

FORMULARIO PARA LA PRESENTACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACION

1.) Campo de aplicación: Ciencia Básica- Neurobiología del Ejercicio con aplicación a la Medicina Preventiva y Regenerativa.

2.) Título del Proyecto: *“Efectos del ejercicio moderado crónico sobre marcadores tempranos y tardíos de la neurogénesis adulta en el hipocampo de ratas a distintas edades”.*

3.) Entidades Participantes¹

Entidad:² Laboratorio de Neuroprotección y Neuroreparación del Instituto de Biología Celular y Neurociencias Dr. E. De Robertis (IBCN), UBA-CONICET.

Tipo de vinculación: Colaboración académico-científica.

Descripción de la vinculación: Colaboración a través de recursos compartidos. Los laboratorios mencionados aportarán la infraestructura, algunos reactivos y técnicas específicas para el procesamiento de muestras y cuantificación de marcadores celulares.

* Este proyecto puede ser ampliado y utilizado para la tesis Doctoral de un graduado de Medicina de UCES, con una co-dirección entre los laboratorios participantes del vínculo.

4.) Responsables:

4.1.) Director del Proyecto: Prof. Dra. Adriana Pietrelli

Apellido y Nombre³: PIETRELLI, Adriana

Lugar Principal de Trabajo⁴: Facultad de Ciencias de la Salud de UCES.

¹ Se refiere además de UCES:

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

³ Anexar CV actualizado

Funciones⁵: Primer autor. Coordinación general y producción de datos. Interviene en el diseño, obtención y procesamiento de datos, discusión, redacción y publicación de resultados.

Dedicación⁶ 25 horas semanales.

4.2.) Co-director del Proyecto:

Apellido y Nombre⁷:

Lugar Principal de Trabajo⁸:

Funciones⁹:

Dedicación¹⁰

5.) Antecedentes del Equipo de Investigación: Trabajos anteriores que justifican la elección del tema:

El presente proyecto se basa en los resultados obtenidos en el trabajo titulado: **“Aerobic exercise upregulates the BDNF-Serotonin systems and improves the cognitive function in rats”**, cuyo primer autor es Adriana Pietrelli, con colaboración de los siguientes investigadores externos (ver filiación debajo):

Authors: Pietrelli A.^{a,b}, Matkovic L.^{a,c}, Vacotto M.^b, Lopez-Costa, J.J.^b, Basso, N.^{a,d} and Brusco A.^b

a Department of Basic Sciences Research, School of Health Sciences, University of Business and Social Sciences (UCES). Buenos Aires, Argentina.

b Laboratory of Neuroprotection, Institute of Cell Biology and Neuroscience “Prof. E. De Robertis” (IBCN), School of Medicine, University of Buenos Aires (UBA-CONICET). Buenos Aires, Argentina

c Laboratory of Steroids, Department of Biological Chemistry, School of Sciences, University of Buenos Aires (FCEyN, UBA). Buenos Aires, Argentina.

d Laboratory of Cardiovascular Physiopathology, School of Medicine, University of Buenos Aires (FMED, UBA). Buenos Aires, Argentina.

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 Anexar CV actualizado

⁸ En función de las horas semanales dedicadas.

⁹ Se refiere a las funciones que desarrollará para monitorear, dirigir y evaluar la marcha del Programa.

¹⁰ Expresado en Horas Semanales dedicadas a la labor de gestionar el Programa.

