

Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales

Proyecto de Investigación para alumnos de las Carreras de la Facultad de Ciencias de la Salud

Solicitud de Aprobación y Apoyo a Proyectos de Investigación y Vinculación Tecnológica

1. DENOMINACIÓN DEL PROYECTO:

“Efectos del ejercicio y el medio enriquecido sobre la memoria de reconocimiento de objetos de ratas”.

2. CARACTERÍSTICAS DEL PROYECTO:

Tipo de Actividad: Ciencias Básicas.

Disciplinas Científicas: El presente proyecto tiene vinculación con saberes y procedimientos empleados en Neurociencia cognitiva, Fisiología, Metodología de la Investigación y Estadística aplicada a Ciencias de la Salud.

Campo de Aplicación: Ciencias de la Salud, y particularmente en Medicina preventiva.

3. DURACIÓN DEL PROYECTO:

Fecha de iniciación: A determinar en función de la convocatoria de alumnos interesados en participar.

Duración total: 4 meses.

4. DIRECTOR RESPONSABLE DEL PROYECTO:

Apellido y Nombre: Pietrelli, Adriana (autor)

Título de Grado. Lic. En Ciencias Biológicas (FCEyN, UBA).

Cargo en la Institución: Investigador y Coord. de Investigación. Responsable Técnico del Bioterio de la Facultad de Medicina UCES. e-Mail: apietrelli@uces.edu.ar

5. EQUIPO AFECTADO AL PROYECTO (No incluir Director responsable).

5.1 Alumnos pertenecientes a las Carreras de la Facultad de Ciencias de la Salud de UCES (hasta 4 estudiantes regulares).

5.2 Personal de Apoyo.

Apellido y Nombre: Paglia, Nora P.

Título Profesional: Médica Veterinaria (UBA)

e-Mail: nora.paglia@gmail.com

Cargo o función habitual: Veterinaria especialista en Animales de Laboratorio en el Bioterio de la UCES y Directora del Bioterio del Instituto de Investigación Cardiovascular “Dr. N. Taquíni” (ININCA), (UBA- CONICET).

5.3 Personal de Apoyo.

Apellido y Nombre: Orzuza, Ricardo

Título Profesional: Técnico en Bioterios (UBA) y Técnico de Laboratorio (UBA).

e-Mail: orzuza.ricardo@yahoo.com.ar

Cargo o función habitual: Técnico y ayudante de laboratorio del Bioterio de UCES y Responsable Técnico a cargo del Bioterio de la Fac. de Odontología (UBA-CONICET).

6. PLAN DE TRABAJO:

6.1 Hipótesis: El ejercicio moderado y el medio enriquecido tienen un efecto amplificador y neuroprotector de la memoria declarativa.

6.2 Objetivo General: Estudiar los posibles efectos combinados del ejercicio regular y moderado y del enriquecimiento ambiental sobre las distintas fases de la memoria de reconocimiento de objetos vinculada a estructuras dependientes e independientes del hipocampo, como la corteza perirhinal. Se estudiarán indicadores de discriminación de la novedad y curvas de olvido, en ratas jóvenes sometidas a entrenamiento moderado en el treadmill-running y/o a la estimulación sensorial y física en un medio enriquecido *ad hoc*.

6.3 Objetivos Específicos:

a- Que el alumno conozca, comprenda y participe en las distintas etapas del desarrollo de un proyecto de investigación.

b-Que vincule conocimientos previos con aquellos derivados de la metodología específica de investigación.

c-Que el alumno comprenda la importancia de la utilización de modelos animales apropiados para generar conocimiento útil y altamente aplicable a su carrera y a la salud humana, en general.

d-Que aprenda a desarrollar el juicio crítico, la capacidad de observación y de síntesis a la hora de registrar, analizar y presentar los datos y resultados experimentales.

e- Que el alumno aprenda la importancia del trabajo en equipo, el compromiso y el cumplimiento de rutinas de trabajo con su reactivo biológico.

7. PLAN DE FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS (formación de becarios alumnos en investigación):

La Universidad considera de vital importancia que exista transferencia a los estudiantes del conocimiento que se produce en el Dto. de Investigación, porque complementa la formación de grado que reciben los jóvenes y le generan nuevas motivaciones, así como desafíos intelectuales relevantes y novedosos que ampliarán su perspectiva e inserción profesional.

8. DESCRIPCIÓN RESUMIDA DEL PROYECTO:

40 ratas Wistar machos serán asignadas a alguno de 4 grupos experimentales: 1) Control, Medio Pobre, n=10; 2) Medio enriquecido, n=10; 3) Medio enriquecido + ejercicio regular, n=10; 4) Ejercitados en el treadmill-running, en medio pobre, n=10.

Los animales tendrán un período de habituación de 15 días a la sala de alojamiento, y a partir de los 2 meses de edad, pasarán a alguna de las 4 condiciones, hasta que cumplan 12-16 semanas de ejercicio en el treadmill motorizado y/o exposición al enriquecimiento ambiental. Al finalizar los tratamientos se los evaluará con un ensayo conductual en el Bow-Tie Maze para determinar los posibles efectos de estos dos factores en la memoria de reconocimiento de objetos, particularmente en la discriminación de objetos nuevos.

