0.05$; Fig. 12A) e infrapiramidal (D, $36.38 \pm 2.02\%$, M, $35.03 \pm 1.80\%$, V, 39.78 ± 4.25 ; $H_2 = 1.06$; $P > 0.05$; Fig. 12B), la cresta (D, $44.13 \pm 2.87\%$, M, $35.33 \pm 0.94\%$, V, $38.28 \pm 3.46\%$; $F_{2,15} = 2.88$; $P > 0.05$; Fig. 12C), la capa molecular interna supra- (D, $33.91 \pm 2.21\%$, M, $32.57 \pm 1.84\%$, V, $36.71 \pm 2.51\%$; $F_{2,15} = 0.92$; $P > 0.05$; Fig. 12D) e infrapiramidal (D, $31.50 \pm 1.15\%$, M, $30.53 \pm 1.80\%$, V, $36.05 \pm 3.55\%$; $F_{2,15} = 1.51$; $P > 0.05$; Fig. 12E), el hilus (D, $41.70 \pm 1.79\%$, M, $42.55 \pm 2.12\%$, V, $48.29 \pm 2.55\%$; $F_{2,15} = 2.71$; $P > 0.05$; Fig. 12F) y la zona subgranular infrapiramidal (D, $44.78 \pm 1.14\%$, M, $44.10 \pm 2.73\%$, V, $48.34 \pm 1.89\%$; $F_{2,15} = 1.26$; $P > 0.05$; Fig. 12H). La única excepción se observó en la zona subgranular suprapiramidal, la cual presenta mayor densidad en la porción ventral ($53.34 \pm 2.24\%$) que en la medial ($45.03 \pm 3.20\%$) y dorsal ($44.54 \pm 1.21\%$; $F_{2,15} = 4.40$; $P < 0.05$; Fig. 12G).

De manera similar, el análisis mostró que en los animales del grupo de ejercicio la densidad de fibras TH⁺ es homogénea a través del eje dorso-ventral del giro dentado en la capa molecular externa, supra- (D, $40.12 \pm 3.29\%$, M, $38.79 \pm 3.46\%$, V, $39.87 \pm 2.03\%$; $H_2 = 1.99$; $P > 0.05$; Fig. 12A) e infrapiramidal (D, $35.30 \pm$

1.99%, M, $34.48 \pm 2.93\%$, V, $33.70 \pm 0.80\%$; $F_{2,15} = 0.14$; $P > 0.05$; Fig. 12B), la capa molecular interna, supra- (D, $32.67 \pm 2.52\%$, M, $36.25 \pm 3.15\%$, V, $36.71 \pm 2.51\%$; $F_{2,15} = 0.65$; $P > 0.05$; Fig. 12D) e infrapiramidal (D, $29.11 \pm 1.58\%$, M, $31.79 \pm 2.48\%$, V, $30.09 \pm 0.90\%$; $F_{2,15} = 0.58$; $P > 0.05$; Fig. 12E), la zona subgranular infrapiramidal (D, $36.78 \pm 3.84\%$, M, $38.84 \pm 2.68\%$, V, $47.47 \pm 2.11\%$; $F_{2,15} = 3.66$; $P > 0.05$; Fig. 12H). Asimismo, la zona subgranular suprapiramidal de la región ventral ($49.58 \pm 2.17\%$) tiene mayor densidad de fibras TH⁺ que en la región medial ($43.87 \pm 2.66\%$) y dorsal ($41.04 \pm 1.65\%$; $H_2 = 6.54$; $P < 0.05$; Fig. 12G). A diferencia del control, se encontró que la cresta de la región ventral ($32.68 \pm 1.36\%$) y medial ($34.28 \pm 1.99\%$) tiene menor densidad de fibras TH⁺ que en la región dorsal ($41.37 \pm 2.60\%$; $F_{2,15} = 5.09$; $P < 0.05$; Fig. 12C). Además, el hilus dorsal ($30.43 \pm 2.21\%$) tiene menor densidad de fibras TH⁺ que la porción medial ($43.72 \pm 3.60\%$; $P < 0.05$) y ventral ($43.04 \pm 4.02\%$; $F_{2,15} = 4.94$; $P < 0.05$; Fig. 12F).

Estos resultados muestran que el ejercicio está modificando la composición que tienen la cresta e hilus, pasando de una densidad de fibras TH⁺ homogénea a través del eje dorso-ventral a un decremento gradual a través del eje dorso-ventral en la cresta y un incremento gradual a través del eje dorso-ventral en el hilus.

7.7. Dos meses de ejercicio disminuyen la densidad de fibras TH⁺ en el hilus de la región dorsal

Finalmente, se determinó si el ejercicio modificaba la densidad de fibras TH⁺ en algunas de las capas a través del eje dorsal, para lo cual se comparó la densidad de fibras TH⁺ de cada capa en cada nivel del eje dorso-ventral del giro dentado entre ambos grupos. El análisis mostró que el ejercicio disminuyó significativamente la densidad de fibras TH⁺ en el hilus de la región dorsal, respecto al control (C, $41.70 \pm 1.79\%$ vs. E, $30.43 \pm 2.22\%$; $t_{10} = 3.96$; $P < 0.01$; Fig. 12F), mientras que en el resto de las capas y niveles no hay diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los grupos.

Igualmente, se analizó si la velocidad promedio o distancia total recorrida tenía influencia sobre la densidad de fibras TH⁺ en alguna de las capas a través del eje dorso-ventral. El análisis mostró que sólo la capa molecular infrapiramidal

externa de la región ventral ($R^2 = 0.66$; $P < 0.05$) y la cresta de la región medial ($R^2 = 0.67$; $P < 0.05$), una mayor distancia recorrida o velocidad promedio aumenta la densidad de fibras TH⁺, respectivamente.

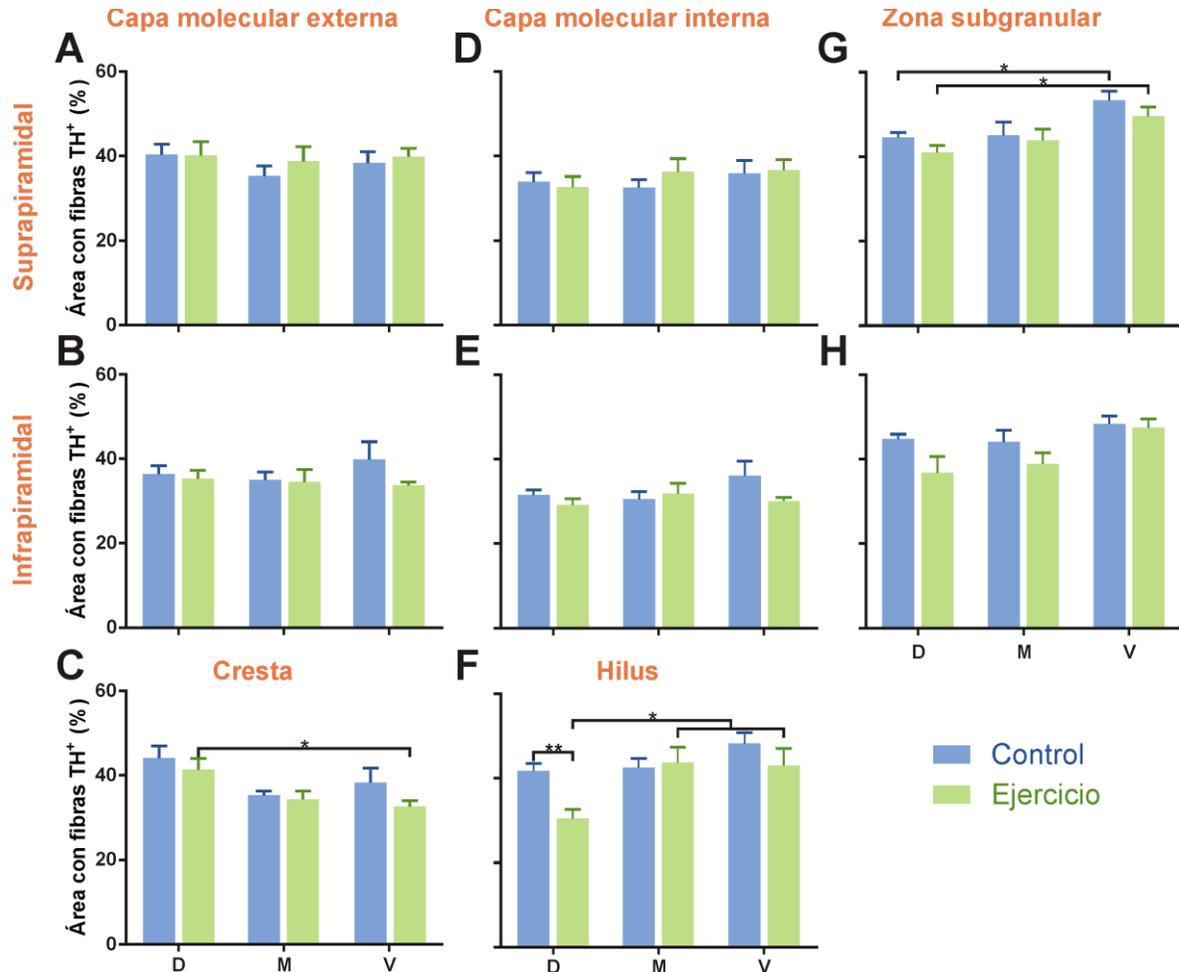


Figura 12. Dos meses de ejercicio voluntario disminuyen la densidad de fibras TH⁺ en el hilus dorsal. Densidad de fibras TH⁺ en la capa molecular externa (A) suprapiramidal e (B) infrapiramidal, (C) cresta, capa molecular interna (D) suprapiramidal e (E) infrapiramidal, (F) hilus y zona subgranular (G) suprapiramidal e (H) infrapiramidal a través de eje dorso-ventral (D, dorsal; M, medial; V, ventral) en animales de ambas condiciones (C, n = 6, E, n = 6). Media ± S. E. M. Prueba t (** $P < 0.01$), ANOVA de una vía/Kruskal-Wallis seguida de por una prueba *post-hoc* de Tukey/Dunn (* $P < 0.05$).