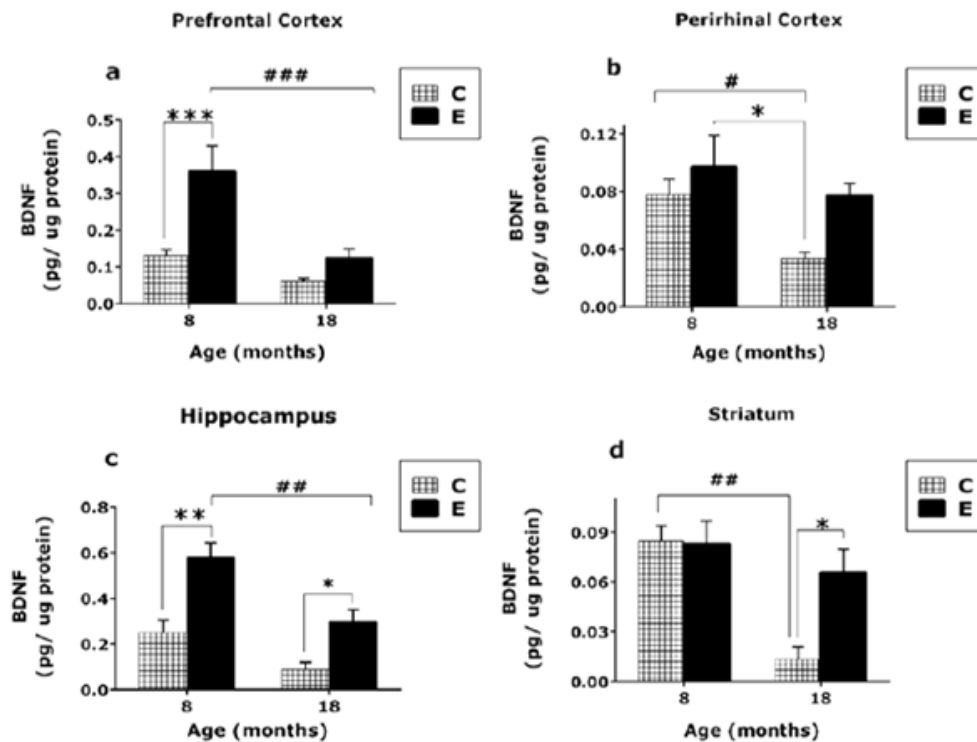
TITLE: Aerobic exercise upregulates the BDNF-Serotonin systems and improves the cognitive function in rats.

ABSTRACT: Moderate-intensity aerobic exercise (AE) benefits brain's health and behavior. Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) are known to mediate and shape cognitive processes. Both systems share some actions: BDNF is involved in the maturation and function of 5-HT neurons. In turn, 5-HT is involved in neuroplasticity phenomena mediated by BDNF and stimulated by exercise. The aim of this work was to study the long-term effects of AE on BDNF- 5-HT systems and cognitive function in rats at different ages. A lifelong aerobic exercise of moderate intensity was designed. Aerobically exercised (E) and sedentary control (C) rats were studied at middle (8 months) and old age (18 months) with biochemical, immunohistochemical and behavioral assays. The levels and expression of BDNF, 5-HT, Serotonin Transporter (SERT) and 5-HT_{1A} Receptor (5-HT_{1A}) were determined in selected brain areas related to memory and learning. Immunopositive cells to NeuN (Neuronal nuclear protein) in the hippocampus CA1 area were also quantified. The cognitive function was evaluated by the Object Recognition Test (ORT). Results indicated that AE enhanced spatial and non-spatial memory systems, modulated by age. This outcome temporarily correlated with a significant upregulation of the cortical, hippocampal and striatal BDNF levels in parallel with an increase of the number of hippocampal CA1-mature neurons. AE also increased the brain and raphe 5-HT levels, and the expression of SERT and 5-HT_{1A} receptor in the cortex and hippocampus. Old runners showed a highly conserved response, indicating a remarkable protective effect of exercise on both systems. In summary, lifelong AE positively affects BDNF-5-HT systems, improved the cognitive function and protected the brain against the deleterious effects of sedentary life and aging.

