

**FORMULARIO PARA LA PRESENTACION DE PROYECTOS DE
INVESTIGACION**

1.) Campo de aplicación / líneas prioritarias: Ciencia Básica- Traslacional. Línea: Neurociencia, Neurobiología del Ejercicio. Campo de aplicación: Medicina Preventiva y Regenerativa.

2.) Título del Proyecto: *“Efectos del ejercicio aeróbico sobre el citoesqueleto neuronal en ratas de ambos sexos”*

3.) Entidades Participantes¹

Entidad:²

1) Laboratorio de Neuroprotección y Neuroreparación. Instituto de Biología Celular y Neurociencias Dr. E. De Robertis (IBCN), CONICET. Sede: Facultad de Medicina-UBA. Paraguay 2155- 3er. piso.

CABA-Código Postal 1121

+54 (011) 5285-3171

+54 (011) 5285-3170

Tipo de vinculación: Colaboración académico-científica.

Descripción de la vinculación: Colaboración a través de recursos compartidos. El laboratorio aportará la infraestructura, equipamiento, algunos reactivos y técnicas específicas para el procesamiento, análisis de muestras y determinación de marcadores celulares de interés.

2) Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT), CICVyA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-CONICET).

Los Reseros y N. Repetto s/n

1686, Hurlingham, Buenos Aires-Argentina

Tel. +5411-4621-1278 Int. 3607

Tipo de vinculación: Colaboración académico-científica.

Descripción de la vinculación: Colaboración a través de recursos compartidos. El laboratorio aportará la infraestructura, equipamiento, algunos reactivos y técnicas biología

¹ Se refiere además de UCES:

² Nombre si es una entidad científica o Razón Social si se refiere a una empresa.

molecular específicas para el procesamiento, análisis de muestras y determinación de marcadores moleculares de interés.

4.) Responsables:

4.1) Cátedra/s sede: Biología Celular y Molecular- Sede Centro y San Isidro

4.1.a) Directora del Bioterio de UCES, perteneciente al Departamento de Investigación de la Universidad.

4.2.b) Profesora Asociada de la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Carrera de Medicina de UCES.

Sedes: Centro, San Isidro.

4.2.) Director del Proyecto:

Apellido y Nombre³: Prof. Dra. Adriana Pietrelli

Lugar Principal de Trabajo⁴:

1) Bioterio de UCES, perteneciente al Departamento de Investigación de la Universidad. Sedes Centro y San Isidro.

Funciones⁵: Primer autor. Función de coordinación general que incluye: monitoreo, dirección y evaluación de la marcha del Proyecto. Además, interviene en la producción y análisis estadístico de datos y publicación de resultados.

Dedicación⁶ 25 h/sem

2) Profesora Asociada de la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Carrera de Medicina de UCES. Sedes: Centro, San Isidro.

Dedicación⁷ 25 h/sem

4.3.) Co-director del Proyecto:

Apellido y Nombre⁸: Prof. Dr. Carlos Feleder

Lugar Principal de Trabajo⁹: Director del Departamento de Investigación de la Universidad. Departamento de Posgrado.

Funciones¹⁰: Co-Director del Proyecto. Se ocupará de evaluar la marcha del Programa. Intervendrá en la publicación de resultados.

³ Anexar CV actualizado

⁴ En función de las horas semanales dedicadas.

⁵ Se refiere a las funciones que desarrollará para monitorear, dirigir y evaluar la marcha del Programa.

⁶ Expresado en Horas Semanales dedicadas a la labor de gestionar el Programa.

⁷ Expresado en Horas Semanales dedicadas a la labor de gestionar el Programa.

⁸ Anexar CV actualizado

⁹ En función de las horas semanales dedicadas.

Dedicación¹¹ 10 h/sem

5.) Antecedentes del Equipo de Investigación

Nuestra línea de investigación estudia la neurobiología del ejercicio en un modelo de rata Wistar convencional. El factor “ejercicio”, a diferencia de otras intervenciones experimentales de distinta naturaleza (farmacológica, intervenciones quirúrgicas, manipulaciones genéticas, etc) tiene como targets todos los tejidos y sistemas. Sin embargo, los blancos principales del ejercicio son aquellos sistemas directamente involucrados en la actividad física: el sistema circulatorio, endócrino y nervioso e inclusive el sistema immune (Zu and Song, 2024). Nuestro trabajo se focaliza principalmente en el SNC, en áreas relacionadas con la memoria y el aprendizaje: corteza cerebral, hipocampo, estriado y cerebelo. Para estudiar la respuesta de áreas selectas cerebrales al ejercicio aeróbico de moderada intensidad, desarrollamos un modelo fisiológico que se basa en un protocolo de ejercicio regular de moderada intensidad y características aeróbicas, con un treadmill-running motorizado. La población en estudio, ratas macho y hembra, se produce *ad hoc* en nuestro Bioterio. Nuestro laboratorio cuenta con reportes anteriores publicados en revistas científicas internacionales con referato. Dichas revistas pertenecen a la especialidad de Neurociencias y Neurociencia Cognitiva, indexadas con un IF de 3 o más (Pietrelli et al., 2011, 2012; 2014; 2018; 2020).

Una parte de los experimentos se llevan a cabo en salas experimentales del Bioterio de la Universidad. La obtención y procesamiento de muestras, y determinaciones se realizan en laboratorios externos especialmente equipados, y están a cargo de investigadores que colaboran con nuestros trabajos. Algunos de los investigadores que participan son docentes de UCES y, además, como parte del proyecto de transferencia del conocimiento científico y formación en investigación que venimos desarrollando en el Bioterio desde el año 2019, se sumaron estudiantes al presente proyecto.

6.) Problema y Justificación

Ha sido extensamente documentado que el ejercicio produce grandes beneficios a la salud cerebral. Algunos autores (Maugeri et al., 2024) sostienen que produce un “rejuvenecimiento cerebral” que resulta de los cambios en la arquitectura neuronal y glial, en la sinaptogénesis y función sináptica, supervivencia, diferenciación, neurogénesis adulta, angiogénesis, así como en las funciones cognitivas superiores.

La morfología de neuronas y glía es diversa y está directamente asociada con su función. Dado que las células nerviosas son post mitóticas, es fundamental conocer qué proteínas y estructuras celulares están involucradas en el mantenimiento de la forma celular a lo

¹⁰ Se refiere a las funciones que desarrollará para monitorear, dirigir y evaluar la marcha del Programa.

¹¹ Expresado en Horas Semanales dedicadas a la laboral de gestionar el Programa.

largo de su vida, y en consecuencia, cuáles subyacen a la función neural (Pigino et al., 2012). En este sentido, las proteínas del citoesqueleto juegan un rol central en la creación y mantenimiento de las formas celulares en todos los tejidos. Entre sus funciones podemos mencionar: proveen organización estructural interna ayudando a establecer compartimientos metabólicos; sirven como guías para el transporte intracelular y posicionamiento de estructuras subcelulares; mantenimiento de dominios funcionales y polarización celular.

La perturbación de las propiedades dinámicas normales de los microtúbulos (MTs), por ejemplo, es suficiente para causar neurodegeneración. En consecuencia, las alteraciones en la dinámica, morfología y distribución del citoesqueleto son, muchas veces, el rasgo distintivo de diferentes neuropatologías, que incluyen neuropatías tóxicas, demencia, enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD) y otras condiciones neurodegenerativas (Pigino et al., 2012). En algunos casos, la alteración del citoesqueleto es el mecanismo patogénico primario, y en otros casos, es secundaria a la patología que finalmente, resulta en disfunción neuronal. También se estudiaron (Reinés et al., 2004) los cambios morfológicos en el citoesqueleto en un modelo animal de depresión, observando modificaciones en la dinámica del ensamblado de los neurofilamentos (NF) y la expresión de sus tres subunidades constitutivas, en el hipocampo.

Las alteraciones en las proteínas asociadas a MT, que promueven su ensamblaje y estabilidad o en sus patrones de fosforilación, se han relacionado con la fisiopatología de diferentes trastornos neurocognitivos (Gao et al., 2024). Las proteínas del citoesqueleto, además, son fundamentales en el proceso de regeneración luego de una injuria tisular, evento de isquemia o hipoxia. El proceso de reperfusión luego de una isquemia experimental (Xiong et al., 2019), demostró que aparecen cambios coordinados en la expresión de MTs y de proteínas asociadas a microtubulos (MAPs) y a los NF, en el hipocampo. En la misma línea, un experimento (Guo et al., 2019) realizado con ratas sometidas a isquemia por oclusión de la arteria carótida demostró un decremento significativo de la razón F-actina/ G-actina en el área CA1 del hipocampo, que afectó los procesos dendríticos y, por lo tanto, las sinapsis y la función neuronal.

En una publicación reciente (Zu and Song, 2024) se destacó el rol del ejercicio y su impacto en distintos sistemas orgánicos. Los autores sostienen que “el ejercicio es medicina” y está involucrado en la prevención de muchas enfermedades como obesidad, diabetes, enfermedades cognitivas y neurológicas.