De los datos obtenidos de la densidad de fibras TH⁺ descritos en la sección anterior se generaron esquemas del giro dentado a través del eje dorso-ventral donde se representan la densidad de fibras normalizada (ver Metodología), tomando como máximo el valor promedio más alto del grupo control (zona subgranular suprapiramidal). Estos esquemas nos permiten observar más

fácilmente las diferencias de densidades entre las capas en un mismo nivel, a través del eje dorso-ventral y entre los grupos, destacando la reducción significativa de fibras TH⁺ en el hilus dorsal (Fig. 13).

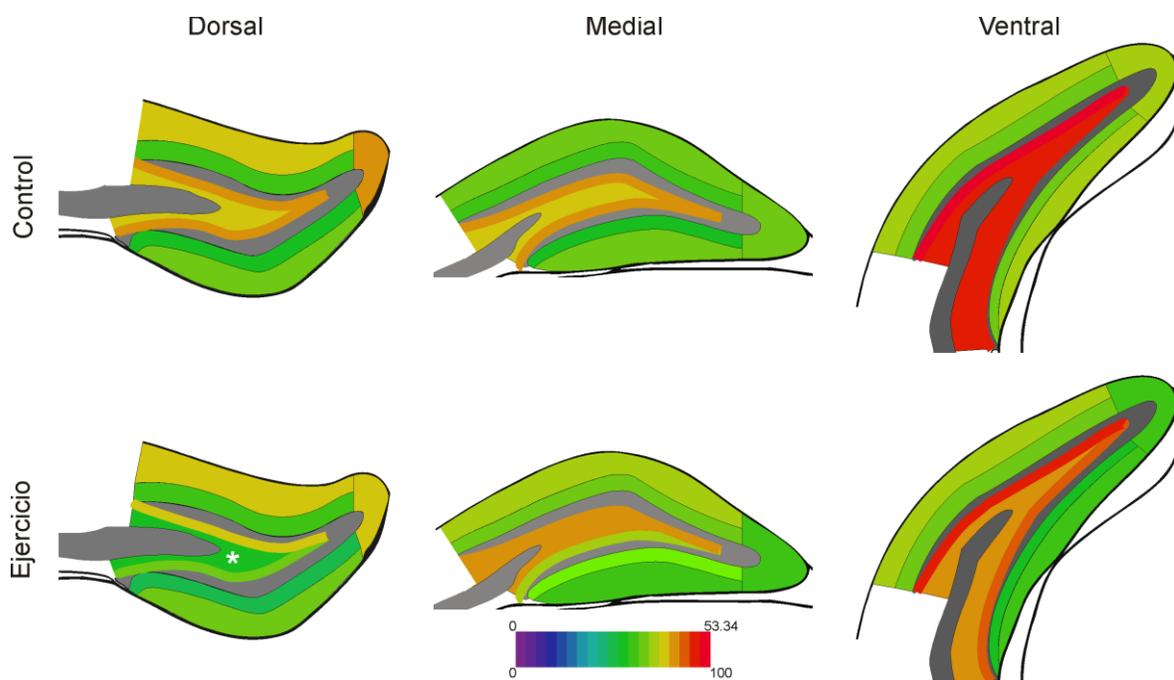


Figura 13. Diagramas de la densidad de fibras TH⁺ normalizada en animales control y de ejercicio a través del eje dorso-ventral. Los colores cálidos muestran las mayores densidades, mientras que los colores fríos muestran las menores densidades. El asterisco (*) muestra el área que presentó diferencias significativas entre los grupos.

En conjunto estos resultados muestran que el ejercicio modifica la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado, disminuyendo la densidad de fibras TH⁺ en el hilus dorsal, pero además la cresta medial y la capa molecular infrapiramidal externa pueden modificar la densidad de fibras dependiendo de la cantidad de ejercicio realizado.

7.8. El ejercicio previene la pérdida de fibras TH⁺ inducida por el envejecimiento

Adicionalmente, se contaba con tejido de animales que habían empezado el protocolo experimental a la misma edad que los animales del protocolo de 2 meses (*i.e.* 4-6 semanas), pero de protocolos de 1 (C, n = 2, E, n = 2) y 3 (C, n = 3, E, n = 3) meses de ejercicio, con los cuales se analizó el efecto del ejercicio sobre la

densidad de fibras TH⁺ en el tiempo. Debido a que se contaba una muestra pequeña no se realizó un análisis estadístico. Sin embargo, se describen los resultados obtenidos.

Los datos de la densidad de fibras TH⁺ del tejido de animales del protocolo de un mes, que fueron cortados de manera horizontal, fueron normalizados los valores de todas las capas al valor promedio más alto encontrado en el grupo control (hilus de la región ventral) para construir los diagramas de densidad normalizada (ver Metodología). El análisis preliminar mostró que un mes de ejercicio aumenta la inervación de fibras TH⁺ en el giro dentado, principalmente en la capa molecular externa suprapiramidal dorsal y ventral, capa molecular interna infrapiramidal dorsal y ventral (Fig. 14). Lo anterior a diferencia de dos meses, donde se observó únicamente la reducción significativa de la densidad de fibras TH⁺ en el hilus dorsal.

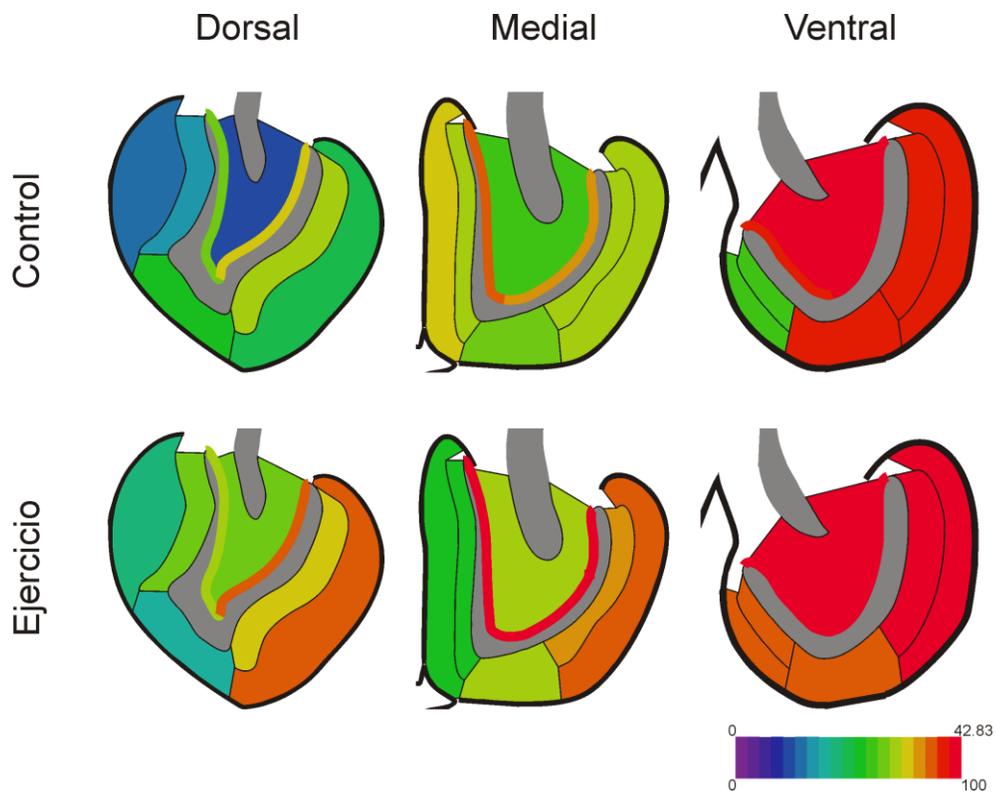


Figura 14. Un mes de ejercicio incrementa la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado. Diagramas de la densidad de fibras TH⁺ normalizada en animales control y de ejercicio a través del eje dorso-ventral en cortes horizontales. Los colores cálidos muestran las mayores densidades, mientras que los colores fríos muestran las menores densidades.

De igual manera, los datos de la densidad de fibras TH⁺ del tejido de animales con tres meses de ejercicio, cortado de forma coronal, se normalizaron al valor promedio más alto encontrado en los animales control (hilus de la región ventral) para construir los diagramas de densidad normalizada (ver Metodología). El análisis preliminar mostró una mayor densidad de fibras TH⁺ en casi todas las capas y a través del eje dorso-ventral, en comparación con los controles (Fig. 15).

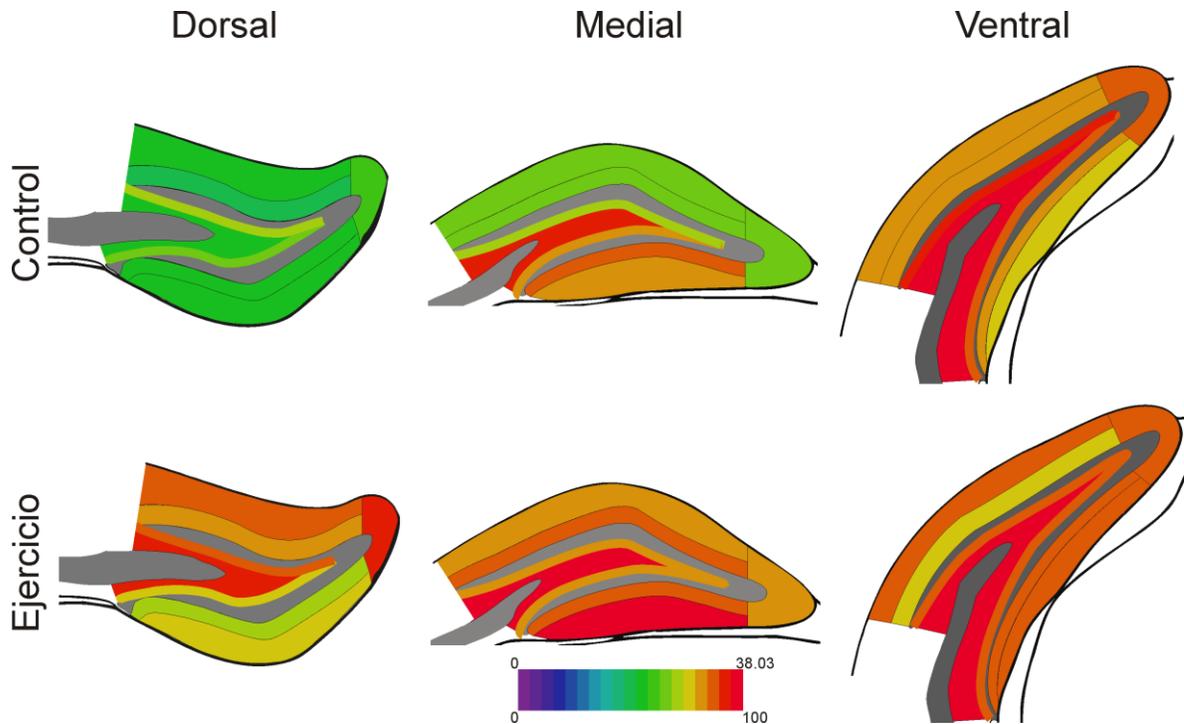


Figura 15. Tres meses de ejercicio incrementan la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado. Diagramas de la densidad de fibras TH⁺ normalizada en animales control y de ejercicio a través del eje dorso-ventral. Los colores cálidos muestran las mayores densidades, mientras que los colores fríos muestran las menores densidades.