Keywords: *Aerobic exercise; Aging; Brain-derived Neurotrophic Factor; Learning; Memory; Serotonin.*

CONCLUSION: To summarize: **1)** the adaptive response of the brain to chronic AE is the result of cumulative hormetic effects that could result in compensatory and/or supercompensatory mechanisms that favor the cognitive function. **2)** the coordinated action of the 5-HT and BDNF could ensure the availability of energy resources in the cortex and hippocampus to sustain the great cognitive and motor demand. This mechanism/s could be a prerequisite for the specific action of BDNF on memory processes, adult neurogenesis, neural remodeling, and synaptic activity. **3)** AE had a neuroprotective effect of cognitive impairment in older subjects and prevented the decline of serotonergic transmission and BDNF expression secondary to aging. In conclusion, it can be suggested that regular mild training is a healthy habit to mitigate and/or prevent physiological declining of age dependent cognitive function. Besides, it turns to be a complementary intervention to conventional pharmacological therapies, which are usually prescribed in certain neurodegenerative pathologies or depression.

Este trabajo fue enviado a la revista “*Neurobiology of Learning and Memory*” de Editorial Elsevier y se encuentra en proceso de revisión a la fecha de presentación de este proyecto. A continuación se presentan **parte de los resultados** para el sistema de BDNF (directamente relacionado con la neurogénesis adulta dependiente de la experiencia), y su comportamiento regional cerebral, y la inmunodetección del antígeno nuclear (NeuN) de neuronas maduras del área CA1 del giro dentado del hipocampo (granulares y piramidales). La cuantificación de BDNF se realizó por la técnica de ELISA, y la de NeuN, por inmunocitoquímica (inmunofluorescencia) y posterior semicuantificación con score manual sobre imágenes obtenidas del microscopio de epifluorescencia y digitalizadas.



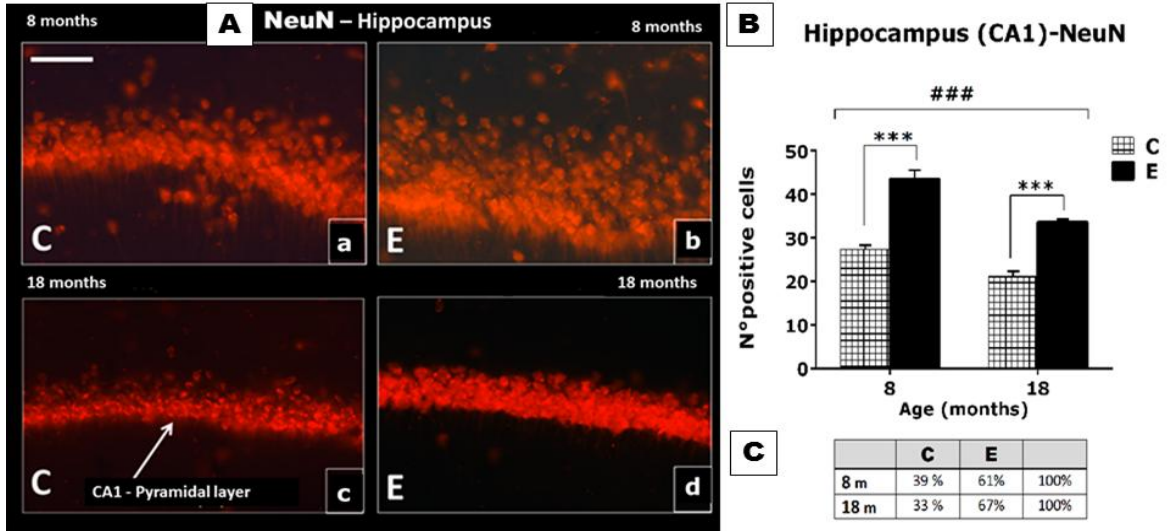
Effects of AE and age on BDNF levels in cognition-related areas: (a) Prefrontal cortex; (b) Perirhinal Cortex; (c) Hippocampus; (d) Striatum. The AE increased the BDNF levels. The greatest differences were detected among the middle-aged rats. Note that the hippocampus and, to a lesser extent, the prefrontal cortex were the regions with the highest concentration of BDNF. The AE had a neuroprotective effect in the long-term in most of the studied areas. Bars represent the mean \pm SEM. Symbols: age effects (#); exercise effects (*). Differences were considered statistically significant [* or #] when $P < 0.05$, and very significant [*** or ###] when $P < 0.001$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