Actualmente se está utilizando “la mimética del ejercicio” como estrategia para el diseño de nuevas drogas que pueden “mimetizar” y amplificar los efectos del ejercicio para tratar enfermedades específicas. La empresa Novartis desarrolló un agonista de IL-15, NIZ985, que tiene efectos antiinflamatorios y anti tumorales basándose en esta aproximación, siendo el primer reporte del uso de la mimética del ejercicio para tratar el cáncer.

Obviamente, este abordaje tiene sus limitaciones y, además de desarrollar terapias farmacológicas, es necesario intensificar el estudio y la comprensión de las interacciones que produce el ejercicio a nivel molecular, celular, tisular y sistémico.

En este trabajo proponemos estudiar los posibles efectos de un modelo de ejercicio aeróbico regular, que desarrollamos en nuestro laboratorio, en la morfología, arquitectura, ultraestructura y distribución de proteínas del citoesqueleto y asociadas, en neuronas y glía, para lo cual se trabajará con áreas selectas cerebrales: corteza, hipocampo y estriado que están involucradas en la memoria y aprendizaje, consistente con nuestra línea de trabajo y reportes previos. También, el posible dimorfismo sexual en la respuesta, que no habíamos abordado hasta ahora.

Consideramos que el presente trabajo colaborará con la comprensión de los efectos del ejercicio moderado sobre la respuesta de proteínas estructurales del citoesqueleto y algunas proteínas asociadas que regulan su funcionamiento, así como la expresión de proteínas vinculadas con la plasticidad neuronal dependiente de la actividad que parecen tener un rol en la patogénesis de procesos neurodegenerativos que muestran disrupción del citoesqueleto.

7.) Marco conceptual

El desarrollo y mantenimiento de la polarización neuronal con dos dominios morfológica y funcionalmente distintos, axones y dendritas, es dirigido por el citoesqueleto para proveer compartimentalización y direccionalidad a la comunicación neuronal y regular el transporte de orgánulos y moléculas a lo largo de las neuritas. Las propiedades constitutivas de las proteínas del citoesqueleto, actina, tubulina y asociadas, su dinámica, geometría y asociación con motores moleculares, así como su rol en la integración de programas genéticos y señales intra y extracelulares en tiempo y espacio, determinan la citoarquitectura neuronal y, por lo tanto, el establecimiento de redes complejas que dirigen y controlan la integración funcional del organismo (Conde et al., 2022).

Los tres componentes del citoesqueleto, microtubulos (MTs), neurofilamentos (NFs) y microfilamentos (MFs) tienen diferentes propiedades, ultraestructura, composición y organización características (Fig. 1). Además, dependiendo del tipo celular y del dominio subcelular, estos complejos estructurales pueden especializarse aún más (Pigino et al., 2012). La morfología de las neuronas y glía es generada por la diversa especialización de MTs, NFs y MFs, que forma un set de estructuras dinámicas y que están sujetas a la influencia de señales extracelulares (Schatzle et al., 2015).

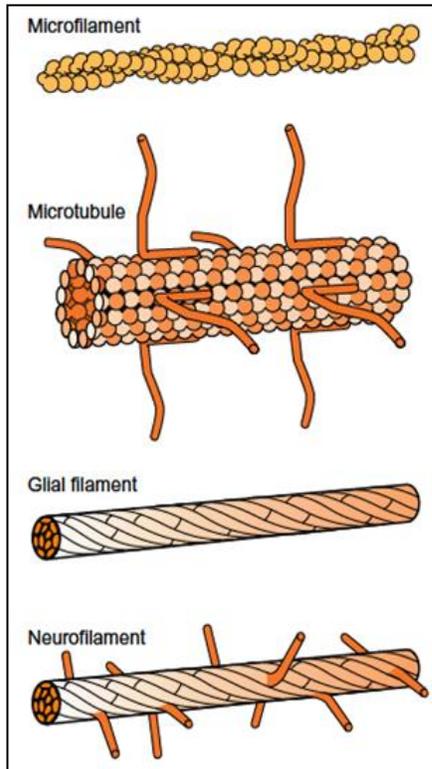


Fig. 1: Microfilamentos, microtubulos y filamentos intermedios en el SN. Cada estructura del citoesqueleto tiene una ultraestructura distintiva. Este esquema ilustra sus características principales: **1)** Los **MFs** (4–6 nm) están formados por dos hebras de α y β -actina enroscadas como hilos de perlas. Las subunidades individuales son proteínas globulares asimétricas que le dan al microfilamento su polaridad. **2)** Los **MTs** (25 nm) están constituidos por subunidades globulares que forman un heterodímero de α y β -tubulinas. Estos dímeros están organizados en 13 hebras lineales, o protofilamentos, con subunidades de β -tubulina orientadas hacia el extremo positivo del microtúbulo. El ensamblaje de los MFs y MTs está acoplado a la hidrólisis lenta de nucleótidos, ATP para los microfilamentos y GTP para los microtúbulos. **3)** Los filamentos intermedios (**FIs**) o neurofilamentos (**NFs**) son moléculas con forma de cilindro que se autoensamblan sin nucleótidos. Se cree que la estructura del filamento central es una disposición en forma de cuerda de subunidades individuales. Los filamentos gliales son filamentos intermedios típicos de tipo III, ya que forman homopolímeros sin brazos laterales. Por el contrario, en las neuronas, los NFs son heteropolímeros formados a partir de tres subunidades, de alto PM, NFH; de PM intermedio, NFM; y de PM bajo, NFL. Las subunidades NFH y NFM tienen colas carboxilo-terminales extendidas que se proyectan desde los lados del filamento central y pueden estar hiperfosforiladas. Extraído y adaptado de Pigino et al., 2012.

Los MT axonales y dendríticos no son continuos con el cuerpo celular y su longitud es diferente en ambos dominios: los axonales son largos y tienen una polaridad y distribución uniformes con los extremos + distales al soma neuronal, y los dendríticos son más cortos y tienen polaridad mixta (Fig.2) (Leterrier, C., 2021). Se cree que los microtúbulos de los cuerpos celulares, las dendritas y los axones se nuclean en el centro organizador de microtúbulos (MTOC), luego se liberan y se envían a las dendritas o al axón. Los NFs están excluidos de los compartimentos dendríticos, pero son abundantes en los axones grandes. El espaciamiento de los NFs es sensible al nivel de fosforilación. Los MTs y los NFs terminan y comienzan en el axón en lugar de ser continuos de regreso al cuerpo

celular. Los MFs están más dispersos en su organización. Son más abundantes cerca de la membrana plasmática, en las terminales presinápticas y en las espinas dendríticas.

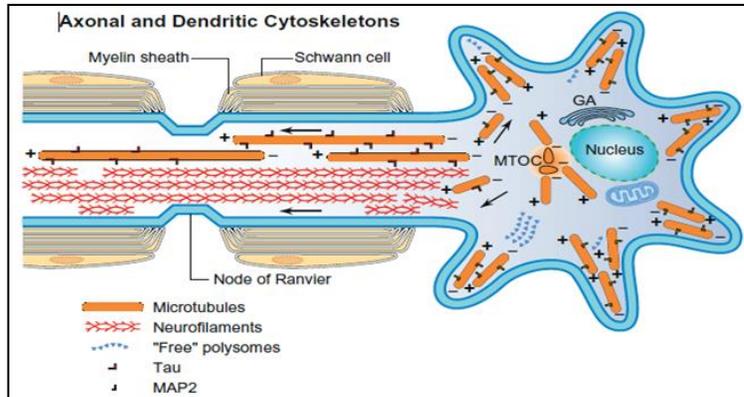


Fig. 2. Los citoesqueletos axónico y dendrítico, difieren tanto en su composición como en su organización. La proteína asociada a microtúbulos, MAP2, es la principal proteína asociada en dendritas y parece estar ausente en axones. Los MTs del axón están enriquecidos en proteína Tau que está fosforilada de manera diferencial. GA: Aparato de Golgi; MTOC: centro organizador de MTs. Extraído y adaptado de Pigiño et al., 2012.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO Y ASOCIADAS

Microtúbulos (MTs): Las neuronas maduras contienen una colección compleja de MTs estables y dinámicos, que están organizados de manera diferente en axones y dendritas (Fig. 2). La organización y distribución de MTs depende de la acción combinada de proteínas regulatorias llamadas MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos). Un grupo de MAPs son proteínas que controlan su dinámica en los extremos positivos, se las llama +TIPs (plus-end tracking proteins). Las +TIPs se unen directamente a los extremos positivos de crecimiento o pueden interactuar con otras proteínas asociadas a los extremos + (Schatzle et al., 2015).