Al final del test, se realizarán: 1) obtención de plasmas; 2) sacrificios para obtener muestras frescas de áreas relacionadas con la memoria y aprendizaje (corteza perirhinal, hipocampo, corteza frontal, estriado y rafe; 3) y muestras fijadas de cerebro. Las muestras obtenidas serán congeladas a -20°C ó -70°C, según el tipo de muestra, hasta ser estudiadas oportunamente.

9. ESTUDIOS PRELIMINARES:

Este trabajo. “**Long-term effects of chronic aerobic exercise on object recognition memory in rats**” fue presentado en el XXVII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. 1-5 de Octubre, 2012. Huerta Grande, Córdoba, Argentina, en el área de: Cognition, Behavior, and Memory, en la modalidad póster con breve exposición oral.

Poster Number 102 / Session I

Long-term effects of chronic aerobic exercise on object recognition memory in rats.

Adriana Pietrelli^{1, 2}, J. J. Lopez-Costa², N. Basso³, Alicia Brusco²

1 Dto de Investigación de la Fac. de Medicina UCES

2 Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof- Dr. E. de Robertis”, Fac de Medicina, UBA-CONICET

3 Inst. Fisiopatología Cardiovascular, UBA.

ABSTRACT (P102): Moderate exercise produces a great benefit on brain health and behavior. The objective of the present study was to investigate the effects of chronic aerobic exercise on age-dependent cognitive decline that may occur independently and in parallel with changes in hippocampal function in rats. We designed an aerobic training program with the treadmill running following the basic principles of human training, and assuming that rats have the same physiological adaptations. The discriminative ability to detect non spatial changes (substitution of a familiar object with a new one), and spatial changes (displacement of a familiar object) were studied in middle age (8 months) and old age rats (18 months) with standard spontaneous object recognition procedures. Trials consisted of 3 consecutive days of habituation in the Open Field, followed by sample and choice phases, separated by 24 hs of delay. Trained rats, regardless of age, showed greater exploratory activity in both phases. Middle age exercised rats showed greater discriminative response to novelty. However, old rats, regardless of exercise, had no differences in this parameter. In contrast, related to spatial and contextual changes, the greatest long-term effects of exercise on hippocampus-dependent spatial memory were detected in old runners. We conclude that long-term, regular aerobic exercise has a positive impact on non-spatial and spatial components of declarative memory, especially in old rats.

Efectos en el largo plazo del ejercicio aeróbico crónico sobre la memoria de reconocimiento de objetos en ratas.

Pietrelli, A^{1,2}; Lopez-Costa, J. J.²; Basso, N^{1,3}; Brusco, A².

1 Dto. de Investigación, Fac. Medicina, UCES; 2 IBCN "Prof. E. De Robertis", Fac. Medicina, UBA-CONICET; 3 Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, UBA-AFIC

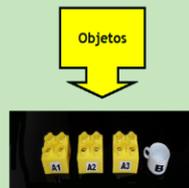
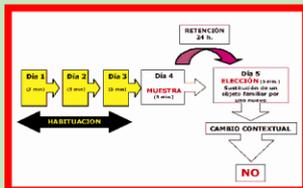
1 INTRODUCCIÓN

Existe un creciente interés en estudiar factores relacionados con el estilo de vida e intervenciones que mejoren la capacidad cognitiva de adultos mayores, y que reduzcan el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas asociadas a la vejez. La actividad física es considerada uno de los factores más importantes y accesibles para prevenir y proteger la función cerebral de los efectos deletéreos del envejecimiento y el sedentarismo. Existe evidencia que el ejercicio aeróbico de intensidad moderada tiene un impacto altamente positivo sobre la salud cerebral, y la plasticidad conductual.

OBJETIVO

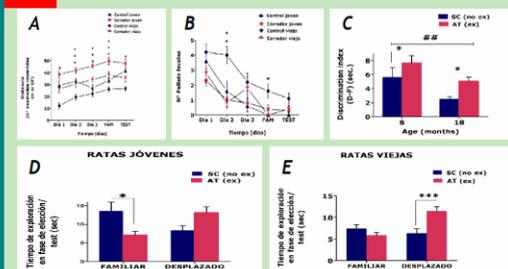
El propósito de este estudio fue investigar los posibles efectos del ejercicio aeróbico crónico sobre la declinación cognitiva dependiente de la edad que podría ocurrir independientemente, y en paralelo con cambios en la función hipocámpal.

3 EXPERIMENTO 1: Reconocimiento de Objetos nuevos en el Open Field



Ratas AT (n=10) y SC (n=10) fueron habituada al OF vacío durante 3 días consecutivos. En el 4to. día se expusieron a dos objetos idénticos. Luego de un retraso de 24 h., fueron nuevamente expuestas a dos objetos: uno familiar y otro nuevo, en las mismas posiciones relativas.