Con los valores de la densidad de fibras TH⁺ de los animales en protocolos de 2 y 3 meses de ejercicio se determinó el curso temporal del efecto del ejercicio sobre la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado. Los valores de los animales de un mes de ejercicio no fueron incluidos debido a que fueron cortados horizontales, lo que dificulta la comparación. Para llevar esto a cabo se normalizaron los valores de ambas condiciones (control y ejercicio) y ambos protocolos (2 y 3 meses) a la máxima densidad promedio encontrada en los animales control de dos meses (zona subgranular suprapiramidal). Este análisis mostró que al comparar a los controles

de 2 y 3 meses se observa una reducción en la densidad de fibras TH⁺, principalmente en la región dorsal, lo cual puede estar relacionado con el envejecimiento. Por otra parte, al comparar los datos del grupo de ejercicio de 2 y 3 meses también se observa una disminución en la densidad de fibras TH⁺ en región dorsal. Sin embargo, al comparar entre el grupo control y de ejercicio de 3 meses se observa que la mayor densidad encontrada en el grupo de ejercicio en la mayoría de las capas a través del eje dorso-ventral (Fig. 15) se debe a una menor reducción en la densidad de fibras TH⁺ en la región dorsal, lo cual sugiere que el ejercicio previene la pérdida de fibras TH⁺ inducida por el envejecimiento (Fig. 16).

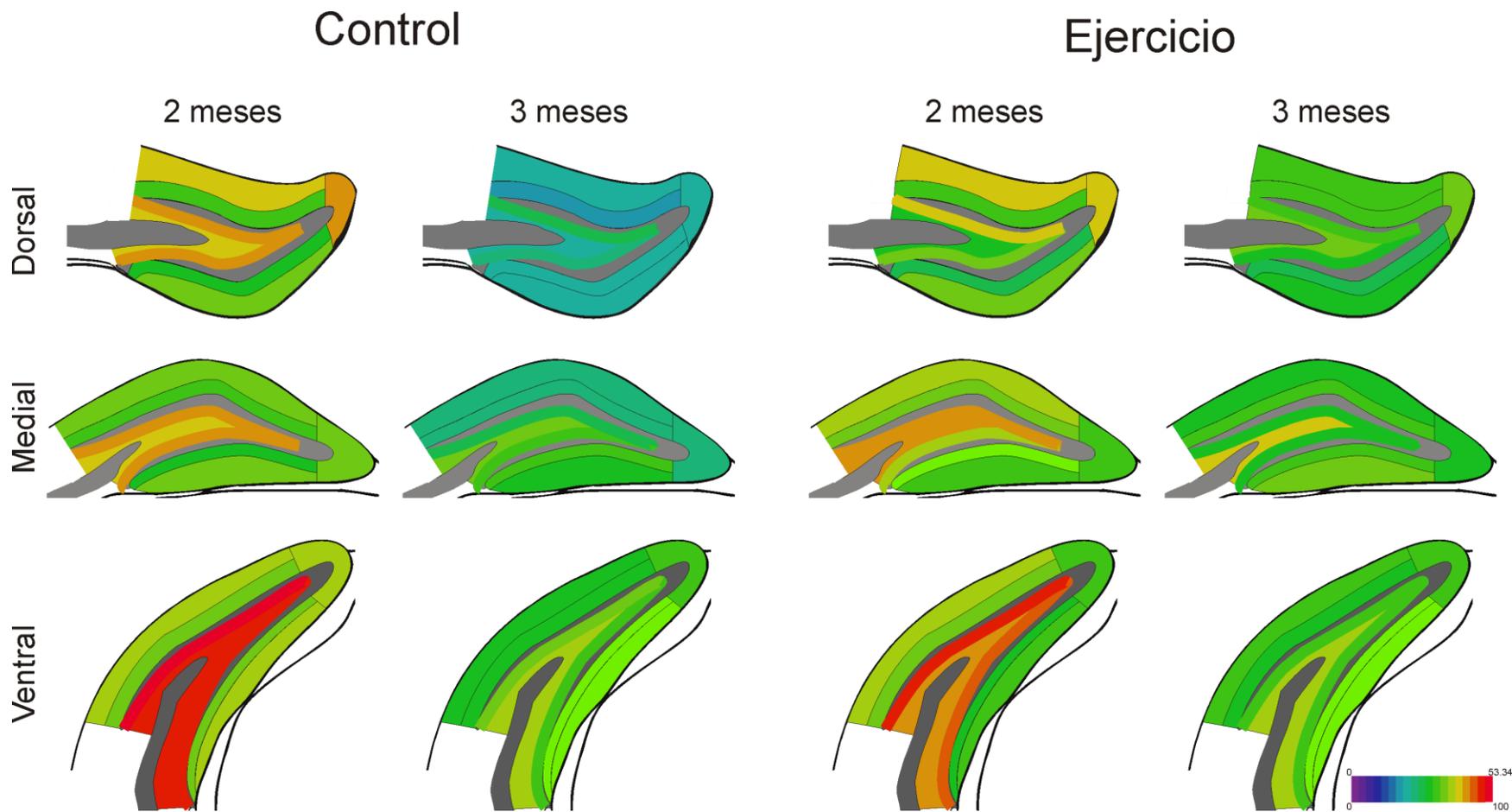


Figura 16. Tres meses de ejercicio previene la pérdida de fibras TH⁺ inducida por el envejecimiento. Diagramas de la densidad de fibras TH⁺ normalizada, en animales control y de ejercicio a través del eje dorso-ventral, respecto al valor promedio máximo en el grupo control de 2 meses. Los colores cálidos muestran las mayores densidades, mientras que los colores fríos muestran las menores densidades.

Todo lo anterior sugiere que el ejercicio a un mes aumenta la innervación TH⁺, a dos meses hay un posible refinamiento y a tres meses previene la reducción de la innervación dopaminérgica, apoyando la hipótesis de que el ejercicio es un modulador de la neuroplasticidad y que son estos cambios más el incremento transitorio de la proliferación y posterior maduración de las nuevas neuronas los responsables de los efectos benéficos del ejercicio sobre los procesos cognitivos y emocionales.

7.9. Estandarización de las técnicas para evaluar la conectividad dopaminérgica del área ventral tegmental hacia el giro dentado

La innervación dopaminérgica del VTA en el hipocampo juega un papel relevante en los procesos cognitivos y emocionales y se ha mostrado que 8 semanas de ejercicio aumentan el mRNA de tirosina hidroxilasa (TH) en este núcleo (Greenwood *et al.*, 2011). Por tanto, es importante establecer técnicas que permitan marcar selectivamente a las neuronas dopaminérgicas del VTA para evaluar cambios que podrían estar sucediendo en la conectividad dopaminérgica del VTA hacia el giro dentado por efecto del ejercicio. Una estrategia que permite el marcaje de los axones de las células del VTA es el trazado anterógrado de estas células. Para ellos utilizamos el vector viral pAAV-hSyn-mCherry, el cual permite el marcaje específico de neuronas y sus proyecciones dendríticas y axonales, permitiendo así evaluar cambios en la conectividad proveniente del VTA en el giro dentado. La combinación de este marcaje viral con la inmunofluorescencia contra TH, permite identificar fibras del VTA (mCherry⁺) con un fenotipo dopaminérgico (TH⁺). Utilizando esta metodología en ratones control (n = 1) y del grupo de ejercicio (n = 2) logramos infectar células del VTA (mCherry⁺), algunas de las cuales co-localizan con TH, indicando que se trataba de neuronas dopaminérgicas (Fig. 17A y B), en ambas condiciones experimentales. Al analizar el principal blanco postsináptico del VTA, el núcleo accumbens logramos observar fibras provenientes que expresan mCherry y que co-localizan con TH (Fig. 17C) en ambas condiciones experimentales, indicando que son fibras dopaminérgicas provenientes del VTA.