El ejercicio aeróbico (EA) aumentó la expresión de BDNF en las ratas de mediana edad y viejas en la mayoría de las regiones cerebrales estudiadas. Como se esperaba, las ratas corredoras jóvenes tuvieron los mayores niveles de BDNF, especialmente en la corteza prefrontal e hipocampo, confirmando reportes anteriores (Baj y col., 2012). Las diferencias regionales observadas en este trabajo también fueron descritas por Chalimoniuk y col., (2015) en cerebros de ratas que fueron sometidas a entrenamiento de resistencia durante 6 semanas, con aumentos paralelos en los RNAm de su receptor principal, TrKB, en el hipocampo, cerebro medio y estriado. Todas las regiones cerebrales: corteza prefrontal, peririnal, estriado e hipocampo, mostraron la misma tendencia en los niveles de BDNF, pero modulada por la edad. Curiosamente, observamos diferencias muy significativas en el estriado que podrían deberse a la necesidad de mayor soporte metabólico para el control motor subcortical, y también para mantener la integridad y supervivencia de neuronas estriatales (Perovic y col., 2013).

Según Perovic y col. (2013) la expresión basal de BDNF no se modifica con la edad, pero sí el balance entre la proteína inmadura/madura. Las ratas viejas entrenadas, sin embargo, conservaron su capacidad de incrementar los niveles de BDNF en todas las áreas estudiadas. Es razonable suponer que podrían existir mecanismos que persisten en edades avanzadas, pero con menor eficiencia (Siette y col., 2013). Anteriormente, Adlard y col., (2005) investigaron los efectos del ejercicio voluntario y la edad sobre la transcripción y expresión del gen de BDNF en el hipocampo de ratas de 2, 15 y 24 meses de edad, y obtuvieron una respuesta similar. Consistentemente con Adlard y col., (2005) otros trabajos (Sheikhzadeh y col., 2015; Soya y col., 2007) mostraron un comportamiento semejante con el ejercicio moderado en el corto y largo plazo. Es importante tener en cuenta que el peso de las variaciones individuales en los sujetos viejos es muy grande a la hora de interpretar los datos.

Últimamente (Gradari y col., 2016; Heijnen y col., 2016) sugirieron que BDNF podría tener un patrón de comportamiento bifásico inducido por la actividad física (la estimulación insuficiente o exagerada no promovería más aumentos) que coincidiría con los efectos horméticos del ejercicio moderado (Bayod y col., 2011; al., Marosi y Mattson, 2014; Mattson, 2008). Se considera, entonces, que una progresiva estimulación física dentro del rango hormético (60-70% del VO_2) y aplicada en el periodo de supercompensación, podría ser capaz de inducir sucesivos aumentos de los niveles de BDNF, y quizás en otras moléculas, pero modulados por la edad. Siguiendo este criterio, se asume que el EA tuvo efectos acumulativos, que fueron de menor magnitud en los animales viejos, y que resultaron en una amplificación del sustrato neuronal, glial, vascular y a una mayor eficiencia sináptica y metabólica cerebral. Una mayor proliferación neuronal hippocampal brinda mayor soporte neuronal y correlaciona directamente con el aumento de BDNF, como lo demuestran la presencia de mayor número de neuronas positivas a NeuN en un área crítica para la memoria espacial.