6 RESULTADOS

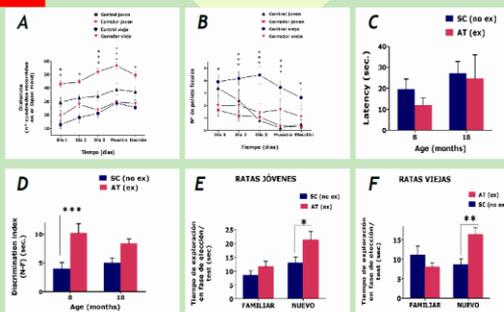


Los jóvenes AT mostraron mayor locomoción (A) que los restantes grupos. En todos se estabilizó a partir del 3er. día. Las deposiciones fecales (B) fueron en todos significativamente menores con el correr de los días. La respuesta discriminativa (C) fue significativamente mayor en los AT, pero fue modulada por la edad. Notablemente, los jóvenes SC(D-E) exploraron más tiempo el objeto familiar que los viejos SC.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

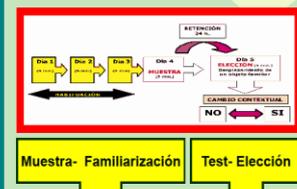
Ratas macho Wistar (n= 120) fueron sometidas a entrenamiento aeróbico durante toda su vida (AT, n=60) desde los 2 meses de edad hasta los 18 meses. Los controles sedentarios (SC, n= 60) fueron puestos en la cinta sin movimiento. Se diseñó una rutina de entrenamiento aeróbico de moderada intensidad que se ajustó según performance y edad, manteniéndose en un 60-70 % del máximo consumo de oxígeno. A los 8 (mediana edad) y a los 18 meses de edad (vejez) se evaluó la memoria de reconocimiento de objetos (SOR) nuevos y desplazados en el Open Field (OF), con y sin cambio contextual, que consistió en cambiar el piso negro del OF por un piso blanco, entre la fase de familiarización y la de test. El entrenamiento físico fue suspendido durante los respectivos ensayos para evitar posibles efectos adversos sobre la performance cognitiva. Los experimentos fueron realizados en la fase oscura del ciclo (6 am - 18 pm) y con la sala iluminada con luz roja. Durante los 3 días de habituación y las fases de muestra y test se midieron conductas basales: locomoción y deposiciones fecales como indicador de ansiedad.

4 RESULTADOS



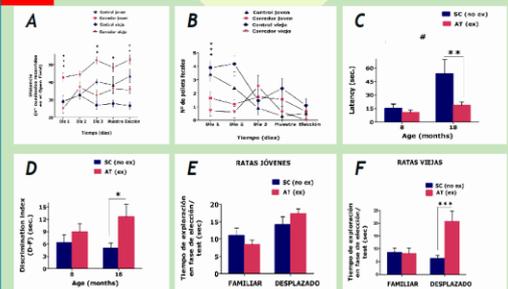
Los jóvenes AT mostraron mayor locomoción (A) que los restantes grupos. En todos se estabilizó a partir del 3er. día. Las deposiciones fecales (B) fueron en todos significativamente menores con el correr de los días. El tiempo que tardaron en contactar al objeto nuevo (C) no mostró diferencias. La rt. discriminativa (D) fue mayor en los AT jóvenes. E y F, indican que los AT exploran mayor tiempo el objeto nuevo que los SC.

7 EXPERIMENTO 2B: Reconocimiento de Objetos desplazados con cambio contextual en el Open Field



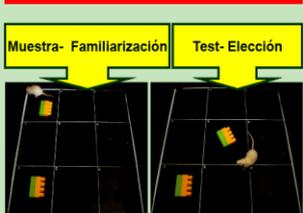
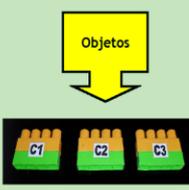
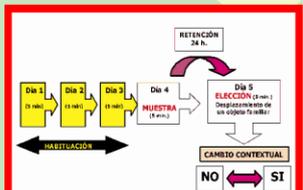
2B: Ratas AT (n=10) y SC (n=10) fueron habituada al OF vacío durante 3 días consecutivos. En el 4to. día se expusieron a dos objetos idénticos. Luego de un retraso de 24 h., fueron nuevamente expuestas a los dos objetos familiares : uno en la misma posición, y el otro, desplazado, con cambio contextual entre la fase de familiarización y la fase de test. El cambio consistió en generar un contexto incongruente con el cambio de piso de negro a blanco.

8 RESULTADOS



Los jóvenes AT mostraron mayor locomoción (A) que los restantes grupos. En todos se estabilizó a partir del 3er. día. Las deposiciones fecales (B) fueron en todos significativamente menores con el correr de los días. La latencia (C) fue mayor en los SC viejos indicando menor velocidad de procesamiento de la información. El tiempo de exploración del objeto desplazado (E-F) y la rt. discriminativa (D) fue notablemente mayor en los AT viejos, y en los jóvenes no hubo diferencias.

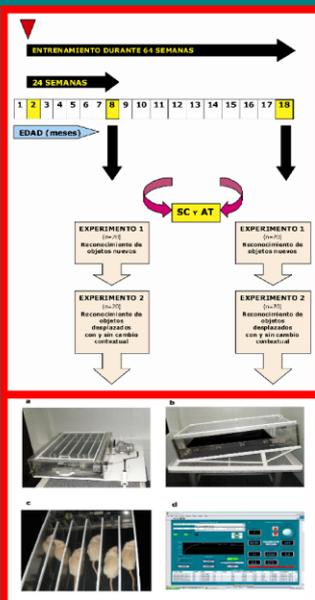
5 EXPERIMENTO 2A: Reconocimiento de Objetos desplazados sin cambio contextual en el Open Field



2A: Ratas AT (n=10) y SC (n=10) fueron habituada al OF vacío durante 3 días consecutivos. En el 4to. día se expusieron a dos objetos idénticos. Luego de un retraso de 24 h., fueron nuevamente expuestas a los dos objetos familiares : uno en la misma posición, y el otro, desplazado, sin cambio contextual.