Los MT cerebrales contienen α y β -tubulinas, familias génicas con distintos isotipos que difieren principalmente en el extremo C-t, que forman colas no-estructuradas que protruyen de la superficie del MT y es la región donde ocurren la mayoría de las modificaciones postraduccionales e interacciones con MAPs. Estos isotipos alternativos de la tubulina y una gran variedad de modificaciones post-traduccionales controlan las propiedades y funciones de los MTs, un concepto conocido como “código de tubulinas” (Gadadhar et al., 2017; Janke y Magiera, 2020). Las tubulinas se expresan en todos los tejidos pero las β -tubulinas de clase III y IVa son consideradas marcadores específicos de

neuronas. Las modificaciones postraduccionales de la tubulina mejor estudiadas (McKenna et al., 2023) son la destirosinación, la poliglutamilación de la β -tubulina, la fosforilación del isotipo β III, y la acetilación de la α -tubulina.

Las MAPs son un conjunto heterogéneo de proteínas que cumplen *in vivo* muchas funciones: espaciado, organización, compartimentación, “scaffolds” para moléculas de señalización, y asociaciones con otras estructuras celulares. Interactúan con los MTs y nó con la tubulina libre y mantienen una estequiometría constante con la tubulina en los MT a través de ciclos de ensamblaje y desensamblaje. Varias categorías de MAP se pueden agrupar en dos familias: MAP1 (1A y 1B) así como MAP2/tau (2A y 2B). Las familias MAP1 y MAP2 son de alto peso molecular (270 kD), mientras que tau es un solo gen con un splicing alternativo extenso. Las MAP 1A y 1B se encuentran en los axones, soma y dendritas. La MAP2 es considerada un marcador específico neuronal y se encuentra principalmente en los somas y dendritas, y tau se encuentra en los axones de neuronas maduras en condiciones fisiológicas (Pigino et al., 2012). Tau es un regulador importante de la extensión de neuritas e interviene en el ensamblado, estabilidad e integridad de los MTs. La distribución anómala de Tau podría ser un marcador temprano de disfunción sináptica y de la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como AD, en donde Tau aparece hiperfosforilada y mal plegada, generando una acumulación anómala de NF con patrones aberrantes (Iwata et al., 2019).

Neurofilamentos (NFs):

Existen cinco clases de Fis, pero los de tipo IV se expresan específicamente en neuronas maduras. A diferencia de los MFs y MTs son capaces de ensamblarse en ausencia de nucleótidos y son muy estables. Su rol es proveer soporte mecánico a la célula.

Los NFs, están formados por 3 subunidades que son codificadas por genes distintos, y forman un “tripleto” característico: NFH de alto peso molecular 180–200 kDa); NFM, de peso medio 130–170 kDa, y NFL, de peso molecular bajo 60–70 kDa (Bott y Winckler, 2020).

Las regiones amino-terminales de las tres subunidades interactúan a través de estructuras en espiral α -helicoidales para formar el núcleo del filamento. NFM y NFH también tienen regiones carboxi-terminales largas, que se proyectan desde los filamentos centrales como brazos laterales. El resultado es que los FI en células no neuronales a menudo se ven en haces densamente empaquetados, mientras que los NF están ampliamente espaciados. NFH, y en menor medida NFM, tienen una gran cantidad de sitios de fosforilación en esta extensión carboxi-terminal. Esta fosforilación de los brazos laterales de NFH y NFM altera la densidad de carga en la superficie de NF, repeliendo NF adyacentes con carga similar. Se cree que esta repulsión mutua por los brazos laterales de los NF es un determinante principal del calibre axonal. En el soma y dendritas predominan los NFs no fosforilados, mientras que en axones predominan los fosforilados (Dale y Garcia, 2012).

Los astrocitos y algunas células de Schwann contienen la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que es un FI de tipo III Esta distribución ha llevado al uso generalizado de la

inmuno-reactividad de GFAP para identificar astrocitos en cultivos y tejidos. A diferencia de los NF, los IF de tipo III como GFAP carecen de brazos laterales y a menudo parecen estar estrechamente unidos (Pigino et al., 2012)

Las funciones de los NF en los axones incluyen el mantenimiento de los espaciamientos del citoesqueleto y la creación de un citoplasma viscoelástico que resiste la deformación. En los axones maduros, los NF llenan la totalidad a lo largo de sus longitudes. Las colas laterales (especialmente NFH) aumentan el espaciamiento entre los NF, así como entre los MTs. Los NF son importantes en el crecimiento dendrítico y, evidencias recientes aportadas por inmunofluorescencia y microscopía electrónica han revelado NF en botones sinápticos, en postsinapsis e incluso en espinas dendríticas.

Microfilamentos (MFs):

La actina es una proteína citoesquelética versátil y ubicua que desempeña un papel importante tanto en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad neuronal. Los MFs están formados por monómeros de actina (actina-G) de 43-kDa que forman dos filamentos helicoides flexibles a modo de “collar de perlas” de un grosor de 4-6 nm (Guo et al., 2019). En presencia de ATP se polimerizan y pasan de la forma libre, globular, a la forma filamentososa (actina-F) (Oda y Maeda, 2010). Dependiendo del tipo celular y su actividad pueden organizarse en redes ramificadas, matrices ordenadas o haces fuertemente anclados. Intervienen en todos los procesos móviles de una célula. Además están asociados a una gran variedad de proteínas que regulan su funcionamiento y estabilidad. F-actina y los MTs son los principales mediadores de la polaridad neuronal. Su organización está controlada espacial y temporalmente por numerosas proteínas de unión a la actina (ABP) y proteínas asociadas a los microtúbulos, que interactúan ampliamente y se retroalimentan entre sí (Konietzny et al., 2017). Se concentran principalmente en la región cortical cerca de la membrana plasmática, en terminales presinápticas, espinas dendríticas, conos de crecimiento (Figura 3) y, gracias al desarrollo de la microscopía de superresolución se han detectado estructuras desconocidas en dendritas y axones.

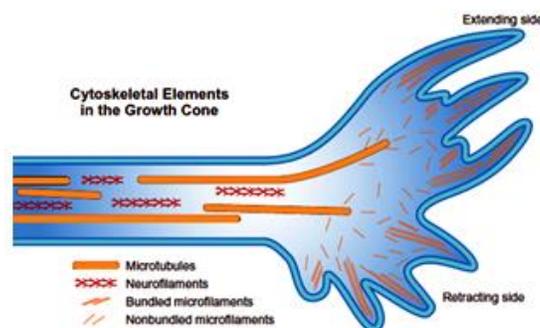


Fig. 3: Distribución de NFs, MTs y MFs en un cono de crecimiento. Los MFs son más largos y prominentes en el cono de crecimiento que en otras regiones de una neurona. Están agrupados en los

lamelipodios y, particularmente, en los filopodios. Se cree que una combinación de ensamblaje de actina, entrecruzamiento de microfilamentos y motores de miosina median la motilidad. En el núcleo central del cono de crecimiento, los MFs pueden interactuar con los MTs axónicos, que no se extienden a la periferia. Estos MTs pueden ser atraídos hacia la dirección preferida de crecimiento y parecen ser necesarios para el avance neto. En ausencia de MTs, los filopodios se extienden y se retraen, pero el cono de crecimiento no avanza. Finalmente, los NFs parecen estabilizar la neurita y consolidar los avances, pero parecen estar excluidos del cono de crecimiento propiamente dicho. Extraído y adaptado de Pigino et al., 2012.

Quizás las estructuras basadas en F-actina más llamativas de las dendritas son las espinas, pequeñas protuberancias membranosas que albergan sinapsis. La disposición de F-actina dentro de las espinas es muy dinámica y está sujeta a una remodelación constante dependiente de la actividad. Recientemente se han descubierto estructuras adicionales basadas en F-actina dentro de los ejes de las dendritas: parches de actina, fibras longitudinales y anillos. Esta red periódica que consta de actina y espectrina parece invadir y extenderse en el axón, las dendritas y en el cuello de espinas dendríticas. Se cree que estas estructuras sostienen la forma de las neuritas, ayudan en la organización de las proteínas a lo largo de la membrana plasmática, estabilizan el citoesqueleto de MT subyacente y podrían influir en el transporte de orgánulos (Konietzny et al., 2017).

En este estudio se evaluará además el rol de dos proteínas no-estructurales, vinculadas con la plasticidad neuronal, que muestran estar vinculadas con la expresión de proteínas estructurales: la proteína Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) que es un gen de respuesta temprana a la actividad neuronal y que modula muchas formas de plasticidad sináptica y formación de memoria (Lyford et al., 1995; García et al. 2017; Avallone et al., 2023). Arc favorece el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP) regulando la dinámica y la expansión del citoesqueleto de F-actina en las espinas dendríticas activas (Bramham et al., 2008). Además, Arc puede autoensamblarse en cápsides, lo que conduce a una nueva forma de comunicación entre neuronas. La dinámica temporal de la expresión de Arc está regulada por muchos factores. Por ejemplo, la actividad de los astrocitos vía la expresión de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y L-lactato, entre otros (Chen et al., 2023).