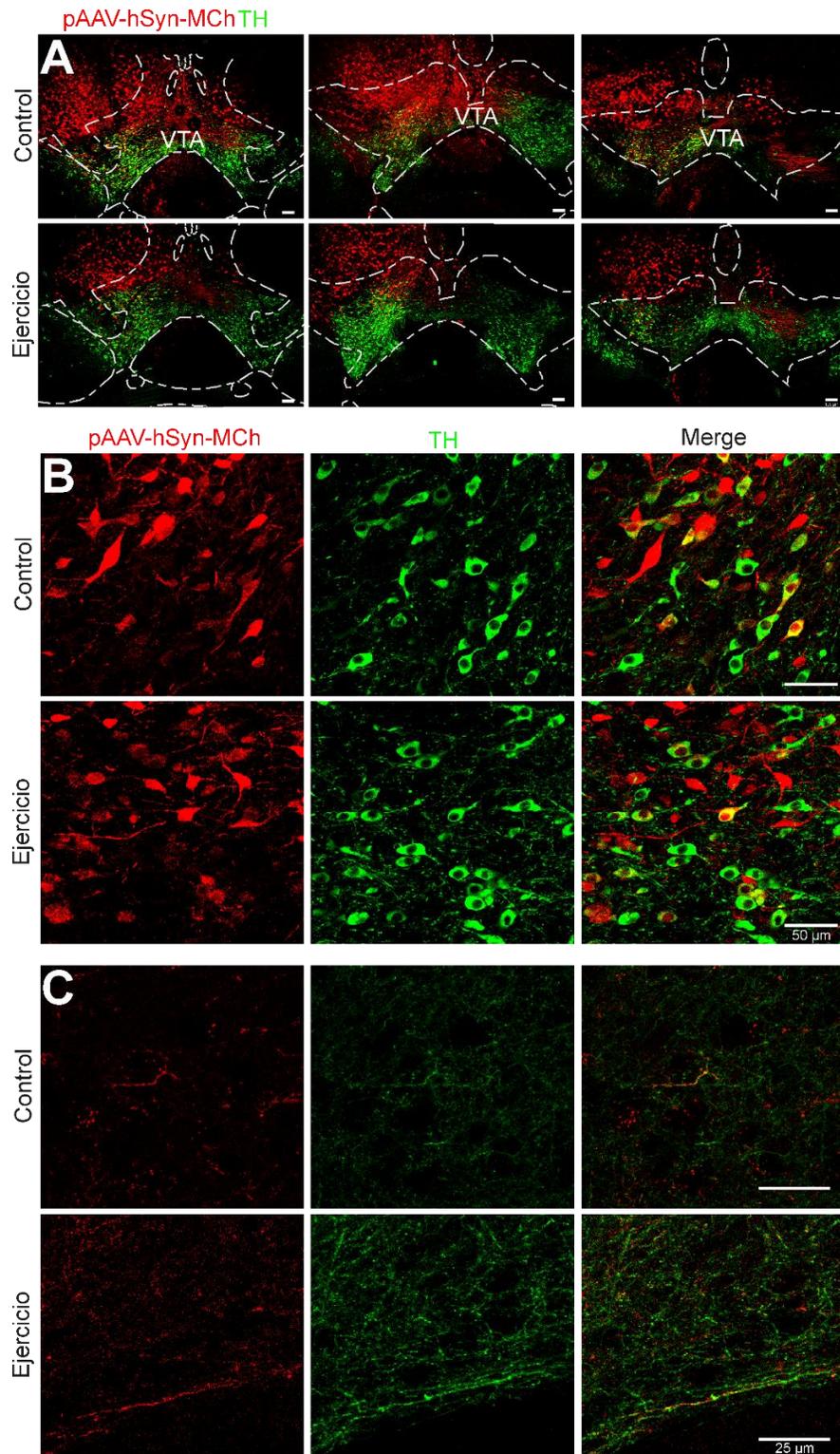


Figura 17. Las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (VTA) infectadas con pAAV-hSyn-mCherry inervan su principal blanco postsináptico, el núcleo accumbens. **A)** La inyección en el área ventral tegmental (VTA) cubrió diversos niveles de ésta (-3.40 a -3.64 mm respecto a Bregma). **B)** Algunas de las células que expresan mCherry co-localizan con TH, lo que sugiere que son neuronas dopaminérgicas **C)** Fibras mCherry⁺ que co-localizan con TH en el núcleo accumbens.

Una vez determinado que la infección de las neuronas del VTA es efectiva y que traza la neurona completa hasta sus sitios blanco clásico, evaluamos la presencia de marca en nuestra región de interés, el giro dentado. En el giro dentado se observó la presencia de fibras del mCherry⁺ en la capa molecular, supra- e infrapiramidal y el hilus en la región dorsal, media y ventral del giro dentado en ambas condiciones, con una mayor presencia en de fibras en el hilus (Fig. 18).

Estos resultados muestran que el trazado anterógrado del VTA con el vector viral es viable en ambos protocolos experimentales y que es útil para evaluar cambios en la conectividad del VTA, dopaminérgica y no dopaminérgica con el giro dentado. Asimismo, presenta la ventaja de que este trazado permitirá evaluar cambios en la conectividad del VTA con otras estructuras del cerebro.

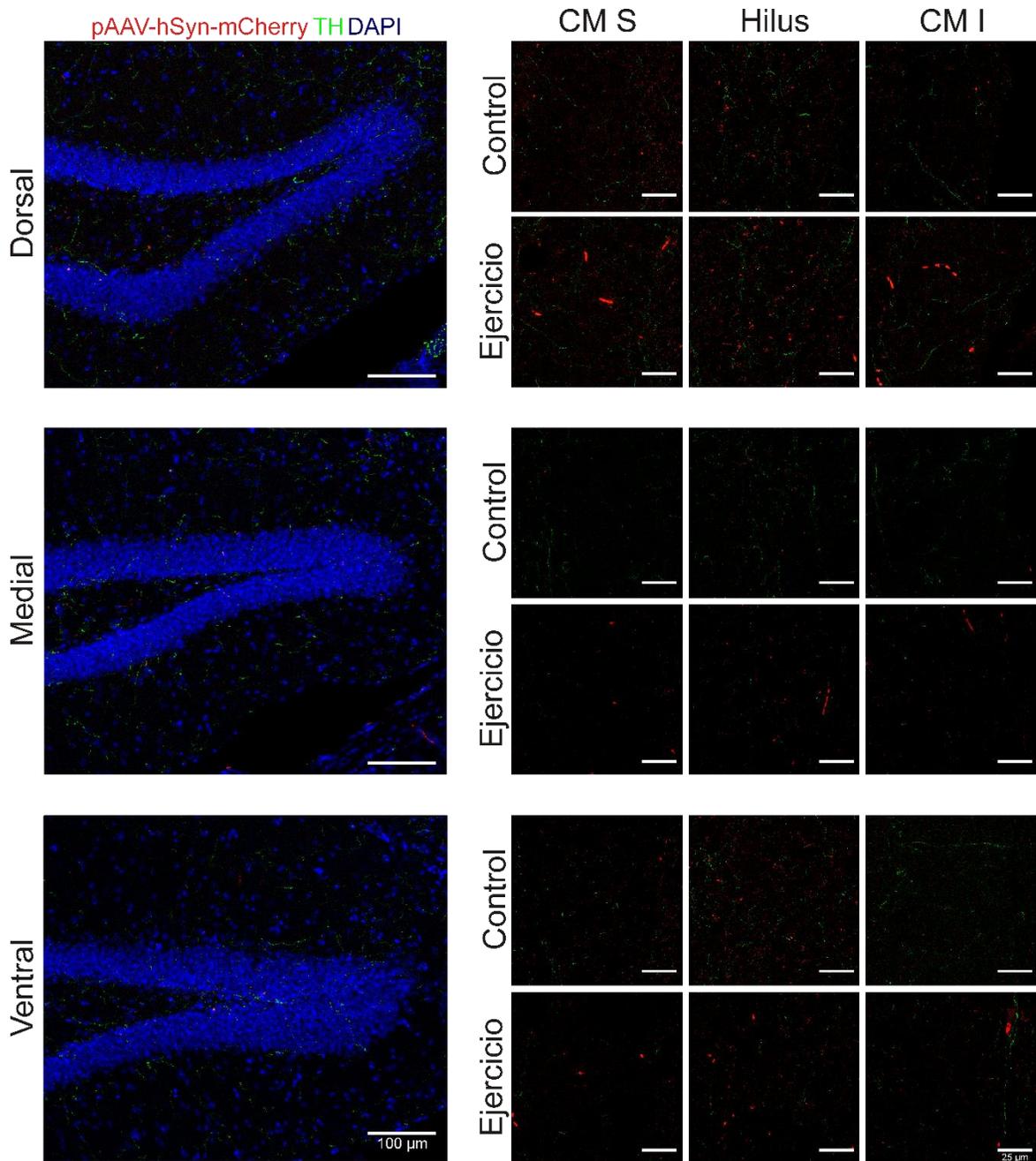


Figura 18. El giro dentado recibe innervación del área ventral tegmental (VTA). El área ventral tegmental envía axones hacia el giro dentado, principalmente, a la zona del hilus, a lo largo del eje dorso-ventral, en ambos grupos experimentales, a diferencia de la capa molecular supra- (CM S) e infrapiramidal (CM I).

Como segunda estrategia se realizó un trazado retrógrado del giro dentado hacia el VTA mediante el uso de un trazador retrógrado (retrobeads rojos y verdes), el cual es transportado retrógradamente por los axones que cruzan el sitio de inyección hacia el soma de las neuronas. Dado que la conectividad extrahipocampal

que recibe el giro dentado puede diferir entre el nivel dorsal y ventral utilizamos retrobeads de dos colores distintos para realizar un trazado retrogrado desde el giro dentado dorsal (rojos; Fig. 19A, B, D y E) y el giro dentado ventral (verdes; Fig. 19H e I) en ambas condiciones experimentales (C, n = 1, E, n = 1). Con esta estrategia encontramos marca retrógrada en el hilus de cortes más ventrales (Fig. 19B, C, E, Fe I) en ambas condiciones experimentales. Esto muestra que los retrobeads fueron transportados retrógradamente por fibras de la vía comisural/asociativa.