9 CONCLUSIÓN

Concluimos que el ejercicio aeróbico crónico tuvo un impacto positivo sobre componentes no espaciales y espaciales de la memoria declarativa, en el largo plazo. Los animales viejos, independientemente del ejercicio mostraron menor discriminación de la novedad que los jóvenes, mientras que la capacidad de discriminación de objetos familiares que cambiaron de posición se vio notablemente aumentada por efecto del ejercicio y modulada por la edad, especialmente en los AT viejos.



10. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO POR ETAPAS.

1-SEMANA 1 a 6. Los animales permanecerán alojados bajo el cuidado del personal del Bioterio hasta cumplir 6 semanas de edad.

2- SEMANA 7. Se realizará la habituación al equipo, operadores y protocolos.

3- SEMANA 8. Inicio de los tratamientos bajo la supervisión del Director y personal de apoyo.

4- MES 1-3 (12 semanas): Aplicación de los tratamientos siguiendo los respectivos protocolos (alumnos).

5- MES 4 (4 semanas): Test conductual, registro y análisis de datos.

TÍTULO: “Efectos del ejercicio y el medio enriquecido sobre la memoria de reconocimiento de objetos de ratas”.

1. INTRODUCCIÓN:

Es sabido que nuestros hábitos de vida impactan sobre nuestra salud. Factores de distinta naturaleza como: dieta, consumo de alcohol y tabaco, participación en actividades socio-recreativas e intelectuales, soporte psicológico y emocional, sedentarismo, obesidad, práctica de actividades físicas programadas y regulares, etc., pueden afectar significativamente nuestra calidad y expectativa de vida.

De todos los factores antes mencionados, el ejercicio moderado, regular [6,7,10] y la estimulación cognitiva constituyen dos aspectos fundamentales por su accesibilidad, masividad, capacidad inclusiva, y bajo costo. Ambos pueden ser practicados por sujetos de distintas edades y condiciones socio-económicas con resultados positivos sobre la salud en general, y especialmente sobre la funcionalidad cerebral y la prevención de enfermedades neurodegenerativas. La extensa evidencia aportada por estudios en animales y humanos sugiere que el ejercicio tiene un impacto altamente positivo sobre capacidades cognitivas como la memoria y el aprendizaje, y aspectos emocionales de la conducta, que resultan en una mejor gestión del stress [18].

Trabajos con roedores que fueron alojados en condiciones enriquecidas [5,20], es decir en un medio altamente estimulante a nivel sensorial, perceptivo y físico, y luego evaluados con el Test de memoria de reconocimiento de objetos, reportaron cambios plásticos conductuales y cognitivos muy relevantes [13,14,17]. Sin embargo, aún es limitada la información acerca de los mecanismos neurobiológicos que subyacen en distintos aspectos de la memoria

declarativa, dependiente o no, del hipocampo. Por otra parte, la mayoría de los trabajos con roedores alojados en condiciones enriquecidas, incluyen el acceso al ejercicio voluntario en el Wheel-running, que introduce *per se* una diferencia importante que dificulta la estandarización del enriquecimiento ambiental y el aporte relativo de cada objeto y/o estructura utilizada a la hora de evaluar los efectos plásticos globales a nivel cognitivo-conductual [25].

El objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos del ejercicio crónico moderado y/o del medio enriquecido (sin acceso al ejercicio voluntario) sobre los distintos estados de la memoria de reconocimiento de objetos: codificación, consolidación y recuperación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Animales y Diseño Experimental.

40 machos de la cepa Wistar obtenidos del Bioterio Central de la Universidad de la Plata, pesando entre 200 y 250 gr., de 2 meses de edad, fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los siguientes grupos experimentales:

GRUPO 1: CONTROL (C), N= 10, serán alojados de a dos en 5 jaulas estándar de 20 cm x 30 cm x 45 cm, sin acceso al enriquecimiento ambiental a lo largo de la experiencia.

GRUPO 2: MEDIO ENRIQUECIDO (ME), N=10, serán alojados de a 5 en cada uno de 2 jaulones especiales de enriquecimiento con exposición crónica a distintos componentes del enriquecimiento ambiental que no sea el acceso al ejercicio espontáneo o forzado. Los jaulones fueron especialmente diseñados para promover la interacción social, y cubrir las necesidades de movimiento y espacio, así como estimular la conducta exploratoria.

GRUPO 3: MEDIO ENRIQUECIDO + EJERCICIO (ME + E), N=10, serán alojados de a 5 en cada uno de dos jaulones especiales de enriquecimiento y sometidos a ejercicio moderado (30 minutos en el treadmill running, 5 veces por semana) durante 12 semanas. Exposición crónica a distintos componentes del enriquecimiento ambiental con acceso al ejercicio forzado de intensidad moderada, a través de sesiones programadas de entrenamiento aeróbico de baja intensidad realizado con la misma frecuencia que la estimulación cognitiva.