Effects of AE and age on the number of hippocampal (CA1) mature neurons of the pyramidal layer, expressing NeuN. Panel A: (a-d) Photographs showing the regional location and distribution of the immunostaining. (Top panel, a-b): Mature neurons immunopositives to NeuN corresponding to middle-aged rats, C vs. E. (Bottom panel, c-d): Mature neurons immunopositives to NeuN corresponding to old rats, C vs. E. Microscope observations revealed significant qualitative differences when comparing C vs. E rats. Scale bar: 100 μ m. Magnification: (20 X). Panel B. (e) Quantification of immunopositive neurons. Note that AE increased and/or prolonged their survival and the number of pyramidal mature neurons expressing NeuN. Bars represent the mean \pm SEM. Symbols: age effects (#); exercise effects (*). Differences were considered statistically significant [* or #] when $P < 0.05$, and very significant [*** or ###] when $P < 0.001$. Panel C: Relative percentages confirming the earlier observations and two-way ANOVA results.

6.) Problema y Justificación

Se ha publicado mucho con respecto a la asociación causal del ejercicio y la salud cerebral, en modelos animales y humanos (Cotman and Engesser-Cesar, 2002; Dishman et al., 2006; Markham and Greenough, 2004). La evidencia aportada por numerosos trabajos indica que los beneficios del ejercicio son extensos y significativos en un rango amplio que incluye individuos de todas las edades y casi todas las condiciones, sean sujetos sanos o sedentarios.

Los efectos del ejercicio sobre el SNC y la conducta, parecen tener cierta selectividad regional en el cerebro. Notablemente, las áreas cerebrales involucradas con la memoria y el aprendizaje, por ejemplo la corteza y el hipocampo, son las que muestran mayor plasticidad en respuesta al ejercicio. En este sentido, uno de los temas que más llamó la atención esta última década fue el descubrimiento de la neurogénesis hipocampal adulta inducida por el ejercicio (Van Praag et al., 2005). A partir de este notable hallazgo, se sucedieron numerosos trabajos referidos a su posible impacto en la función cognitiva de sujetos físicamente activos (Berchtold et al., 2010; Kaliman et al., 2011; Kramer et al., 2006; Morgan et al., 2015; Saraulli et al., 2016). Se hipotetizó que la actividad física promueve el remodelado y la flexibilidad de redes neuronales (Erickson and Kramer, 2009). El ejercicio parece jugar un rol instrumental en la amplificación cognitiva, conectando el cerebro con el músculo (Foster, 2015). Las hipótesis actuales que intentan modelar y explicar estos fenómenos se han centrado fundamentalmente en el estudio de los cambios en neurotrofinas (NTs), sistemas de neurotransmisores (Nts) y vasculatura (Phillips et al., 2014; Rhyu et al., 2010; Van Praag, 2009; Vivar et al., 2013).

Una cuestión que queda pendiente aún hoy es cómo el ejercicio es capaz de prevenir la declinación cognitiva que ocurre con el envejecimiento (Kaliman et al., 2011; Kamijo et al., 2009; Saraulli et al., 2016; Studeski et al., 2006) en funciones como el razonamiento, la función ejecutiva, la velocidad de procesamiento, la memoria y la habilidad espacial.

Ensayos clínicos con sujetos entrenados aeróbicamente durante 12 meses, de edades mediana y avanzada, mostraron cambios funcionales y estructurales cerebrales como aumento del volumen hipocampal, amplificación de la conectividad fronto-parietal, expansión de las funciones corticales ejecutivas y de la memoria espacial (Kramer et al., 2006). Estos resultados y muchos otros obtenidos con roedores senescentes (Van Praag, 2005), indicaron que el cerebro viejo es capaz de seguir respondiendo plásticamente al ejercicio repetitivo (Kamijo et al., 2009; Kramer et al., 2006; Stranahan et al., 2010). Es evidente, entonces, que los sujetos físicamente más activos parecen tener una mejor capacidad de adaptarse a los cambios ambientales y procesar más rápido la información (Gomez-Pinilla and Hillman, 2013). Esta mayor flexibilidad mental y conductual, también permite a los individuos una mejor gestión de situaciones estresantes, e inclusive, desarrollar una importante resiliencia al stress.