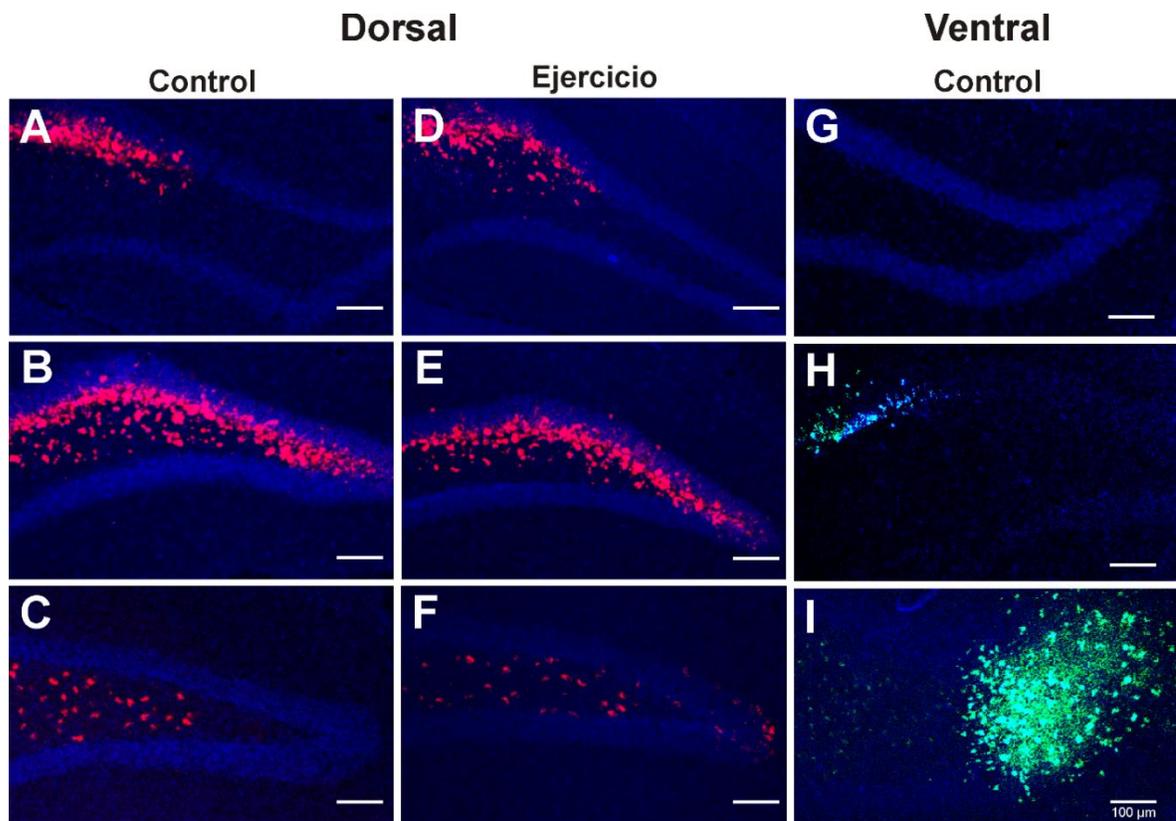


Figura 19. Inyección de retrobeads en el giro dentado dorsal y ventral. El marcaje del giro dentado dorsal (**A y D**) marcó células en cortes del giro dentado medial (**B y E**) y ventral (**C y F**). El marcaje retrógrado del giro dentado ventral (**H**) no marcó células en el giro dentado dorsal (**G**), pero sí en cortes más ventrales (**I**).

Asimismo, el trazado retrógrado del giro dentado dorsal mostró somas de células en estructuras extrahipocampales, como el rafe medial (Fig. 20A), la corteza entorrinal dorsal (Fig. 20CB) y el área supramamilar (Fig. 20C). Por otra parte, con el trazado del giro dentado ventral se encontró marca en el VTA, cerca del borde con el núcleo interpeduncular (Fig. 20D).

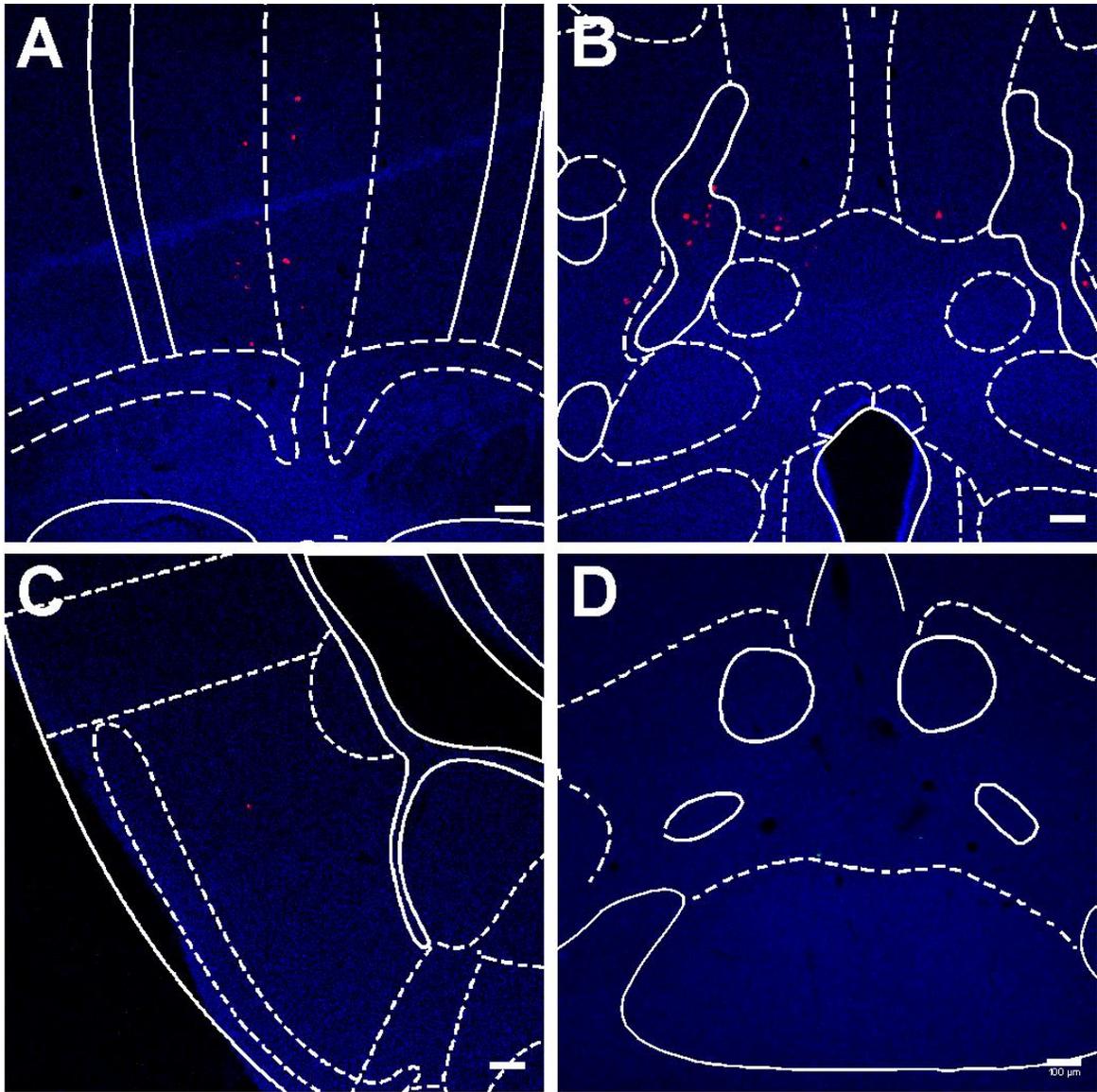


Figura 20. Imagen representativa de células trazadas retrógradamente desde el giro dentado. Células trazadas retrógradamente halladas en el rafe medial (A), área supramamilar (B), corteza entorrinal (C) y área ventral tegmental (D).

Estos datos muestran que el trazado retrógrado con retrobeads en el giro dentado permite evaluar los cambios de conectividad proveniente del VTA. Sin embargo, la única desventaja que tiene este marcador retrógrado es su baja difusión, lo cual no permite marcar un gran número de axones, y por ende el número de neuronas es menor. Si bien la técnica permite la identificación de las entradas sinápticas al giro dentado, se sugiere utilizar un trazador retrógrado que permita una mayor difusión y por consiguiente el trazado de un mayor número de neuronas, la

cual permitirá evaluar no sólo cambios en la conectividad del VTA con el giro dentado, sino que también cambios en otros núcleos inervan al giro dentado.

8. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar los cambios inducidos por dos meses de ejercicio voluntario sobre proliferación celular y la inervación dopaminérgica en el giro dentado. Los resultados mostraron que este periodo de ejercicio no mantiene elevada la proliferación celular en el giro dentado, pero disminuye significativamente la densidad de fibras TH⁺ en el hilus de la región dorsal. Asimismo, resultados preliminares sugieren que el ejercicio puede prevenir la reducción de fibras TH⁺ relacionada con el envejecimiento. Adicionalmente, se establecieron dos estrategias para evaluar cambios específicos de la conectividad del área ventral tegmental con el giro dentado por efecto del ejercicio. En conjunto, estos resultados ayudan a dilucidar los mecanismos mediante los cuales el ejercicio mejora los procesos cognitivos y emocionales.

En humano, el ejercicio tiene efectos benéficos en todo el organismo, incluyendo el mantenimiento del peso corporal (CDC, 2015). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que dos meses de ejercicio no inducen cambios en la ganancia del peso corporal, la cual fue similar a la del grupo control. Esta falta de efecto del ejercicio en el peso corporal no fue debida a falta de ejercicio, ya que el análisis de la distancia total recorrida mostró que los animales se mantuvieron corriendo durante todo el procedimiento experimental, aunque con una disminución gradual, la cual es similar a lo reportado en otros trabajos con ejercicio voluntario a largo plazo (Gutiérrez Jasso, 2017; Cahill *et al.*, 2018). Es probable, que en modelos animales se requiera de un periodo mayor de ejercicio para observar cambios en el peso corporal. De hecho, Droste y colaboradores (2003) mostraron periodos de ejercicio de 4 y 12 semanas no inducen cambios en el peso corporal, pero tiene un impacto en la cantidad de grasa abdominal, la cual es menor (45%) en animales en condición de ejercicio, mientras que el ejercicio a largo plazo (6 meses) sí induce una menor ganancia del peso corporal (Gutiérrez Jasso, 2017).

En humanos se ha observado que el ejercicio aumenta un 2% el volumen hipocampal (Erickson *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestros resultados de los parámetros morfométricos del cerebro (peso, largo y ancho) no mostraron diferencia

entre los grupos. Cabe destacar que en el presente estudio no se realizó la medición específica del volumen hipocampal y dado que éste representa ~5% del peso total del cerebro (de ambos hipocampos) en ratones C57BL/6J de 3-4 meses (Lessard-Beaudoin *et al.*, 2015), dicho incremento de 2% no puede ser evidenciado.

El proceso neurogénico que se lleva a cabo en el giro dentado del hipocampo consta de tres fases: proliferación, diferenciación y maduración. La fase de proliferación consta de las células troncales o PNQ o tipo 1, las cuales se dividen asimétricamente para dar origen a las células tipo 2, subclasificándose en 2a y 2b, éstas generan a las células tipo 3, que salen del ciclo celular para comenzar el proceso de diferenciación y maduración (Overall *et al.*, 2016). van Praag y colaboradores (1999) demostraron por primera vez que el ejercicio puede aumentar la neurogénesis, incrementando la proliferación y la sobrevivencia celular. De los fenotipos celulares proliferativos en la zona subgranular, los tipos 2a y 2b son los únicos que aumentan con el ejercicio (Kronenberg *et al.*, 2003).