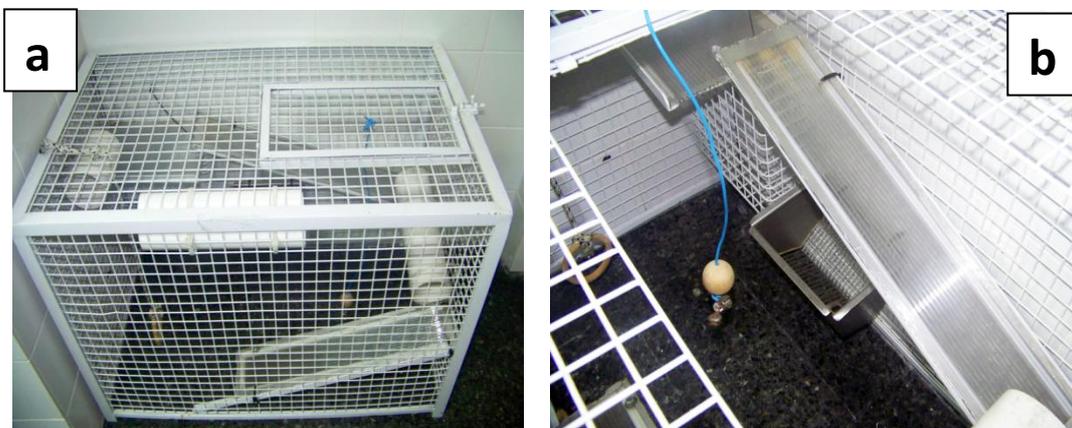
GRUPO 4: EJERCICIO (E), N=10, serán alojados de a dos en 5 jaulas estándar en condiciones pobres.

Los animales estarán bajo un ciclo de luz: oscuridad de 12h. El período oscuro se extenderá desde las 6 am. Hasta las 18 pm., y tendrán libre acceso a la comida y bebida. Se registrarán los pesos corporales, la comida y bebida consumidas semanalmente. Los experimentos se realizarán durante el ciclo de oscuridad. Además, una vez por semana, se controlará el estado clínico de los animales. Los ensayos conductuales se realizarán al finalizar el período de entrenamiento, y la toma de muestras de cerebro y plasma, al finalizar los ensayos en el Bow-tie Maze.

2.2 EQUIPOS Y PROTOCOLOS.

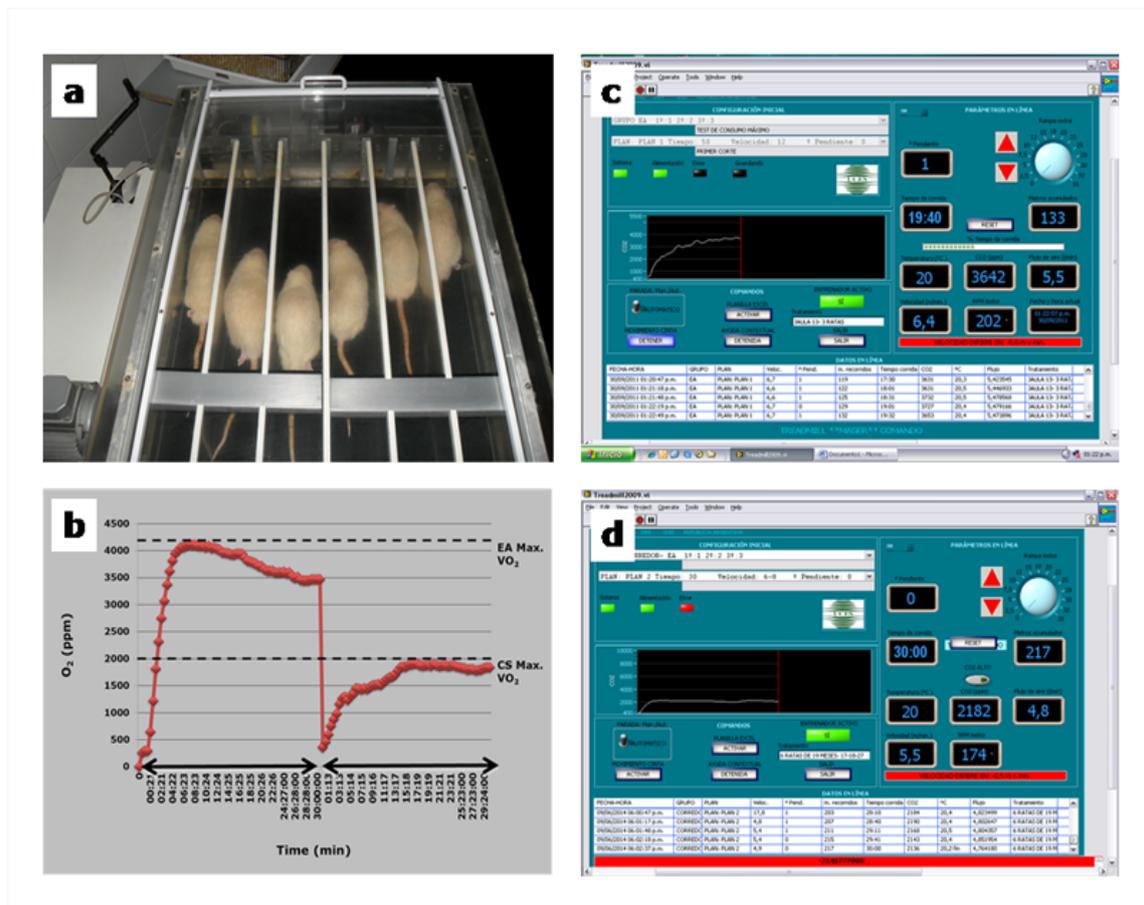
2.2.1 Enriquecimiento Ambiental: El modelo que utilizamos se basó en el protocolo modificado de Xie et al., 2013 [25]. Brevemente: a partir de los 2 meses de edad, los animales perteneciendo al grupo de medio enriquecido solo o medio enriquecido más ejercicio en el treadmill (NT= 20) fueron alojados de a 5 en 4 jaulones de enriquecimiento, de 80 cm. de largo x 50 cm. de ancho x 60 cm. de alto, contruidos en alambre de hierro esmaltado formando un enrejado con una trama de 2 x 2 cm. y con bandejas de zinc colocadas sobre plataformas móviles a 40 cm del piso (**Figura 1, a y b**).