La otra proteína que evaluaremos es ADNP (Activity-dependent neuroprotective protein), esencial para la plasticidad neuronal durante el desarrollo embrionario y en la adultez. En el estado saludable, ADNP amplifica el transporte axonal y la plasticidad sináptica (Gozes et al., 2018; Maugeri et al., 2024). Un trabajo realizado con ratas sometidas a ejercicio moderado en un treadmill mostraron un aumento significativo en marcadores del citoesqueleto, β -Tubulin III, que correlacionaba con un aumento de ADNP en el hipocampo y cerebelo (Maugeri et al., 2024). Además, un reporte anterior determinó que existen diferencias sexuales en la respuesta de ADNP en el hipocampo de ratones y que, en hembras, hay fluctuaciones dependiendo del ciclo estro/proestro (Malishkevich et al., 2015).

Existen diversos protocolos de ejercicio, forzado y voluntario, continuo e intermitente con

diferentes frecuencias e intensidades. Los modelos con intensidades moderadas y dentro del rango aeróbico, parecen ser los que aportan los efectos neurotróficos y neuroprotectores más deseables sobre el cerebro (Jiang et al., 2024; Maugeri et al., 2024). Además, los efectos del ejercicio no parecen tener el mismo impacto en distintas áreas cerebrales. Se reportó (García et al., 2012) que solamente 4 semanas de training en el treadmill produjo cambios significativos y muy robustos en la expresión de proteínas estructurales presentes en las sinapsis synapsin I (SYS), synaptophysin (SYP), y proteínas del citoesqueleto neuronal, microtubule-associated protein 2 (MAP2) and neurofilaments (NF) en la corteza motora, estriado y cerebelo. Por esta razón, hemos elegido realizar nuestro estudio siguiendo un protocolo de ejercicio aeróbico moderado, regular y de intensidad variable y estudiar marcadores de citoesqueleto en el hipocampo, corteza y estriado, en consistencia con nuestros trabajos anteriores (Pietrelli et al., 2011, 2012; 2018).

8.) Objetivos:

8.1. Objetivos generales

Estudiar el efecto del ejercicio aeróbico regular, de intensidad moderada, sobre los principales marcadores del citoesqueleto, y proteínas asociadas, en áreas selectas del cerebro vinculadas con la memoria y el aprendizaje y su relación con la morfología de células nerviosas.

8.2.) Objetivos específicos →preguntas de investigación

El ejercicio regular de intensidad moderada:

1. ¿afecta la morfología, ultraestructura y organización molecular de marcadores de citoesqueleto y proteínas asociadas, en neuronas y glía?
2. ¿afecta la expresión de marcadores de citoesqueleto y proteínas asociadas?
3. ¿produce diferencias regionales en el perfil de expresión de estos marcadores?
4. ¿existe dimorfismo sexual en las respuestas 1,2,3?

9.) Hipótesis

El ejercicio regular y moderado produce efectos plásticos en la expresión de proteínas del citoesqueleto y proteínas asociadas, afectando la creación y mantenimiento de la forma celular y promoviendo el desarrollo de neuritas y contactos sinápticos.

10.) Metodología

ANIMALES, POBLACIÓN EN ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Animales, Población en estudio y condiciones de alojamiento: La población en estudio serán ratas machos y hembra de la cepa Wistar, producidas y criadas en el Bioterio de la Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales (UCES). Los animales serán alojados en jaulas de acero inoxidable, en condiciones basales, sin enriquecimiento ambiental. El fotoperíodo de base fue de 12:12 h luz: oscuridad, con luces encendidas a 0:00 am definido Zeitgeber (ZT) tiempo 0 (ZT0) y luces apagadas a las 12:00 pm, (ZT12).

Una cohorte de N= 48 crías destetadas a los 21 días, pesando 200 a 220 g al inicio del experimento, será distribuída en dos poblaciones, controles (C), n= 24 y ejercitados (E), n=24.

Los animales serán asignados aleatoriamente a uno de los cuatro grupos o subpoblaciones:

1. Controles (C), n=24. Machos, n=12 y Hembras, n=12. Subpoblación sedentaria que no será expuesta al ejercicio durante todo el desarrollo del estudio.
2. Ejercitados (E), n= 24. Machos, n= 12 y Hembras, n= 12. Subpoblación expuesta al ejercicio durante 16 semanas.

Las ratas estarán alojadas de a dos por jaula y con libre acceso a la comida y bebida. Temperatura de la sala 22-24°C. Durante todo el desarrollo del estudio se realizarán controles semanales del estado clínico, pesos corporales, consumo de comida y bebida. Luego del destete, a los 21 días, a partir del día 30, y durante 15 días, se realizará el período de manipulación y habituación a la sala experimental y al treadmill-running motorizado (Fig.1), para que los animales asignados al grupo E, exploren libremente el entorno físico de trabajo, se familiaricen con la cinta de correr y aprendan la dirección de carrera. Los del grupo C, también serán manipulados y habituados de la misma manera, excepto que no se expondrán a la cinta en movimiento.

Se realizarán todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento, stress, dolor, fatiga y discomfort que pudieran, eventualmente, ocurrir. También, para reducir la cantidad de animales, se realizó el cálculo del tamaño mínimo necesario (N=48) en base a parámetros selectos, utilizando el software GPower 3.1.9.7: test a dos colas; tamaño del efecto=0.5; probabilidad de error α = 0.05; potencia (1- β)= 0.90.

Todos los procedimientos para el cuidado y el uso de animales de experimentación se someterán a la evaluación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad Medicina de la UCES. Además, el diseño y los procedimientos propuestos se ajustan a las recomendaciones de las guías internacionales referidas a la especialidad:

- National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 2011).
- Animal Exercise Protocols. American Physiological Society (Kregel et al., 2006).

Diseño experimental: Los animales iniciaran la habituación a la sala experimental y al treadmill running a los 30 días posnatal y se extenderá por 15 días, de modo que el inicio del experimento será en el día 45 posnatal. La duración total del entrenamiento será de 16 semanas para el grupo E. Concluido el entrenamiento físico, el día posterior se procederá a la evaluación cognitiva a través del Test de reconocimiento de objetos nuevos (NOR).

Punto Final: Una vez concluido el Test cognitivo-conductual, se realizará el punto final para los grupos E y C, de ambos sexos, a la edad de 6 meses, y se obtendrán: cerebros fijados por perfusión con paraformaldehído para IHC, IF y muestras frescas para WB, ELISA y RT-qPCR para cuantificar proteína y expresión ARNm de ciertas proteínas. Se estudiarán muestras de corteza, hipocampo y estriado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

El análisis estadístico de los datos comenzará con un análisis exploratorio, y luego, si las distribuciones son normales, se aplicarán test de Student para dos grupos independientes (ejercicio vs. control) y/o ANOVAS de un factor (ejercicio) o de dos factores (ejercicio x sexo) o (ejercicio x región). Si fuera necesario, se realizarán pruebas no-paramétricas o análisis de correlación entre variables cuantitativas. El criterio para establecer diferencias significativas será $p < 0,05$ y muy significativas $p < 0,0001$. En todos los casos, las diferencias significativas entre grupos serán analizadas con contrastes *post hoc* de Tukey o Bonferroni. Los resultados se expresarán como las medias \pm S.E.M. Se utilizará el software SPSS v.23 de IBM y los gráficos se editarán con el software GraphPad Prism v.17. (GraphPad Software Inc., USA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Protocolo de Entrenamiento Físico:

El grupo E será sometido a un protocolo de entrenamiento crónico de ejercicio aeróbico de moderada-baja intensidad, con una frecuencia semanal de 3 sesiones por semana de duración variable en minutos. Los experimentos se realizarán durante el ciclo de oscuridad (12:00 pm a 0:00 am). Seis ratas cada vez, perteneciendo a cada uno de los grupos, serán colocadas en carriles individuales y ejercitadas regularmente, desde los 45 días pn., habiendo alcanzado la madurez sexual, hasta los 6 meses de edad, que se considera un adulto joven relativo a la extensión del ciclo vital (supervivencia hasta los 19-20 meses).

El “treadmill-running” (Fig. 4) es una cinta motorizada que registra los parámetros de carrera: flujo de aire (litros/minuto, l/min); concentración de oxígeno (partes p/millón, ppm); velocidad (metros/minuto, m/min); pendiente (grados, °); tiempo de carrera (minutos, min); distancia acumulada (metros, m); temperatura interna (grados, °C).

Previo al comienzo del protocolo, las ratas cumplirán 1 semana de habituación a la cinta de correr (sin/con movimiento, sin/con la tapa de cierre) y también, el aprendizaje del sentido de carrera. Seis ratas corredoras cada vez (6 machos y 6 hembras) serán entrenadas regularmente 3 veces por semana durante 12 semanas (grupo E).

Parámetros del protocolo:

- 1) pendiente a 0° durante todo el experimento
- 2) frecuencia semanal de 3 veces x semana.
- 3) velocidad de 12 m/min durante todo el experimento
- 4) duración variable según lo indicado:

- Inicio → día 45 pn
- Mes 1: 2 semanas, 30 minutos.
- Mes 2 → durante 4 semanas correrán 40 minutos.
- Mes 3 → durante 4 semanas correrán 50 minutos.
- Mes 4 → durante 4 semanas correrán 60 minutos.