En el presente trabajo reportamos que, aunque los ratones se mantengan realizando ejercicio por dos meses, esto no mantienen incrementados los niveles de proliferación celular total. De hecho, el nivel de proliferación celular en el grupo de ejercicio es similar al observado en el grupo control, lo cual podría sugerir un mecanismo de habituación o desensibilización. Sin embargo, Cahill y colaboradores (2018) mostraron que el incremento transitorio no se debe a una habituación o desensibilización, ya que el ejercicio pausado (sólo 4 horas por día) durante 8 semanas tampoco mantiene el incremento en la proliferación celular.

Otra posibilidad es que los niveles de proliferación celular disminuyan debido al estrés inducido por el ejercicio, el cual podría incrementar los niveles de corticosterona (Naylor *et al.*, 2005), y debido a que los niveles altos de corticosterona disminuyen la proliferación celular (Cameron y Gould, 1994), el ejercicio a largo plazo inhibiría dicho incremento. Sin embargo, Hare y colaboradores (2014) reportaron que los niveles de cortisona en ratones con acceso a rueda por 28 días son similares a los de los animales control, esto a pesar de tener la glándula adrenal más grande, similar a lo reportado por Naylor y colaboradores

(2005). Lo anterior sugiere que la reducción de la proliferación celular a los niveles basales en condiciones de ejercicio no es debido a un aumento en los niveles de corticosterona.

Interesantemente, la administración de una sola dosis de memantina, agonista de los receptores NMDA que promueve la proliferación de las células troncales (progenitores neurales quiescentes), aumenta el número de células que incorporaron BrdU. Sin embargo, si la administración de memantina se hace por un tiempo prolongado (8 semanas), ésta no induce un incremento sostenido de proliferación celular (Cahill *et al.*, 2018). En conjunto, estos resultados sugieren que el incremento de la proliferación podría ser transitorio.

De hecho, estudios previos han mostrado que el aumento de la proliferación celular inducido por el ejercicio es observado durante los primeros 10 días de ejercicio voluntario; sin embargo, después de 32 días de ejercicio la proliferación celular regresa a sus niveles basales (Kronenberg *et al.*, 2006). Estos mismos resultados han sido observados en distintas cepas de ratones (Van der Borght *et al.*, 2009; Overall *et al.*, 2013) y rata (Naylor *et al.*, 2005). Es así que, en conjunto estos resultados soportan la idea de que el aumento de la proliferación celular inducido por el ejercicio es transitorio.

Hasta el momento, se desconoce el mecanismo que media el efecto transitorio del ejercicio. Aunque se sabe, que la regulación de la proliferación celular en la zona subgranular del giro dentado implica la participación de diversos factores, como Sonic hedgehog (Shh), factor de crecimiento de fibroblasto 2 (FGF-2), incluso neurotransmisores como dopamina (Gonçalves *et al.*, 2016). En el caso de Shh la sobreexpresión de éste incrementa la proliferación celular en un ~ 300%, mientras que su inhibición con el antagonista ciclopamida reduce la proliferación celular en ~ 50% (Lai *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta el momento no se han evaluado cambios en la expresión de Shh con el ejercicio, donde podría participar mediando este incremento transitorio en la proliferación celular.

Específicamente dopamina, se ha mostrado que incrementa la proliferación de progenitores neurales de amplificación tipo 2a *in vitro*, mediante la activación de

los receptores tipo D1-like (Takamura *et al.*, 2014). Además, se ha mostrado que 10 días de ejercicio voluntario incrementan el mRNA de los receptores D1 en el hipocampo, pero no a 28 días; sin modificar la concentración de dopamina hipocampal (Klein *et al.*, 2016). Es probable que el incremento en la expresión de receptores D1 favorezca su señalización ($G_{\alpha s/olf}$), y correlacione con el incremento transitorio en la proliferación celular. Sin embargo, hasta el momento se desconoce su participación durante el ejercicio.

Todos estos datos sugieren que el ejercicio incrementa la proliferación celular durante los primeros días del ejercicio, posiblemente hasta la segunda semana de ejercicio, regresando posteriormente a su nivel basal, lo que sugiere un incremento transitorio. Esto concuerda con la hipótesis de la existencia de un mecanismo de homeostasis que previene un incremento sostenido de la neurogénesis, el cual podría perturbar la integración de la información en la red neuronal del giro dentado del hipocampo. Por lo cual, el incremento en el número de nuevas neuronas en el giro dentado es uno de los mecanismos adicionales al incremento en la expresión de factores neurotróficos y la vascularización que inducen los cambios plásticos en el hipocampo. Es probable que otros mecanismos como cambios en la conectividad neuronal también estén involucrados, de hecho, estudios muestran que el ejercicio induce cambios en la conectividad sobre las nuevas neuronas generadas durante el ejercicio, incluso desde los primeros 7 días (Vivar *et al.*, 2016; Sah *et al.*, 2017). Además, periodos mayores a un mes de ejercicio inducen cambios en la conectividad de áreas más allá del giro dentado como la corteza entorrinal y el área CA1 del hipocampo (Stranahan *et al.*, 2007). Estos cambios en conectividad podrían estar asociados a modificaciones en los sistemas de neurotransmisores como el glutamatérgico, GABAérgico, colinérgico, serotoninérgico (Vivar y van Praag, 2017) y dopaminérgico (Greenwood *et al.*, 2011).

Específicamente, se ha mostrado que el ejercicio incrementa la concentración de dopamina en el cerebro completo (de Castro y Duncan, 1985) y la expresión del mRNA de TH en el VTA (Greenwood *et al.*, 2011). Dicho núcleo es la principal fuente de dopamina en el hipocampo (Amaral y Lavenex, 2007). Es por

ellos, que exploramos si el ejercicio modifica la inervación dopaminérgica en el giro dentado. Para esto analizamos la densidad de fibras TH⁺ en las capas/áreas del giro dentado a través del eje dorso-ventral en tejido de animales que estuvieron en un protocolo de 2 meses de ejercicio. Nuestros resultados mostraron que la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado es homogénea a través del eje dorso-ventral en animales del grupo control y de ejercicio. Sin embargo, Verney y colaboradores (1985) mostraron que la densidad de fibras TH⁺ es mayor en la parte ventral del giro dentado, lo cual puede deberse a que en este estudio realizaron la denervación de las fibras noradrenérgicas hacia el giro dentado, permitiéndoles observar exclusivamente la inervación de las fibras dopaminérgicas en el giro dentado. Es así que la homogeneidad en la densidad de fibras TH⁺ observada en nuestros experimentos puede deberse a la inervación proveniente de todos los núcleos catecolaminérgicos y no exclusivamente de las fibras dopaminérgicas.

Al analizar la densidad de fibras TH⁺ en las capas/áreas del giro dentado a través del eje dorso-ventral encontramos que el ejercicio disminuyó significativamente la densidad de fibras TH⁺ en el hilus de la región dorsal. Hasta el momento no hay estudios donde analicen el efecto del ejercicio sobre la densidad de fibras TH⁺ en el hipocampo. Sin embargo, esta reducción en el hilus dorsal podría repercutir sobre la función de las células musgosas, las cuales expresan los receptores dopaminérgicos tipo D2 (Gangarossa *et al.*, 2012) incrementando la excitabilidad de estas neuronas mediante la vía Akt/GSK (Etter y Krezel, 2014). No obstante, esta disminución en el hilus dorsal podría ser un efecto temporal, ya que nuestros resultados preliminares muestran que un mes de ejercicio induce un incremento en la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado, mientras que tres meses de ejercicio previenen la pérdida de fibras TH⁺ inducida por el envejecimiento. Esta modulación temporal de la inervación de fibras TH⁺ puede deberse a la plasticidad homeostática, la cual permite al sistema regresar a los niveles basales para permitir futuros cambios y mantener el balance excitación/inhibición en el giro dentado (Turrigiano, 2012). De hecho, se sabe que dopamina modula la entrada glutamatérgica excitadora proveniente de la corteza entorrinal en el giro dentado (Ito y Schuman, 2012), además en el hilus, dopamina modula la excitabilidad de las

células musgosas (Etter y Krezel, 2014). Es probable que los cambios temporales en la inervación dopaminérgica jueguen un papel importante en el balance excitación/inhibición en el giro dentado, los cuales favorezcan los procesos cognitivos durante el ejercicio, dado que la modulación dopaminérgica sobre la entrada proveniente de la corteza entorrinal lateral hacia el giro dentado es importante para la formación de memorias contextuales (Ito y Schuman, 2012).

Nuestro primer acercamiento para la determinación de cambios en la conectividad dopaminérgica hacia el giro dentado fue mediante la identificación de las fibras TH⁺. Sin embargo, con esta identificación no podemos asegurar que las fibras sean exclusivamente dopaminérgicas, ya que tirosina hidroxilasa es la enzima limitante de todas las catecolaminas (Nestler *et al.*, 2009). Además, no nos permite determinar que los cambios observados sean exclusivamente del sistema dopaminérgico proveniente del VTA. Es por ello que estandarizamos dos metodologías de trazado retrógrado y anterógrado que nos permitirán identificar exclusivamente cambios en la conectividad dopaminérgica del VTA hacia el hipocampo.

Los virus adeno-asociados permiten la transfección no tóxica en células postmitóticas, lo cual ha como permitido su uso para el trazado de circuitos neuronales, modificando su especificidad a través de distintos promotores (Betley y Sternson, 2011). En nuestro caso el vector viral tenía el promotor de sinapsina (hSyn), que permitió la infección exclusiva de neuronas (Betley y Sternson, 2011). Dado lo anterior se estableció que el marcaje anterógrado utilizando un vector viral (pAAV-hSyn-mCherry) junto con la inmunofluorescencia de TH permitirá la identificación de la inervación del VTA hacia el giro dentado, dopaminérgica (TH⁺) y no dopaminérgica (TH⁻), así como determinar cambios en la conectividad del VTA hacia el giro dentado inducidos por el ejercicio. Asimismo, este tipo de trazado permite identificar la morfología completa de la neurona (Xu *et al.*, 2015; Harbom *et al.*, 2018), por lo cual, también será posible evaluar cambios en la morfología de dichas neuronas del VTA por efecto del ejercicio. Más aún debido a ello también

será posible evaluar cambios inducidos por el ejercicio en otras áreas inervadas por el VTA.