Procedimiento: Los sujetos fueron expuestos crónicamente durante 12-16 semanas a un ambiente enriquecido con distintos estímulos sensoriales, cognitivos y físicos de distintos colores, tamaños, texturas que serán removidos parcialmente cada quince días y reemplazados por otros objetos novedosos. Nunca se repetirán a lo largo de la experiencia. Otras estructuras permanecerán fijas: sogas, rampas, tubos, escaleras y plataformas a distintos niveles.



2.2.2 Treadmill-running: Ver su descripción en Pietrelli et al., 2011 y 2012 [ver ref. 17 y 18], Brevemente: consiste en un treadmill motorizado **(a)** de 6 carriles, que permite entrenar 6 ratas por vez y obtener en tiempo real, mediante un software **(b-c-d)**, parámetros que son sensados dentro de la caja estanca, a medida que los sujetos corren: consumo de Oxígeno (ppm), pendiente (grados), velocidad (m/minuto), flujo de aire ingresado (ml/minuto), duración (tiempo), metros acumulados de carrera (m), temperatura interna (grados), etc. **(Figura 2, a-d).**

Procedimiento: El protocolo de entrenamiento será el empleado por Pietrelli et al., 2011 y 2012. Se introducirán pequeñas modificaciones [8,23]: los animales correrán 5 días a la semana, de lunes a viernes, durante 12-16 semanas, 30 minutos diarios, a 8 m/minuto como velocidad de trabajo. No se realizarán ajustes en la duración, velocidad y/o pendiente en función de la performance.

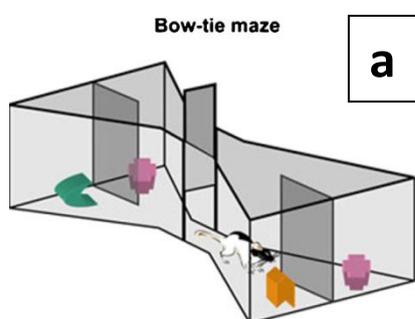


2.2.3 Bow-Tie Maze: Figura 3, a-c. Se construyó en acrílico opaco siguiendo las recomendaciones de Albasser et al., 2012, incorporando modificaciones para adaptarlo a ratas de gran tamaño (500-600 gr).

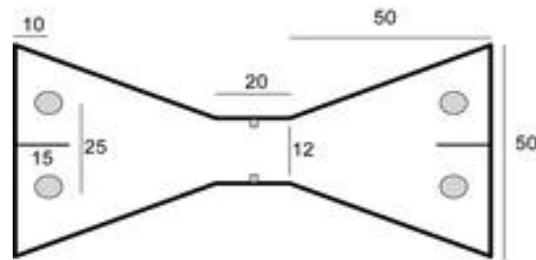
Para evaluar parámetros cognitivos (componentes de la memoria declarativa dependientes e independientes del hipocampo) se realizará el Test de Reconocimiento espacial de Objetos” (SOR) adaptando el protocolo de Albasser et al.,2012 [3]. El test de Reconocimiento Espacial de Objetos (SOR) ha permitido una mejor comprensión de las funciones del lóbulo temporal medial, y particularmente de la corteza perirhinal. Actualmente se sabe que la corteza perirhinal cumple un rol fundamental en la representación de la información de objetos individuales [4, 12, 16] mientras que el hipocampo cumple un rol destacado en funciones espaciales y relacionales, y su integridad no es necesaria para el reconocimiento de objetos [19,21]. Sin embargo, el hipocampo y la amígdala median otros procesos cognitivos que permiten integrar la información del objeto con otros tipos de información.

Este test permite estudiar distintos aspectos de la memoria declarativa (procesos cognitivos que permiten integrar información multimodal o “memoria de la información general”, y se basa en la tendencia natural de las ratas a la preferencia por explorar estímulos nuevos frente a estímulos familiares [22,24]. No se necesita un entrenamiento previo, ni reforzadores para generar motivación.