Se registrará numérica y gráficamente en tiempo real, en cada sesión, el consumo de oxígeno (VO_2 , en $mL \cdot min^{-1}$), verificando las condiciones aeróbicas del ejercicio.

La rutina de entrenamiento tiene características aeróbicas de moderada-baja intensidad (aprox. el 60 % del max VO_2). Los animales del grupo C, $n=12$, serán manipulados y colocados, seis por vez, en la cinta inmóvil manteniendo condiciones similares a los ejercitados. Todos los grupos recibirán una recompensa al final de la sesión que consiste en un aro de cereal frutado (“frootloop”). Teniendo en cuenta que aplicaremos crónicamente un modelo de ejercicio forzado, trataremos de prevenir los posibles efectos de una condición de estrés crónico, estableciendo los siguientes criterios de trabajo: 1) manipulación extensiva. 2) ningún animal será obligado a correr con estímulos aversivos. 3) la frecuencia de entrenamiento debe permitir una adecuada recuperación de las reservas de glucógeno muscular y hepático. 4) 5 min previos a correr y 5 min posteriores a la rutina se alentará a los animales a tener contactos sociales con sus pares y a explorar el equipo libremente. 5) las paredes divisorias transparentes del equipo les permitirán tener una visión clara de sus pares mientras comparten la experiencia de correr en la cinta. 6) control exhaustivo del bienestar de los animales durante y después de la carrera y finalmente, 7) será excluido del entrenamiento el animal que muestre discomfort o que se rehúse a correr.

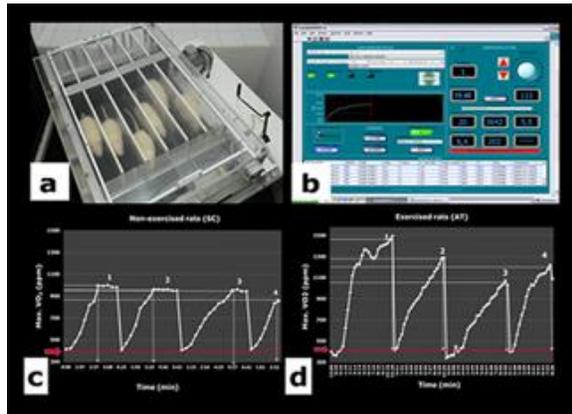


Fig. 4. La cinta de correr (“Treadmill-Running”). (a-b) Vista de frente y lateral. (c) seis ratas son entrenadas en la cinta. (d) un software de diseño registra los parámetros de la carrera en tiempo real. Pietrelli et al., 2012 y 2018.

Protocolo para evaluación cognitivo-conductual:

Se estudiará la memoria de reconocimiento de objetos nuevos mediante la utilización del laberinto Bow Tie (Fig. 6) diseñado para estudiar funciones cognitivas complejas, aplicando el protocolo adaptado de Kinnavane et al., 2015. Las etapas del test se describen a continuación:

- **FASE DE HABITUACIÓN:** Los animales realizarán durante una semana una habituación al equipo, para lo cual cada rata será colocada en el centro del laberinto sin objetos, durante 5 minutos para que explore libremente los 4 brazos.
- **FASE DE MUESTRA:** Trial 1. Cada rata será colocada en el centro del laberinto para explorar dos objetos idénticos A y B, colocados en brazos opuestos. Se le permitirá explorarlos durante 5 minutos y luego se retira. Se registra el tiempo de exploración de ambos objetos y la fase de latencia.
- **FASE DE RETRASO:** Durante 3 minutos se mantiene afuera mientras se coloca un objeto nuevo C, y se mantienen los objetos familiares A y B.
- **FASE DE ELECCIÓN:** Trial 2. Se coloca a la rata nuevamente durante 5 minutos y se registran los tiempos de exploración de los objetos familiares y objeto nuevo (figura 6).

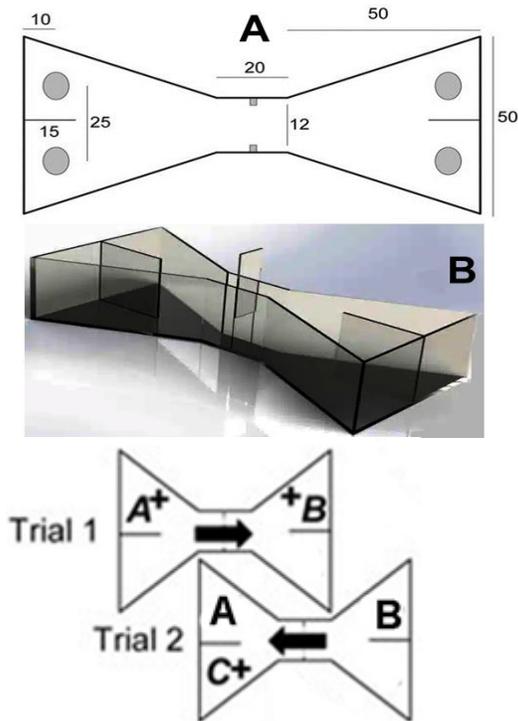


Fig. 6: Bow Tie Maze. (A) Dimensiones de la caja, en centímetros; (B) Vista lateral del equipo mostrando los 4 sectores donde se colocarán los objetos. Al costado, trial 1 y 2 (ver texto).

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS FIJADAS Y FRESCAS

Técnica de Perfusión *in vivo*.

Las muestras de cerebro serán obtenidas por esta técnica (Figura 5). Los animales (C, n=3; E, n=3) serán anestesiados (IP) con Pentobarbital sódico (50 mg/kg) y sometidos a perfusión transcárdica con 50 mL de solución de 0.9% NaCl conteniendo 50 IU de heparina siguiendo con 250 mL de solución fijadora conteniendo 4% paraformaldehído en 0.1 M de buffer fosfato pH 7.4. Los cerebros son disecados y post-fijados ON en la misma

solución fijadora. A continuación se realizará el primer lavado con una solución conteniendo 5% de sacarosa en buffer fosfato 0.1 M. Las muestras serán cortadas con un vibrátomo (Leyca 400) en secciones coronales de 40 μm conteniendo el área CA1 del giro dentado del hipocampo según indica la figura del Atlas de Franklin and Paxinos (2007), (Fig. 10). Las secciones que no se utilicen inmediatamente se congelarán a -20°C con una solución crioprotectora de glicerol 50% en PBS con 1% azida sódica. Todos los reactivos que se emplearán son de Sigma Chemical Co., USA.

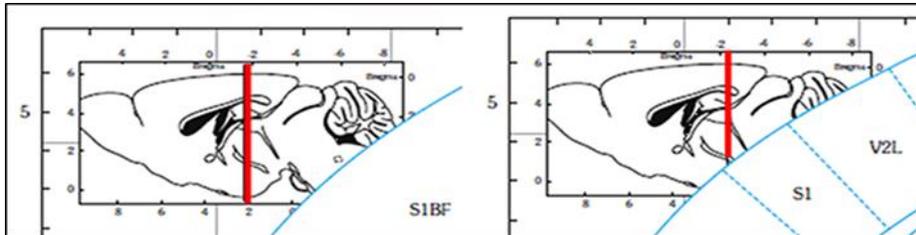


Fig.5. Mapas estereotáxicos. Coordenadas del Hipocampo: desde Bregma -1.58 mm (Placa 44) hasta -2.30 mm (Placa 50). Extraído del Atlas de Paxinos y Watson (2007).

Técnica de Inmunoperoxidasa (IHQ); Inmuno fluorescencia (IF)

Los cortes seleccionados serán procesados por ambas técnicas para la inmunodetección de los marcadores de interés. La cuantificación de la expresión se realizará por densitometría óptica a partir de imágenes digitalizadas en un rango de magnificación de 2.5 X hasta 40 X, obtenidas por microscopía óptica, de fluorescencia y/o confocal. Se estudiarán los siguientes marcadores histológicos: MAP 2; β -Tubulina III; Iba-1; GFAP; NF-Kd200; Tau. También se realizará un ensayo para determinar la relación Actina G: F con un kit *in vivo* siguiendo las especificaciones del fabricante. Los cortes serán observados con microscopio de inmunofluorescencia y la cuantificación se realizará por DO y WB.