Teniendo en cuenta la relevancia que tiene la práctica temprana y regular, debidamente administrada, de ejercicio, consideramos que es importante promover estudios en el área

clínica y básica que aporten el mayor conocimiento posible sobre los alcances y limitaciones de la actividad física en humanos. Este conocimiento, además, colaborará con la promoción de planes en salud pública que incluyan dicha práctica y permitan disminuir el costo social en el cuidado geriátrico.

En el contexto de estas ideas, sugerimos que la práctica de actividad física recreacional que tiene un fuerte componente aeróbico como caminar, nadar, remar, andar en bicicleta, correr suavemente, danzar, etc. son las más adecuadas para individuos sanos de todas las edades y como terapia complementaria de pacientes ambulatorios que padecen desórdenes psiquiátricos o enfermedades neurodegenerativas, y para la rehabilitación neurocognitiva de adultos mayores.

7.) Marco conceptual

El descubrimiento de que el cerebro adulto de mamífero genera continuamente nuevas neuronas y células gliales a lo largo de su vida ha modificado la visión actual de la plasticidad cerebral y ha abierto un camino esperanzador para los trastornos neurológicos, la reparación del tejido nervioso y la amplificación de la función cognitiva. El proceso de generación de nuevas neuronas se llama **neurogénesis** (Bonaguidi et al., 2013).

Las células madre o **stem cells neurales** (NSCs) se producen en regiones cerebrales especializadas llamadas “**nichos neurogénicos**”. Hoy está generalmente aceptado que los precursores neurales adultos están presentes bajo condiciones fisiológicas en la zona subventricular a lo largo de la pared del ventrículo lateral (**SVZ**) y la zona subgranular (**SGZ**) del giro dentado de la formación hipocampal (**Figura 1**). Actualmente se detectó neurogénesis *in vivo* en distintas regiones cerebrales que sufrieron una injuria, y se identificaron marcadores específicos de NSCs en el tálamo, hipotálamo, cuerpo estriado, zona subcallosa, cerebelo, médula espinal, corteza cerebral y retina, pero los resultados son conflictivos y aún son materia de intensa investigación (Ryu et al., 2016). Las stem cells neurales son muy heterogéneas en cuanto a sus identidades y propiedades, y residen en microambientes muy especializados que regulan su mantenimiento, auto-renovación, especificación de destino y desarrollo. Se sabe que los NSCs adultos generan primariamente nuevas neuronas y una pequeña pero significativa proporción de glía. Las NSCs de la zona subgranular del giro dentado producen astrocitos. Aún así, se desconoce la función de las nuevas células gliales (Bond et al., 2015).

Trabajos recientes demostraron que unas 1300 neuronas sufren muerte celular por apoptosis diariamente y son reemplazadas por nuevas neuronas en el giro dentado del ratón adulto. Comparablemente, en los humanos, unas 700 neuronas nuevas que corresponderían a un 0,004 % de las neuronas del giro dentado son agregadas en el hipocampo por día. Esto significa que solo el 1,75% de neuronas pertenecientes a poblaciones que se renuevan, son agregadas anualmente en el cerebro adulto (Ryu et al., 2016).