Por otra parte, el marcaje retrógrado con retrobeads ha permitido la identificación de entradas sinápticas en capas específicas de estructuras como el locus coeruleus (Schwarz *et al.*, 2015), el presubículo (Huang *et al.*, 2017) e incluso el giro dentado del hipocampo (Takeuchi *et al.*, 2016). Dada su baja difusión permite el marcaje de un área muy específica (Katz e Iarovici, 1990); sin embargo, también impide que axones más alejados del sitio de inyección no transporten el trazador, no marcando todas las neuronas que proyecta a la estructura, como en nuestro caso con el giro dentado. Por lo cual sugerimos el uso de otro trazador retrógrado para futuros experimentos, ya que esta técnica también permitirá evaluar cambios inducidos por el ejercicio en la preferencia de núcleos que inervan al giro dentado.

9. CONCLUSIÓN

En conclusión, nuestro trabajo mostró que dos meses de ejercicio no mantienen el incremento de proliferación celular, sugiriendo que el incremento de proliferación celular inducido por el ejercicio es un evento transitorio. Además, nuestros resultados mostraron una disminución significativa en la densidad de fibras TH⁺ en el hilus de la región dorsal; sin embargo, resultados preliminares sugieren que esto podría ser un efecto temporal, ya que un mes de ejercicio incrementa la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado, mientras que 3 meses previene la pérdida de fibras TH⁺ inducida por el envejecimiento. Lo cual podría ser un mecanismo de plasticidad homeostática para regular el balance excitación/inhibición del giro dentado. Finalmente, se establecieron metodologías para identificar exclusivamente la conectividad dopaminérgica del VTA hacia el giro dentado, que en un futuro permitirá determinar cambios por el ejercicio en la conectividad dopaminérgica del VTA y de esta forma dilucidar los mecanismos mediante los cuales el ejercicio físico mejora la salud mental.

10. PERSPECTIVAS

Como perspectivas del presente trabajo, planteamos incrementar la muestra de tejido de animales con 1 y 3 meses de ejercicio para establecer el curso temporal del efecto del ejercicio sobre la densidad de fibras TH⁺ en el giro dentado. Asimismo, utilizando las metodologías aquí establecidas se deben evaluar cambios en la conectividad VTA (mCherry⁺) dopaminérgica (TH⁺) y no dopaminérgica (TH⁻; GABA/glutamato) con el giro dentado por el ejercicio. Así como la conectividad con otros núcleos dopaminérgicos que inerven el giro dentado. En relación con esto, se podría utilizar otro trazador retrógrado que permita identificar los núcleos dopaminérgicos que inerven al giro dentado a través del eje dorso-ventral, debido a que los retrobeads tienen una baja difusión que no permite trazar retrógradamente a todas las neuronas que proyectan hacia el giro dentado. Finalmente, proponemos evaluar cambios en la distribución de los receptores dopaminérgicos en el giro dentado durante el ejercicio, lo cual también podría repercutir sobre el funcionamiento de la red neuronal del giro dentado durante el ejercicio.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Amaral, D. G., H. E. Scharfman y P. Lavenex. 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research* 163: 3-22.
- Amaral, D. y P. Lavenex. 2007. Hippocampal neuroanatomy. En: Andersen, P., R. Morris, D. Amaral, T. Bliss y J. O'Keefe (eds.). *The hippocampus book*. Oxford University Press. Pp. 37-114.
- Babyak, M., J. A. Blumenthal, S. Herman, P. Khatri, M. Doraiswamy, M. Moore, E. Craighead, T. T. Baldewicz y K. R. Krishnan. 2000. Exercise treatment for major depression: maintenance for therapeutic benefit at 10 months. *Psychosomatic Medicine* 62: 633-638.
- Bannerman, D. M., R. Sprengel, D. J. Sanderson, S. B. McHugh, J. N. P. Rawlins, H. Monyer y P. H. Seeburg. 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience* 15: 181-192.
- Beaulieu, J.-M. y R. R. Gainetdinov. 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews* 63: 182-217.
- Beaulieu, J.-M., S. Espinoza y R. R. Gainetdinov. 2015. Dopamine receptors – IUPHAR review 13. *British Journal of Pharmacology* 172: 1-23.
- Bethus, I., D. Tse y R. G M. Morris. 2010. Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *The Journal of Neuroscience* 30: 1610-1618.
- Betley, J. N. y S. M. Sternson. 2011. Adeno-associated viral vector for mapping, monitoring, and manipulating neural circuits. *Human Gene Therapy* 22: 669-677.
- Björklund, A. y S. B. Dunnett. 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neuroscience* 30: 194-202.

- Cahill, S. P. J. D. Cole, R. Q. Yu, J. Clemans-Gibbon y J. S. Snyder. 2018. Differential effects of extended exercise and memantine treatment on adult neurogenesis in male and female rats. *Neuroscience* 390: 241-255.
- Cameron, H. A. y E. Gould. 1994. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61: 203-209.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2015. Physical activity for a healthy weight. Disponible en: https://www.cdc.gov/healthyweight/physical_activity/index.html
- Colcombe, S. y A. F. Kramer. 2003. Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychological Science* 14: 125-130.
- Cooney, G. M., K. Dwan, C. A. Greig, D. A. Lawlor, J. Rimer, F. R. Waugh, M. McMurdo y G. E. Mead. 2017. Exercise for depression (review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 9: 1-157.
- de Castro, J. M. y G. Duncan. 1985. Operantly conditioned running: effects on brain catecholamine concentrations and receptor densities in the rat. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 23: 495-500.
- Deng, W., J. B. Aimone y F. H. Gage. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience* 11: 339-350.
- Ding, Q., S. Vaynman, P. Souda, J. P. Whitelegge y F. Gomez-Pinilla. 2006. Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis. *European Journal of Neuroscience* 24: 1265-1276.
- Dishman, R. K., H.-R. Berthoud, F. W. Booth, C. W. Cotman, V. R. Edgerton, M. R. Fleshner, S. C. Gandevia, F. Gomez-Pinilla, B. N. Greenwood, C. H. Hillman, A. F. Kramer, B. E. Levin, T. H. Moran, A. A. Russo-Neustandt, J. D. Salamone, J. D. Van Hoomissen, C. E. Wade, D. A. York y M. J. Zigmond. 2005. Neurobiology of exercise. *Obesity* 14: 345-356.

- Droste, S. K., A. Gesing, S. Ulbricht, M. B. Müller, A. C. E. Linthorst y J. M. H. M. Reul. 2003. Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* 144: 3012-3023.
- Encinas, J. M., A. Vaahtokari y G. Enikolopov. 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8233-8238.
- Erickson, K. I., M. W. Voss, R. S. Prakash, C. Basak, A. Szabo, L. Chaddock, J. S. Kim, S. Heo, H. A., S. M. White, T. R. Wojcicki, E. Mailey, V. J. Vieira, S. A. Martin. B. D. Pence, J. A. Woods, E. McAuley y A. F. Kramer. 2011. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 108: 3017-3022.
- Etter, G. y W. Krenz. 2014. Dopamine D2 receptor control hilar mossy cells excitability. *Hippocampus* 24: 725-732.
- Fanselow, M. S. y H.-W. Dong. 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structure? *Neuron* 65: 7-19.
- Franklin, K. B. J. y G. Paxinos. 2007. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. 350 p.
- Gage, F. H. y H. van Praag. 2002. Neurogenesis in adult brain. En: Davis, K. L., D. Charney, J. T. Coyle y C. Nemeroff (eds.). *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. Lippincott Williams & Wilkins. Pp. 109-117.
- Gangarossa, G., S. Longueville, D. de Bundel, J. Perroy, D. Hervé, J.-A. Girault y E. Valjent. 2012. Characterization of dopamine D1 and D2 receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus* 22: 2199-2207.
- Gerecke, K. M., Y. Jiao, A. Pani, V. Pagala y R. J. Smeyne. 2010. Exercise protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Brain Research* 1341: 72-83.
- Gonçalves, J. T., S. T. Schafer y F. H. Gage. 2016. Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell* 167: 897-914.

- Granado, N., O. Ortiz, L. M. Suárez, E. D. Martín, V. Ceña, J. M. Solís y R. Moratalla. 2008. D1 but not D5 dopamine receptors are critical for LTP, spatial learning, and LTP-induces arc and zif268 expression in the hippocampus. *Cerebral Cortex* 18: 1-12.
- Greenwood, B. N., T. E. Foley, T. V. Le, P. V. Strong, A. B. Loughridge, H. E. W. Day y M. Fleshner. 2011. Long-term voluntary wheel running is rewarding and produces plasticity in the mesolimbic reward pathway. *Behavioural Brain Research* 217: 354-362.
- Gujral, S., H. Aizenstein, C. F. Reynolds III, M. A. Butters y K. I. Erickson. 2017. Exercise effects on depression: possible neural mechanisms. *General Hospital Psychiatry* 49: 2-10.
- Gutiérrez Jasso, F. I. 2017. Efecto del ejercicio a corto y a largo plazo en la neurogénesis hipocampal. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 67 p.
- Hallgren, M., B. Stubbs, D. Vancampfort, A. Lundin, P. Jääkallio y Y. Forsell. 2017. Treatment guidelines for depression: greater emphasis on physical activity is needed. *European Psychiatry* 40: 1-3.
- Harada, C. N., M. C. N. Love y K. Triebel. 2013. Normal cognitive aging. *Clinics in Geriatric Medicine* 29: 737-752.
- Harbom, L. J, T. L. Rudisill, N. Michel, K. A. Litwa, M. P. Beenhakker y M. J. McConnell. 2018. The effect of rho kinase inhibition on morphological and electrophysiological maturity in iPSC-derived neurons. *Cell and Tissue Research*: DOI: 10.1007/s00441-018-2942-7.
- Hare, B. D., J. A. Beierle, D. J. Toufexis, S. E. Hammack y W. A. Falls. 2014. Exercise-associated changes to acute restraint stress: evidence for increased adrenal sensitivity and reduce corticosterone response duration. *Neuropsychopharmacology* 39: 1262-1269.