Técnica de Western-blotting (WB)

Las muestras (C, $n=6 \times 2$ y E, $n=6 \times 2$) de corteza e hipocampo serán corridos que en un gel SDS-PAGE al 10 o 12% utilizando un mini-cell system (Bio-Rad, Hercules, CA) y luego transferidos a una membrana de PVDF (Bio-Rad). Para cuantificar la expresión de los marcadores: MAP 2; β -Tubulina III; Iba-1; GFAP; NF-Kd200; Tau, en la corteza cerebral, se trabajará a partir de un pool de corteza total obtenido de muestras de la corteza prefrontal medial, perirrinal y temporoparietal (parahipocampal). Las muestras de C y E se

analizarán juntas, por duplicado. Los geles teñidos con azul de Coomassie como control de transferencia y las membranas con rojo Ponceau como control de carga de proteína se bloquearán en tampón de bloqueo de blots en TBS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Después de tres lavados en TBST, los blots se incubarán con los AC 1os. Correspondientes, durante la noche con agitación suave a 4 °C. Veinticuatro horas después, se realizará el lavado e incubación con los AC 2os durante 2 h a TA. Después de lavar los blots con TBST, se realizará la detección de bandas con β -Actina como proteína de referencia y cuantificación.

Determinación de la expresión relativa de ARC, β Tubulina III y ADNP por PCR en tiempo real

Se determinarán los niveles relativos de expresión de **ARC, β -Tubulina III y ADNP** (Proteína Neuroprotectora Dependiente de Actividad) en muestras de ARN provenientes de hipocampo, corteza y estriado de animales corredores (n=12; 6 hembras y 6 machos) y no corredores (grupo control, n=12; 6 hembras y 6 machos). Para esto se realizará una extracción de ARN siguiendo un protocolo estándar utilizando un reactivo comercial (Biozol, Pb-L, Buenos Aires, Argentina). Las muestras de ARN serán digeridas con DNasa (1 μ g de ARN con 1 U de RQ1, Promega, WI, EE. UU.) durante 30 minutos a 37°C para eliminar trazas de ADN genómico. Luego se añadirá una solución de parada (RQ1) y se incubarán las muestras durante 10 minutos a 65 °C para la inactivación de la enzima. La integridad de las muestras de ARN extraídas se verificará mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1x, mientras que la pureza y concentración serán determinadas por espectrofotometría (260 nm/280 nm). Las muestras de RNA resultantes se incubarán con una retrotranscriptasa (M-MLV, 200 U/muestra, Pb-l) durante 1 hora a 42°C para la transcripción reversa, seguido de 10 minutos a 94 °C para la inactivación de la enzima.

La expresión relativa de ARC, β -Tubulina III y ADNP se evaluará mediante PCR en tiempo real utilizando cebadores descritos previamente (ver tabla 1). Cada muestra será evaluada por triplicado para cada uno de los genes y se utilizará GAPDH como gen de referencia. Las amplificaciones se realizarán utilizando Mix qPCR SYBR/ROX (Pb-L) y siguiendo una reacción estándar (95 °C durante 10 min y 40 ciclos a 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s para la terminación). El análisis de la curva de melting se realizará después de cada ciclo (StepOne, Applied Biosystems, Thermo Fisher). Para determinar la expresión relativa de cada uno de los genes de interés se utilizará el método $\Delta\Delta$ CT (Livak y Schmittgen, 2001). Se calculará el valor promedio de Ct para ARC, β -Tubulina III, ADNP y GAPDH y se obtendrán los valores de Δ Ct en cada región (hipocampo, corteza y estriado) para cada uno de los animales, relativizando los valores obtenidos de Ct para cada gen respecto al gen de referencia. Luego, se obtendrá la diferencia en la expresión génica ($\Delta\Delta$ Ct) entre los animales corredores y el grupo control. Este valor se utilizará para calcular el cambio en los niveles de la expresión génica entre los grupos experimentales ($2^{-\Delta\Delta$ Ct).

Gen	Secuencia	Referencia
Fw ARC	5' GGCATCTGTTGACCGAAGTGT 3'	Kádár et al, 2013
Rv ARC	5' CACATAGCCGTCCTCAAGTTGTTCT 3'	Kádár et al, 2013
Fw β -Tubulina III	5' CCTGGAACCCACAGTTATTGATGA GTTCG 3'	Yamamori, 1991
Rv β -Tubulina III	5' AGAAGCCCTGGAGACCCGTGCACTGGTCAG 3'	Yamamori, 1991
Fw ADNP	5' ATGACCCCTGGAAGGACAGC 3'	-
Rv ADNP	5' TCAGGCTCCTTCTTGCTCAG 3'	-
Fw GAPDH	5' TGATTCTACCCACGGCAAAGT 3'	Inoue et al, 2002
Rv GAPDH	5' AGCATCACCCATTGATGT 3'	Inoue et al, 2002

Tabla 1. Secuencia de los cebadores específicos que se emplearán para la amplificación de los distintos genes de interés.

Cuantificación de ARC β -Tubulina III y ADNP por ELISA

Para la cuantificar la expresión de ARC, β -Tubulina III y ADNP se emplearán ELISAs comerciales MBS456296-48TST - ARC ELISA kit : Rat Activity Regulated Cytoskeleton MBS4504147-48TST - Tubb3 rtu elisa kit. Rat Tubulin Beta 3 ELISA Kit MBS28164, 48TST ADNP ELISA kit. Rat Activity-dependent neuroprotector homeobox protein. Se emplearán homogenatos de hipocampo, corteza y estriado que serán procesados siguiendo las indicaciones provistas por el fabricante. Brevemente, los tejidos serán lavados con PBS 1x para eliminar restos de sangre. Se agregarán 5 ml de PBS y las muestras serán congeladas y descongeladas a -80°C dos veces para promover la ruptura de las membranas celulares. Luego los homogenatos serán centrifugados a 5000xg para remover detritos y los sobrenadantes serán almacenados a -80°C hasta su uso. Se fraccionarán alícuotas de 10 μl de cada muestra que serán empleados para realizar una cuantificación de proteínas totales empleando un kit comercial (BCA Pierce, Thermo Fisher). Estos valores se utilizarán para normalizar los valores obtenidos entre las diferentes regiones de cada uno de los animales en estudio.

ELISA Kit: se incubarán 100 μl /pocillo de cada muestra o del correspondiente estándar (provisto por cada uno de los kits) junto a un anticuerpo específico biotilado en placas de 96 pocillos de alta afinidad de unión provistas por el kit, que han sido previamente sensibilizadas con un anticuerpo de captura apropiado. Las placas se incubarán por 2 horas a 37°C . Luego las placas se lavarán 3 veces empleando un lavador automático programado con 3 lavados de 250 μl /pocillo de solución de lavado (PBS-tween), con incubaciones de 5 segundos con agitación suave. El volumen remanente de cada pocillo será eliminado y se agregarán 100 μl de una solución que contiene estreptavidina conjugada a peroxidasa. Se incubarán las placas por 1 hora a 37°C y luego se lavarán con solución de lavado 5 veces tal como se describe más arriba. Las placas se invertirán y se realizarán golpes sobre un paño de papel para asegurar que los pocillos queden completamente secos y se agregarán 90 μl /pocillo de una solución que formulada con un sustrato de peroxidasa (TMB). Se incubarán las placas durante 20 minutos a 37°C en la oscuridad y luego se agregarán 50 μl de solución de parada (H_2SO_4) a cada pocillo. La densidad óptica resultante será determinada por espectrofotometría en un lector de

microplacas (BioTek). Se cuantificarán los niveles de cada proteína extrapolando los resultados obtenidos a una curva estándar, luego de normalizar los valores iniciales respecto a las proteínas totales presentes en cada muestra.

11.) Cronograma

Actividades	MESES												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Aleatorización e identificación de los grupos	X												
Habitación al treadmill-running, sala experimental y operador	X												
Entrenamiento físico		X	X	X	X								
Test cognitivo						X	X	X					
Punto final y toma de muestras									X				
Procesamiento y análisis estadístico de los resultados.									X	X	X	X	
Redacción y comunicación													X

12.) Resultados Esperados

12.1.) Aportes científicos

Documentos de trabajo:

Artículos con referato: Los resultados se presentarán en publicaciones de la especialidad, revistas del área Neurociencia (IF >2).

Capítulos de Libros: A determinar oportunamente.

Libros:

Traducciones:

Conferencias Científicas: El trabajo se presentará en reuniones científicas nacionales como los congresos anuales de la Sociedad Argentina de Neurociencia (SAN) y Sociedad Arg. de Investigación Clínica (SAIC). También se evaluará la posibilidad de participar en reuniones internacionales de la especialidad.

12.2.) Vinculación y Transferencia¹²

Vinculación con el sector productivo:

Vinculación con la sociedad civil: Los resultados pueden utilizarse para proyectos de Extensión en el área de Salud Pública y Medicina preventiva.

Vinculación con el Estado (Nacional, provincial, local):

Otros tipos de vinculaciones:

Transferencia a la cátedra sede: Los resultados de este trabajo pueden aportar nueva evidencia y conocimientos de aplicación en Neurología, Fisiología, Histología y Biología Celular y Molecular de la carrera de Medicina para las sedes Centro, San Isidro y Cañuelas.

12.3.) Mediación del conocimiento

Cursos de Capacitación:

Conferencias:

Trabajo de consultoría:

Asesoramiento especializado:

12.4.) Otros.