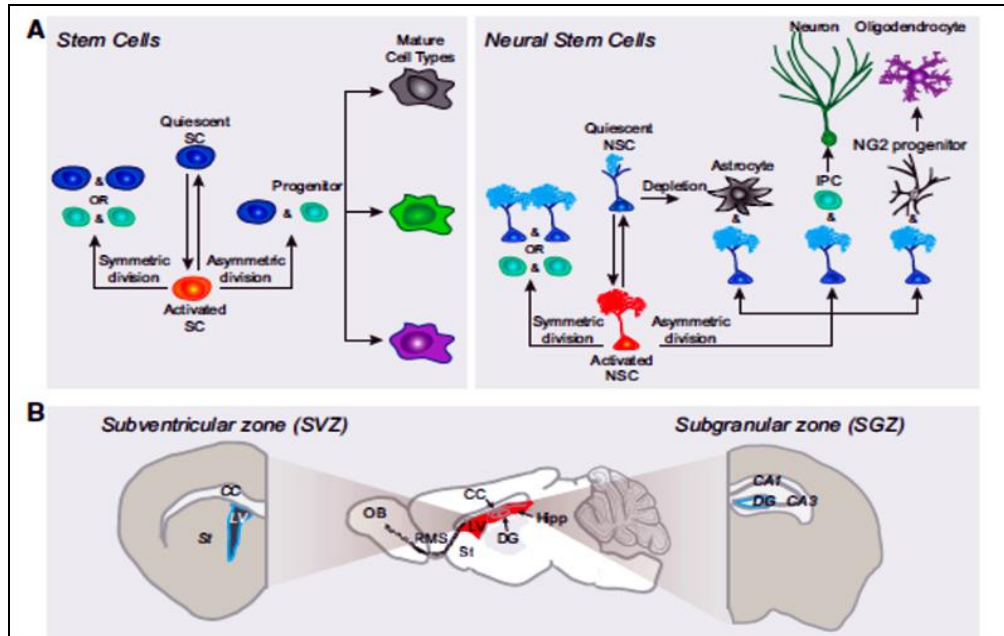


Figura 1. Comportamiento de Stem Cells neurales (NSCs) dentro de los nichos neurogénicos adultos. (A) Esquema ilustrando la conducta potencial de de una stem cell adulta y, más específicamente, de una stem cell neural adulta (NSC) a lo largo de su ciclo de vida. Este diagrama representa un amplio rango de actividades realizadas por las NSCs, así como poblaciones específicas que podrían exhibir una predisposición por ciertas actividades en relación con otras, por ejemplo la división asimétrica o la quiescencia. Las NSCs adultas pueden presentar transiciones entre estados de quiescencia y de actividad, entrando y saliendo del ciclo celular. Una vez que están activados, las NSCs eligen entre distintos modos de división celular: 1) la división asimétrica que genera una autorenovación produciendo un NSC y una célula progenitora; 2) la división simétrica, en cambio, puede producir dos NSCs (autorenovación) o dos progenitores neurales que pueden diferenciarse en un tipo celular particular o bien ser multipotentes con la capacidad de elegir su destino antes de diferenciarse. También es posible que las NSCs puedan diferenciarse directamente en tipos celulares gliales maduros. (B) Vista sagital de un cerebro adulto de roedor mostrando los dos principales nichos neurogénicos donde residen las NSCs adultas: la zona subventricular localizada a lo largo del ventrículo lateral (SVZ) y la zona subgranular localizada en el giro dentado del hipocampo, a lo largo de la capa celular granular (SGZ). Símbolos: CC, corpus callosum; DG, dentate gyrus; Hipp, hipocampus; LV, lateral ventricle; NSC, neural stem cell; OB, olfactory bulb; RMS, rostral migratory stream; SC, stem cell; St, striatum. **Extraído de “Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later”, Bond et al., 2015.**

El proceso de la neurogénesis adulta consiste en las siguientes etapas: **(1)** proliferación de células progenitoras; **(2)** eliminación selectiva temprana por apoptosis; **(3)** decisión de destino y compromiso hacia un fenotipo neuronal; **(4)** maduración morfológica y funcional

con el desarrollo de características propias de una neurona y segunda selección por integración sináptica en circuitos hipocampales preexistentes (Schouten et al., 2012). Las nuevas neuronas producidas en la SVZ migrarán a través del sistema migratorio rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio para convertirse en interneuronas, mientras que las neuronas generadas en la SGZ hipocampal se integrarán a circuitos sinápticos del giro dentado. La zona subgranular (SGZ) está localizada en la interfase entre la capa de células granulares y el hilus del giro dentado. Los precursores primarios de tipo radial y no-radial darán lugar a progenitores intermedios que, a su vez, generarán neuroblastos. Las neuronas inmaduras migrarán hacia el interior de la capa granular y se diferenciarán en neuronas excitatorias de la capa granular del giro dentado. En unos días, las nuevas neuronas comienzan a extender sus dendritas hacia la capa molecular y proyectarán sus axones a través del hilus, al área 3 del *cornu ammonis* (CA3) estableciendo sinapsis funcionales con neuronas piramidales. Este proceso dura unas 4-5 semanas (**Figura 2**).