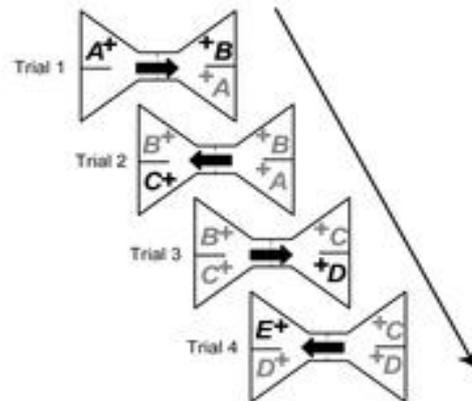
Procedimiento General: El test [1,2,11,24] consiste en una fase de familiarización (5 minutos), y una fase de elección (5 minutos), separadas por un período de retraso, de duración variable, para la retención. Esta retención se produciría en circuitos de la corteza perirhinal y facilitaría la discriminación perceptual del objeto entre la fase de muestra y de elección sobre la base de la familiaridad. El aparato está colocado sobre una plataforma a 30 cm del piso. Se trabajará en la fase oscura y se eliminará cualquier señal espacial extra-aparato que pudiera generar un patrón espacial de búsqueda. Todos los objetos (**b**) que se presentarán secuencialmente deben estar por duplicado. El equipo debe limpiarse profundamente entre sujetos. Se define contacto con el objeto cuando la rata lo toca con la nariz o se acerca 2 cm o menos del objeto.



c

Bow-tie maze

d

Procedure

Consiste en **(d)**: 1) En la fase de familiarización (fase de codificación y adquisición) se coloca a la rata enfrente de objetos idénticos en forma, textura, color, y tamaño y se le permite explorarlos durante 5 minutos; 2) Fase de retraso (consolidación y almacenamiento); 3) Al final del retraso (fase de recuperación), se lo vuelve a colocar junto a duplicados de objetos iguales, pero desplazados; ó la mayoría iguales y uno distinto; ó todos iguales. Las ratas, normalmente, preferirán explorar el objeto nuevo, y no el familiar. Se medirá, la capacidad del sujeto de construir representaciones espaciales y determinar la naturaleza de los parámetros espaciales codificados durante la exploración a través de cambios espaciales (desplazamiento de objetos familiares) y no-espaciales (sustitución de objetos familiar por uno nuevo), utilizando el cálculo de la “discriminación ratio” (DR): $DR = (\text{tiempo de exp. del objeto nuevo} - \text{tiempo de exploración del objeto familiar}) / \text{tiempo de exp de ambos}$.

Semana 1- Día 1 a 5 (lun a vie): Habitación al Bow-tie Maze.

Experimento 1: Pre-training- Los 4 grupos de animales serán expuestos al aparato vacío durante 5 minutos, durante 5 días consecutivos (lunes a viernes) y a la misma hora (ciclo

oscuro, 8 am - 12pm). Cada día se medirán parámetros de ansiedad y actividad locomotora y exploratoria. Este período inicial es vital para reducir el efecto del stress sobre la performance cognitiva.

Semana 2- Experimento 2: Memoria en el corto plazo (retraso de 1 minuto entre ensayos sucesivos). Lunes a viernes.

Se seguirá el protocolo de Kinnavane et al., 2015 [15]. Luego de la habituación al equipo, la sala y el operador, una rata perteneciente a cada tratamiento, será colocada en el laberinto conteniendo 1 objeto A en un extremo, **ensayo 1**. Luego de 1 minuto, se colocarán 2 objetos: una copia de A y un objeto nuevo, B, en el otro extremo. Se permite explorar durante 1 minuto. Luego, **ensayo 2**, se colocan dos objetos secuencialmente: la copia de B y uno nuevo, C. Se deja explorar 1 minuto. Luego, **ensayo 3**, se colocan dos objetos: la copia de C y uno nuevo: D. Al minuto, **ensayo 4**: se vuelven a colocar dos objetos. La copia de D y uno nuevo, E. Cada día se evaluarán hasta 8 ratas, comenzando aleatoriamente, en el mismo rango horario. Se testearán dos ratas consecutivas del mismo tratamiento, antes de pasar al segundo y así sucesivamente. Ver en la tabla el cronograma semanal de trabajo. Ningún animal será recompensado.

Tratamiento	LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES
C, n=10	2	2	2	2	2
ME, n=10	2	2	2	2	2
E, n=10	2	2	2	2	2
ME + E, n=10	2	2	2	2	2
	8 ratas	8 ratas	8 ratas	8 ratas	8 ratas

Semana 3 y 4- Experimento 3: Memoria en el largo plazo (retraso de 24 h entre la fase de adquisición y recuperación). Lunes a viernes.

Se realizará el ensayo 1 solamente, con un retraso de 24 hs entre la fase de muestra del objeto A, y la fase de elección 24 horas después (las mismas 8 o 12 ratas) cuando se presentan una copia de A y el nuevo objeto B.

SEMANA 3				
Tratamiento	LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES
	Ensayo 1		Ensayo 1	
C, n=10	2	2	3	3
ME, n=10	2	2	3	3
E, n=10	2	2	3	3
ME + E, n=10	2	2	3	3
	8 ratas		12 ratas	
SEMANA 4				
Tratamiento	LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES
	Ensayo 1		Ensayo 1	
C, n=10	2	2	3	3
ME, n=10	2	2	3	3
E, n=10	2	2	3	3
ME + E, n=10	2	2	3	3
	8 ratas		12 ratas	

2.3 ANÁLISIS DE DATOS.

Quedará a cargo del Director, con ayuda de aquellos alumnos que tengan conocimientos básicos de estadística aplicada a ciencias de la salud.