¹² Indicar el nombre de la entidad destinataria de la transferencia y el tipo de relación formal que habría que tramitar para concretar el vínculo

13.) Investigadores¹³:

13.1.) Seniors

DIRECTOR:

Apellido y Nombre: PIETRELLI, Adriana (UCES)

Grado Académico: Doctor

Principal actividad laboral: Gestión, Docencia e Investigación. Relativo al presente proyecto: Primer autor, diseño, coordinación, investigación, procesamiento de muestras y obtención de datos, análisis estadístico y redacción.

Dedicación al proyecto: aprox. 25 h/semanales.

CODIRECTOR:

Apellido y Nombre: FELEDER, Carlos (UCES)

Grado Académico: Doctor

Principal actividad laboral: Gestión, Relaciones Institucionales. Docencia e Investigación

Dedicación al proyecto: aprox. 10 h/semanales.

COLABORADOR:

Apellido y Nombre: CALTANA, Laura (UBA-CONICET)

Grado Académico: Doctor

Principal actividad laboral: Docencia e Investigación

Dedicación al proyecto: aprox. 15 h/semanales.

COLABORADOR:

Apellido y Nombre: MANSILLA, Florencia (INTA-CONICET-UCES)

Grado Académico: Doctor

Principal actividad laboral: Docencia e Investigación

Dedicación al proyecto: aprox. 15h/semanales.

COLABORADOR:

Apellido y Nombre: PAGLIA, Nora (UCES)

Grado Académico: Médica Veterinaria

Principal actividad laboral: Investigación

Dedicación al proyecto: aprox. 15h/semanales.

COLABORADOR:

Apellido y Nombre: ORZUZA, Ricardo (UCES)

Grado Académico: Técnico Bioterista

Principal actividad laboral: Investigación

¹³ Anexar CV (máximo cuatro folios) para cada uno de ellos.

Dedicación al proyecto: aprox. 15/semanales.

13.2.) Juniors

Apellido y Nombre:
Grado Académico:
Principal actividad laboral:
Dedicación al proyecto.

13.3.). Tesistas

Apellido y Nombre:
Carrera de postgrado que cursa:
Dedicación al proyecto.

13.4.) Alumnos asistentes de Investigación.

Apellido y Nombre: IRIONDO DARRIBAS, Jone (estudiante de grado intermedio de Medicina en UCES)

Breve descripción de las tareas que se asignarán: mantenimiento de sala, control clínico junto con la médica veterinaria, entrenamiento de los animales y obtención de muestras.

Apellido y Nombre: PATRICIO, Rayk (estudiante de grado de nivel inicial de Medicina en UCES)

Breve descripción de las tareas que se asignarán: mantenimiento de sala, colaboración en control clínico junto con la médica veterinaria, entrenamiento de los animales y obtención de muestras.

14.) Bibliografía

1. Akhmanova, A. and Steinmetz, M.O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight *Nature Reviews, MOLECULAR CELL BIOLOGY* doi: 10.1038/nrm4084
2. Avallone, M. *et al.* (2023). Visualizing Arc protein dynamics and localization in the mammalian brain using AAV-mediated in situ gene labeling. *Front. Mol. Neurosci.* 16:1140785. doi: 10.3389/fnmol.2023.1140785

3. Avila, J. *et al.* (2020). Editorial: Shaping the Brain by Neuronal Cytoskeleton: From Development to Disease and Degeneration *Front. Cell. Neurosci.* 14:12. doi: 10.3389/fncel.2020.00012
4. Bott, C.J. and Winckler, B. (2020). Intermediate filaments in developing neurons: Beyond structure. *Cytoskeleton*, 77:110–128. DOI: 10.1002/cm.21597
5. Bramham, CR., *et al.* (2008). The Immediate Early Gene Arc/Arg3.1: Regulation, Mechanisms, and Function. *The Journal of Neuroscience*, 28(46):11760 –11767
6. Bucher, M. *et al.* (2020). Cytoskeletal makeup of the synapse: Shaft versus spine. *Cytoskeleton* 77, 55–64. DOI: 10.1002/cm.21583
7. Cardanho-Ramos, C. *et al.* (2020). Orchestrating mitochondria in neurons: Cytoskeleton as the conductor *Cytoskeleton*, 77:65–75.
8. Conde, C. *et al.* (2022). Editorial: Neuronal cytoskeleton and GTPases in health and diseases *Front. Cell Dev. Biol.* 10:1025527. doi: 10.3389/fcell.2022.1025527
9. Chen, Y. *et al.*, (2023). Mechanisms and Functions of Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein in Synaptic Plasticity. *Mol Neurobiol* 60(10):5738-5754. doi: 10.1007/s12035-023-03442-4
10. Da-Peng Gao, *et al.* (2024). Chronic Alcohol Exposure Alters the Levels and Assembly of the Actin Cytoskeleton and Microtubules in the Adult Mouse Hippocampus *J. Integr. Neurosci.* 23(6): 118 <https://doi.org/10.31083/j.jin2306118>
11. De Giosio, R. *et al.* (2022). More than a marker: potential pathogenic functions of MAP2. *Front. Mol. Neurosci.* 15:974890. doi: 10.3389/fnmol.2022.974890
12. Fournier, A., *et al.* (2015). Changes in Neurofilament and Microtubule Distribution following Focal Axon Compression. *Plos ONE*. ONE 10(6): e0131617. doi:10.1371/journal.pone.0131617
13. Ganns, D., *et al.* (2006). Investigation of general and cytoskeletal markers to estimate numbers and proportions of neurons in the human intestine *Histol Histopathol* 21, 41-51
14. Godsel, L.M. *et al.* (2007). Intermediate filament assembly: dynamics to disease reserved. *Cell Press*. doi:10.1016/j.tcb.2007.11.004
15. Garcia, P., *et al.* (2012). Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. *Brain Res.*, 26-48 doi:10.1016/j.brainres.2012.03.059.

16. Garcia, P. et al., (2017). The Impact of Short and Long-Term Exercise on the Expression of Arc and AMPARs During Evolution of the 6-Hydroxy-Dopamine Animal Model of Parkinson's Disease. *J Mol Neurosci*. DOI 10.1007/s12031-017-0896-y
17. Gozes, I. et al. (2018). ADNP, a Microtubule Interacting Protein, Provides Neuroprotection Through End Binding Proteins and Tau: An Amplifier. *Front. Mol. Neurosci*. 11:151. doi: 10.3389/fnmol.2018.00151
18. Inoue H, Kimura A, Tuji T. Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study. *Forensic Sci Int*. 2002 Dec 4;130(2-3):127-32. doi: 10.1016/s0379-0738(02)00352-3. PMID: 12477633
19. Janke, C. and Magiera, M.M. (2020). The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nature Reviews | Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0214-3>
20. Jiang, H. et al. (2024). Effects of different exercise modes and intensities on cognitive performance, adult hippocampal neurogenesis, and synaptic plasticity in mice. *Exp Brain Res* **242**, 1709–1719. <https://doi.org/10.1007/s00221-024-06854-3>
21. Kádár E, Huguet G, Aldavert-Vera L, Morgado-Bernal I, Segura-Torres P. Intracranial self stimulation upregulates the expression of synaptic plasticity related genes and Arc protein expression in rat hippocampus. *Genes Brain Behav*. 2013 Nov;12(8):771-9. doi: 10.1111/gbb.12065. Epub 2013 Aug 20. PMID: 23898803.
22. Katrukha, C et al., (2021). Quantitative mapping of dense microtubule arrays in mammalian neurons. *eLife*, 10:e67925. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.67925>
23. Kinnavane, L et al., (2015). Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. *Behavioural Brain Research* 285 (2015) 67–78
24. Leterrier, C. (2021). A Pictorial History of the Neuronal Cytoskeleton. *The Journal of Neuroscience*, 41(1):11–27
25. Leung How-Wing et al. (2022). Arc Regulates Transcription of Genes for Plasticity, Excitability and Alzheimer's disease. *Biomedicines* 10, 1946.
26. Li, F., et al. (2021). Neuroplastic Effect of Exercise through Astrocytes Activation and Cellular Crosstalk. *Aging and Disease*, Volume 12, Number 7; 1644-1657. <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2021.0325>.