- Hennerici, M. G. 2014. Introduction. En: Szabo, K. y M. G. Hennerici (eds.). The hippocampus in clinical neuroscience. *Frontiers of Neurology and Neuroscience* volume 34. KARGER. Pp. 1-5.
- Höglinger, G. U., O. Arias-Carrión, B. Ipach y W. H. Oertel. 2014. Origin of the dopaminergic innervation of adult neurogenic areas. *The Journal of Comparative Neurology* 552: 2336-2348.
- Höglinger, G. U., P. Rizk, M. P. Muriel, C. Duyckaerts, W. H. Oertel, I. Caille y E. C. Hirsch. 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature Neuroscience* 7: 726-735.
- Huang, L.-W., J. Simmonnet, M. Nassar, L. Richevaux, R. Lofredi y D. Fricker. 2017. Laminar localization and projection-specific properties of presubicular neurons targeting the lateral mammillary nucleus, thalamus, or medial entorhinal cortex. *eNeuro* 4: e0370-16.2017.
- Ito, H. T. y E. M. Schuman. 2012. Functional division of hippocampal area CA1 via modulatory gating of entorhinal cortical inputs. *Hippocampus* 22: 372-387.
- Jiang, M. y J. W. Swann. 1997. Expression of calretinin in diverse neuronal populations during development of rat hippocampus 81: 1137-1154.
- Katz, L. C. y D. M. Iarovici. 1990. Green fluorescent latex microspheres: a new retrograde tracer. *Neuroscience* 31: 511-520.
- Kheirbek, M. A. y R. Hen. 2011. Dorsal vs ventral hippocampal neurogenesis: implication for cognition and mood. *Neuropsychopharmacology Reviews* 36: 373-374.
- Klein, C., J. Rasiska, L. Empl, M. Sparenberg, A. Poshtiban, E. G. Hain, D. Iggena, M. Rivalan, Y. Winter y B. Steiner. 2016. Physical exercise counteracts MPTP-induced changes in neural precursor cell proliferation in the hippocampus and restores spatial learning but not memory performance in the water maze. *Behavioural Brain Research* 307: 227-238.

- Kronenberg, G., A. Bick-Sander, E. Bunk, C. Wolf, D. Ehninger y G. Kempermann. 2006. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in mouse dentate gyrus. *Neurobiology of Aging* 27: 1505-1513.
- Kronenberg, G., K. Reuter, B. Steiner, M. D. Brandt, S. Jessberger, M. Yamaguchi y G. Kempermann. 2003. Subpopulation of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *The Journal of Comparative neurology* 467: 455-463.
- Lai, K., B. K. Kaspar, F. H. Gage y D. V. Schaffer. 2003. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature Neuroscience* 6: 21-27.
- Lessard-Beaudoin, M., M. Laroche, M.-J. Demers, G. Grenier, R. K. Graham. 2015. Characterization of age-associated changes in peripheral organ and brain region weights in C57BL/6 mice. *Experimental Gerontology* 63: 27-34.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler y R. S. Duman. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 20: 9104-9110.
- Mello, E. M., T. Cevada, R. S. Monteiro-Junior, T. Teixeira, E. da Cruz, E. Lattari, C. Bloir y A. Camaz. 2013. Neuroscience of exercise: from neurobiology mechanisms to mental health. *Neuropsychobiology* 68: 1-14.
- Ming, G. y H. Song. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70: 687-702.
- Mu, Y., G. Zhao y F. G. Gage. 2011. Dopaminergic modulation of cortical inputs during maturation of adult-born dentate granule cells. *The Journal of Neuroscience* 31: 4113-4123.
- Naylor, A. S., A. I. Persson, P. S. Eriksson, I. H. Jossdottir y T. Thorlin. 2005. Extended voluntary running inhibits exercise-induced adult hippocampal progenitor proliferation in the spontaneous hypertensive rat. *Journal of Neurophysiology* 93: 2406-2414.

- Nestler, E. J., S. E. Hyman y R. C. Malenka. 2009. *Molecular Neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*. McGraw-Hill. 498 p.
- O'Carroll, C. M., S. J. Martin, J. Sandin, B. Frenguelli y R. G. M. Morris. 2006. Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory *Learning and Memory* 13: 760-769.
- O'leary, O. F. y J. F. Cryan. 2014. A ventral view on antidepressant action: roles for adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis. *Trends in Pharmacological Science* 35: 675-687.
- Overall, R. W. T. L. Walker, O. Leiter, S. Lenke, S. Ruhwald y G. Kempermann. 2013. Delayed and transient increase of adult hippocampal neurogenesis by physical exercise in DBA/2 mice. *PLOS ONE* 8: e83797.
- Overall, R. W., T. L. Walker, T. J. Fischer, M. D. Brandt y G. Kempermann. 2016. Different Mechanisms must be considered to explain the increase in hippocampal neural precursor cell proliferation by physical activity. *Frontiers in Neuroscience* 10: 362.
- Papez, J. W. 1937. A proposed mechanism of emotion. *The Journal Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 38: 725-743.
- Penedo, F. J. y J. R. Dahn. 2005. Exercise and well-being: a review of mental and physical health benefits associated with physical activity. *Current Opinion in Psychiatry* 18: 189-193.
- Perederiy, J. V. y G. L. Westbrook. 2013. Structural plasticity in the dentate gyrus – revisiting a classic injury model. *Frontiers in Neuronal Circuits* 7: 17.
- Sah, N., B. D. Peterson, S. T. Lubejko, C. Vivar y H. van Praag. 2017. Running reorganizes the circuitry of one-week-old adult-born hippocampal neurons. *Scientific Reports* 7: 10903.
- Sahay, A. y R. Hen. 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience* 10: 1110-1115.

- Schrag, A. y R. N. Taddei. 2017. Depression and anxiety in Parkinson's Disease. *International Review of Neurobiology* 133: 623-655.
- Schultz, C. y M. Engelhardt. 2014. Anatomy of the hippocampal formation. En: Szabo, K. y M. G. Hennerici (eds.). *The hippocampus in clinical neuroscience. Frontiers of Neurology and Neuroscience volume 34. KARGER. Pp. 6-17.*
- Schwarz, L. A., K. Miyamichi, X. J. Gao, K. T. Beier, B. Weissbourd, K. E. DeLoach, J. Ren, S. Ibanes, R. C. Malenka, E. J. Kremer y L. Luo. 2015. Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenaline circuit. *Nature* 524: 88-92.
- Scoville, W. B. y B. Milner. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 20:11-21.
- Snyder, J. S., S. C. Ferrante, H. A. Cameron. 2012. Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *PLOS ONE* 7: e48757.
- Stranahan, A. M., D. Khalil y E. Gould. 2007. Running induces widespread structural alteration in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus* 17: 1017-1022.
- Szuhany, K. L., M. Bugatti, M. W. Otto. 2014. A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Psychiatric Research* 60: 56-64.
- Takamura, N., S. Nakagawa, T. Matsuda, S. Boku, A. Kato, N. Song, Y. An, Y. Kitaichi, T. Inoue, T. Konayama e I. Kusumi. 2014. The effects of dopamine on adult hippocampal neurogenesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 50: 116-124.
- Takeuchi, T., A. J. Duzkiewicz, A. Sonnenborn, P. A. Spooner, M. Yamasaki, M. Watanabe, C. C. Smith, G. Fernández, K. Deisseroth, R. Greene y R. G. M. Morris. 2016. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature* 537: 357-362.

- Tong, L., H. Shen, V. M. Perreau, R. Balazs y C. W. Cotman. 2001. Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiology of Disease* 8: 1046-1056.
- Turrigiano, G. 2012. Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: a005736.
- Van der Borght, K., D. É. Kóbor-Nyakas, K. Klauke, B. J. L. Eggen, C. Nyakas, E. A. Van ver Zee y P. Meerlo. 2009. Physical exercise leads to rapid adaptation in hippocampal vasculature: temporal dynamic and relationship to cell proliferation and neurogenesis. *Hippocampus* 19: 928-936.
- van Praag, H. 2009. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends in Neurosciences* 32: 283-290.
- van Praag, H., G. Kempermann y F. H. Gage. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience* 2(3): 266-270.
- Vaynman, S., Z. Ying y F. Gómez-Pinilla. 2004. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience* 20: 2580-2590.
- Verney, C., M. Baulac, B. Berger, C. Alvarez, A. Vigny y K. B. Helle. 1985. Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neuroscience* 14: 1039-1052.
- Vivar, C. y H. van Praag. 2013. Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Frontiers in Neural Circuits* 7: 15.
- Vivar, C. y H. van Praag. 2017. Running changes the brain: the long and the short of it. *Physiology* 32: 410-424.
- Vivar, C., B. D. Peterson y H. van Praag. 2016. Running rewires the neuronal network of adult-born dentate granule cells. *NeuroImage* 131: 29-41.

- WHO (World Health Organization). 2001. Mental disorders affect one in four people. Disponible en: http://www.who.int/whr/2001/media_centre/press_release/en/
- WHO (World Health Organization). 2016. Mental health: strengthening our response. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs220/en/>
- WHO (World Health Organization). 2017. Mental disorders. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/en/>
- WHO (World Health Organization). 2018. Ageing and health. Disponible en: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
- Xu, W. y T. C. Südhof. 2015. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339: 1290-1295.
- Zhang, T., J. Hong, T. Di y L. Chen. 2016. MPTP impairs dopamine D1 receptor-mediated survival of newborn neurons in ventral hippocampus to cause depressive-like behaviors in adult mice. 2016. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9: 101.
- Zhou, Q.-G., D. Lee, E. J. Ro y H. Suh. 2016. Regional-specific effect of fluoxetine on rapidly dividing progenitor along the dorsoventral axis of the hippocampus. *Scientific Reports* 6: 35572.

El Jurado aprueba esta tesis

Dra. María del Carmen Vivar Estudillo
Director de tesis

Dr. Jorge Aceves Ruíz
Sinodal

Dr. José Antonio Arias Montaña
Sinodal