Se realizarán análisis exploratorio de datos y luego, si las distribuciones son normales, se aplicarán ANOVAS de dos factores (ejercicio x medio enriquecido) y/o ANOVA de dos factores con medidas repetidas en el Experimento 1 y 2. Si fuera necesario, se realizarán pruebas no-paramétricas.

***OPTATIVO:** Los alumnos podrán optar por participar en la etapa final de obtención de muestras para su posterior procesado.

Semana 5 y 6: Se obtendrá plasma a partir de sangre entera extraída de la vena caudal en tubos heparinizados. Posteriormente se realizarán los sacrificios de los animales para obtener muestras frescas de áreas cerebrales relacionadas con la memoria y aprendizaje: corteza prefrontal, perirhinal, estriado, hipocampo, rafe dorsal. El sacrificio será por guillotinado y/o

fijación por perfusión *in vivo* con paraformaldehído al 4% para estudios histológicos y morfométricos posteriores. Las áreas disecadas se utilizarán para la semicuantificación de marcadores específicos neuronales y sinápticos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Akkerman, S., Blokland, A., Reneerkens, O., van Goethem, N.P., Bollen, E., Gijssels, H.J., Lieben, C.K., Steinbusch, H.W., Prickaerts, J., 2012. Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behav Brain Res.* 232, 335-47.
2. Akkerman, S., Prickaerts, J., Steinbusch, H.W., Blokland, A., 2012. Object recognition testing: Statistical considerations. *Behav Brain Res.* doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.024.
3. Albasser, M.M., Chapman, R.J., Amin, E., Iordanova, M.D., Vann, S.D., Aggleton, J.P., 2012. New behavioral protocols to extend our knowledge of rodent object recognition memory. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 17, 407-419. Doi 10.1101/lm.1879610.
4. Antunes, M., Biala, G., 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13, 93–110.
5. Baumans, V., 2005. Environmental Enrichment for Laboratory Rodents and Rabbits: requirements of rodents, rabbits and research. *ILAR Journal* 16, 162-168.
6. Bayod S, Del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roigé S, Camins A, Escorihuela RM, Pallas M., 2011. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol.* doi: 10.1152/jappphysiol.00425.
7. Berchtold NC, Castello N, Cotman CW., 2010. Exercise and time- dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience* 19:588:597.
8. Bompa TO, Haff G., 2009. *Periodization: Theory and Methodology of Training*, 5th Edition. Publisher: Human Kinetics, p 424. Champaign (IL), USA.
9. Buccafusco JJ., 2009. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2nd ed., Ed. Taylor & Francis, p 351. Boca Raton (FL): CRC Press, USA.
10. Burghardt PR, Fulk LJ, Hand GA, Wilson MA., 2004. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res* 1019:84-96.
11. Burke NS, Wallace S, Nematollahi AR, Uprety AR, Barnes CA., 2010. Pattern separation may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci.* 124:559-573.

12. Ennaceur, A., Neave, N., Aggleton, J.P., 1997. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res* 113, 509-519.
13. Hopkins, M.E., Bucci, D.J., 2010. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 94:278-284.
14. Kazlauckas, V., Pagnussat, N., Mioranza, S., Kalinine, E., Nunes, F., Pettenuzzo, L., Souza, D., Portela, L.V., Porciúncula, L.O., Lara, D.R., 2011. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiology & Behavior* 102 , 475–480.
15. Kinnavane, L., Albasser, M.M., Aggleton, J.P., 2015. Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. *Behavioural Brain Research* 285, 67–78.
16. Murray, E.A., Richmond, B.J., 2001. Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 188-193.
17. Pietrelli A, López-Costa JJ, Goñi R, López EM, Brusco A, Basso N., 2011. Effects of moderate and chronic exercise on the nitrenergic system and behavioral parameters in rats. *Brain Res.* 1389, 71-82.
18. Pietrelli A, López-Costa JJ, Goñi R, Brusco A, Basso N., 2012. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle aged and old rats. *Neuroscience* 202: 252-266.
19. Shukitt-Hale B, Cadadesus G, Cantuti-Castelvetri I, Joseph J., 2001. Effect of age on object exploration, habituation, and response to spatial and non-spatial change. *Behav Neurosci.* 115: 1059-1064.
20. Sztainberg, Y., Chen, A., 2010. An environmental enrichment model for mice. *Nat Protoc.* 9, 1535-1539. doi: 10.1038/nprot.2010.114.
21. Tronel S, Belnoue L, Grosjean N, Revest JM, Piazza PV, Koehl M, Abrous DN., 2012. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination *Hippocampus.* 2, 292-298. doi: 10.1002/hipo.20895.
22. Whalsten D., 2011. *Mouse Behavioral Testing*, 1st. ed., Ed. Elsevier. San Diego, CA, USA.
23. Wilmore J, Costill D., 2007. *Fisiología del Esfuerzo y del Deporte*, 6ta. ed., Ed. Paidotribo, p 776. Barcelona, España.

24. Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ., 2008. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32, 1055-1070.
25. Xie, H., Wu, Y., Jia, J., Liu, G., Zhang, Q., Yu K, Guo, Z., Shen, L., Hu, R., 2013. Enrichment-induced exercise to quantify the effect of different housing conditions: a tool to standardize enriched environment protocols. *Behav Brain Res.* 249, 81-89. doi: 10.1016/j.bbr.2013.04.032.