27. Li, J., *et al.* (2005). Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neuroscience Letters* 386, 160–164. doi:10.1016/j.neulet.2005.06.009
28. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
29. Lyford, GL *et al* (1995). Arc, a Growth Factor and Activity-Regulated Gene, Encodes a Novel C oskeleton-Associated Protein That Is Enriched in Neuronal Dendrites. *Neuron*, Vol. 14, 433-445.
30. Maria Scherma, M., *et al.* (2023). Induction of Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein and c-Fos Expression in an Animal Model of Anorexia Nervosa. *Nutrients* 15, 3830. <https://doi.org/10.3390/nu15173830>
31. Maugeri, G., *et al.* (2024). Moderate Physical Activity Increases the Expression of ADNP in Rat Brain. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 4382. <https://doi.org/10.3390/ijms25084382>
32. Oda, T. and Maeda Y. (2010). Multiple Conformations of F-actin. *Cell Press, Structure* 18, 761-767. DOI 10.1016/j.str.2010.05.009.
33. Pigino, G. *et al.* (2012). The Cytoskeleton of Neurons and Glia. Chapt. 6 in *Basic Neurochemistry, Eighth Edition*. Elsevier. American Society for Neurochemistry.
34. Pietrelli, A., *et al.* (2018) Lifelong aerobic exercise reduces the stress response in rats. *Neuroscience*, 376,94–107
35. Pietrelli, A., *et al.* (2018). Effects of aerobic exercise and aging on BDNF-Serotonin systems and cognitive function in rats. *Neurobiol Learn Mem* Vol.155, p.528-542.
36. Pietrelli, A. *et al.* (2012). Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. *Neuroscience*, 202, 252–266.
37. Pietrelli, A *et al.* (2011). Effects of moderate and chronic exercise on the nitrenergic system and behavioral parameters in rats. *Brain Research*, 1389, 71–82.
38. Pinto-Costa, R. and Sousa, M.M. (2019). Profilin as a dual regulator of actin and microtubule dynamics. *Cytoskeleton*, 77:76–83.
39. Priel, A. *et al.* (2010). Neural cytoskeleton capabilities for learning and memory. *J Biol Phys*, 36:3–21 DOI 10.1007/s10867-009-9153-0

40. Reinés, A., *et al.* (2004). Neuronal cytoskeletal alterations in an experimental model of depression. *Neuroscience* 129, 529–538.
41. Reisler, E. and Egelman, EH. (2007). Actin Structure and Function: What We Still Do Not Understand. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282, No. 50, 36133–36137.
42. Sjöqvist, M., *et al.*, (2020). From structural resilience to cell specification- Intermediate filaments as regulators of cell fate. *The FASEB Journal*; 35:e21182. DOI: 10.1096/fj.202001627R
43. Venkatesh, K. *et al.* (2019). Role of actin in organelle trafficking in neurons. *Cytoskeleton*, 77:97–109. DOI: 10.1002/cm.21580
44. Witte, H. and Bradke, H. (2008). The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current Opinion in Neurobiology*, 18:479–4, doi 10.1016/j.conb.2008.09.019
45. Zhu, Y. and Gang Song, G (2024). Molecular origin and biological effects of exercise mimetics. *Journal of Exercise Science & Fitness* 22:73–85.

PRESUPUESTO GENERAL

FECHA.....

REACTIVOS		Uni	PROVEEDOR	U\$S
1	[SG-M4403-50UL] Monoclonal Anti-MAP2 antibody produced in mouse clone HM-2, ascites fluid. Env. x 50uL. Sigma	1	Merck	592.90
2	Neurofilamentos Kd-200	1	Tecnolab	843,98
3	Rabbit monoclonal [EPR16588] to Iba1 100ul 1.905,02 Cód:ab178846-100ul-ABCAM	1	Tecnolab	1.905,02
4	Anti-Tau (Tau-13)- sc-21796 200 µg/ml	1	Tecnolab	843
5	Anti-beta tubulina III	1	Tecnolab	843
6	Alexa Fluor 568 goat anti rat-A11011		Thermo Fisher	331,5
7	Alexa Fluor 488 goat anti rat-A11008		Thermo Fisher	391.68
8	11539306-ProLong™ Gold Antifade Mountant, 1 x 10 mL	1	Thermo Fisher	335
9	[SG-P6148-1KG] Paraformaldehyde reagent grade, crystalline. Env. x 1Kg.- Sigma	3	Merck	1,038.18
10	[SG-W252506-1KG-K] Glycerol ACS reagent, ≥99.5%. Env. x 1Kg. Sigma	2	Merck	205.70
11	Tips 1000 ul y crioviales x 2ml Tips Corning de 1-200µl, no estéril en bolsa x 1000u.	1 bolsa x 1000	OneLab	65,74 43,21
12	BK037 - G-Actin : F-Actin In Vivo Assay Kit- CYTOSKELETON	1	Genbiotech	2898,55
13	IK0101 Set de dNTPs (100 mM) 4 X 10 umoles	1	PB-I	77,59
14	EA2402 Master Mix qPCR 2.0 Sybr/Rox 500 reac.	2	PB-I	871,34
15	RA0201 Bio-ZOL- Extraccion de RNA 100 ml	1	PB-I	154,41
16	IC0101 RNase Inhibitor (40 U/µl) 1.200 U	1	PB-I	114,12
17	EA2703 M-MLV Transcripta 2.0 40.000 U	1	PB-I	357,20
18	IA0602 Agua Ultrapura - Libre de nucleasas 50 ml	1	PB-I	7,52
19	IA0802 DTT - Ditioneitol 5 g.	1	PB-I	111,23
20	B071-40 Oligo dT 15 Primer 40µg	1	Biodynamics	314
21	Cód:5100311C/P, Tiras de 8 tubos de PCR/qPCR de 0.1ml con tapa; caja x120 tiras	2	Tecnolab	360,56
22	MBS456296-48TST - ARC ELISA kit : Rat Activity Regulated Cytoskeleton	1	Mybiosource	505
23	MBS4504147-48TST - Tubb3 rtu elisa kit. Rat Tubulin Beta 3 ELISA Kit	1	Mybiosource	526
24	MBS28164, 48TST ADNP ELISA kit. Rat Activity-dependent neuroprotector homeobox protein ELISA Kit)	1	Mybiosource	500
25	gastos administrativos y de envío, aproximados (MyBiosource)	1	Mybiosource	450
26	Síntesis de cebadores	1	IDT	160

• PRESUPUESTO TOTAL EN DÓLARES: 14846,43 U\$S

PRESUPUESTO POR ETAPAS

ETAPA 1

FECHA.....

TOTAL: 4508,97 U\$S

13	IK0101 Set de dNTPs (100 mM) 4 X 10 umoles	1	PB-I	77,59
14	EA2402 Master Mix qPCR 2.0 Sybr/Rox 500 reac.	2	PB-I	871,34
15	RA0201 Bio-ZOL- Extraccion de RNA 100 ml	1	PB-I	154,41
16	IC0101 RNase Inhibitor (40 U/μl) 1.200 U	1	PB-I	114,12
17	EA2703 M-MLV Transcripta 2.0 40.000 U	1	PB-I	357,20
18	IA0602 Agua Ultrapura - Libre de nucleasas 50 ml	1	PB-I	7,52
19	IA0802 DTT - Ditioneitol 5 g.	1	PB-I	111,23
20	B071-40 Oligo dT 15 Primer 40μg	1	Biodynamics	314
21	Cód:5100311C/P, Tiras de 8 tubos de PCR/qPCR de 0.1ml con tapa; caja x120 tiras	2	Tecnolab	360,56
22	MBS456296-48TST - ARC elisa kit : Rat Activity Regulated Cytoskeleton	1	Mybiosource	505
23	MBS4504147-48TST - Tubb3 rtu elisa kit. Rat Tubulin Beta 3 ELISA Kit	1	Mybiosource	526
24	MBS28164, 48TST ADNP ELISA kit. Rat Activity-dependent neuroprotector homeobox protein ELISA Kit)	1	Mybiosource	500
25	gastos administrativos y de envío, aproximados (MyBiosource)	1	Mybiosource	450
26	Síntesis de cebadores	1	IDT	160

ETAPA 2

FECHA.....

TOTAL: 5751,08 U\$S

1	[SG-M4403-50UL] Monoclonal Anti-MAP2 antibody produced in mouse clone HM-2, ascites fluid. Env. x 50uL. Sigma	1	Merck	592.90
---	---	---	-------	--------

2	Neurofilamentos Kd-200	1	Tecnolab	843,98
3	Rabbit monoclonal [EPR16588] to Iba1 100ul 1.905,02 Cód:ab178846-100ul-ABCAM	1	Tecnolab	1.905,02
4	Anti-Tau (Tau-13)- sc-21796 200 µg/ml	1	Tecnolab	843
5	Anti-beta tubulina III	1	Tecnolab	843
6	Alexa Fluor 568 goat anti rat-A11011		Thermo Fisher	331,5
7	Alexa Fluor 488 goat anti rat-A11008		Thermo Fisher	391,68

ETAPA 3

FECHA.....

TOTAL: 4586,38 U\$S

8	11539306-ProLong™ Gold Antifade Mountant, 1 x 10 mL	1	Thermo Fisher	335
9	[SG-P6148-1KG] Paraformaldehyde reagent grade, crystalline. Env. x 1Kg	3	Merck-Sigma	1,038.18
10	[SG-W252506-1KG-K] Glycerol ACS reagent, ≥99.5%. Env. x 1Kg. Sigma	2	Merck	205.70
11	Tips 1000 ul y crioviales x 2ml Tips Corning de 1-200µl, no estéril en bolsa x 1000u.	1 bolsa x 1000	OneLab	65,74 43,21
12	BK037 - G-Actin : F-Actin In Vivo Assay Kit- CYTOSKELETON	1	Genbiotech	2898,55