Existen factores intrínsecos regulatorios que incluyen la presencia de células endoteliales, astrocitos y microglía local y los inputs de neurotransmisores GABA, Glutamato y Dopamina. También, existen factores extrínsecos fisiológicos, patológicos, y estímulos farmacológicos que intervienen en esta regulación dinámica. No se sabe hasta el momento cómo estos neurotransmisores modulan o regulan vía feedback la autorenovación y la especificación de destino de las stem cells neurales.

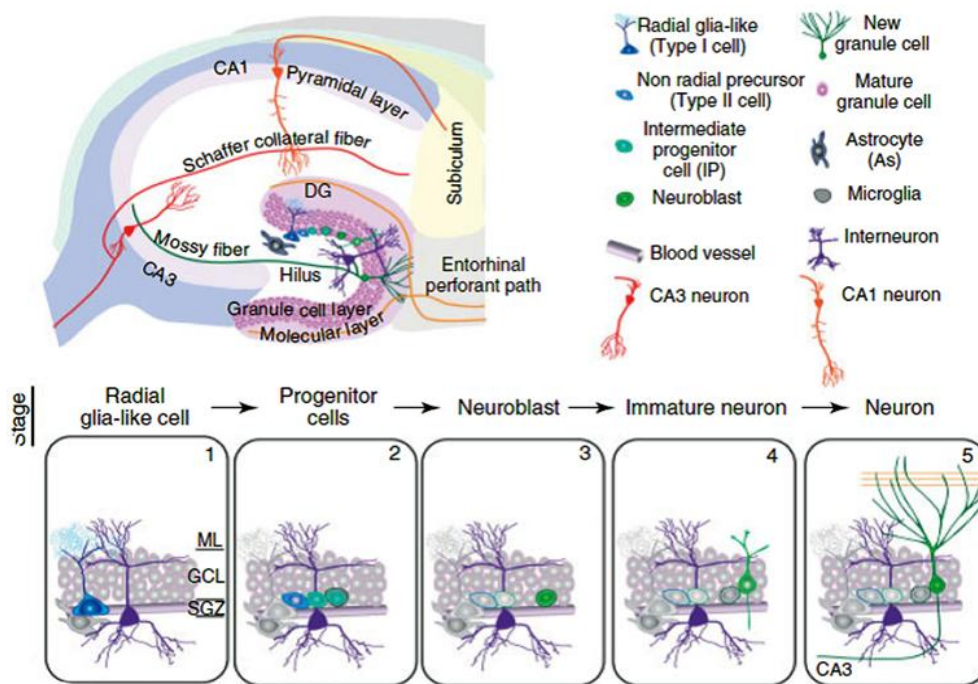


Figura 2. Neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo: NSCs y etapas. Un resumen de los cinco estados de desarrollo de la neurogénesis, desde los precursores neurales hasta las neuronas maduras adultas: (1) activación de las células tipo glía radial en estado de quiescencia, en la zona subgranular (SGZ); (2) proliferación de precursores no-radiales y de progenitores intermedios; (3) generación de neuroblastos; (4) integración de neuronas inmaduras; (5) maduración de células granulares nacidas en el giro dentado. Símbolos: ML, capa molecular; GCL, capa de células granulares; CA1, área 1 del cornu ammonis; CA3, área 3 del cornu ammonis. **Adaptado de Bonaguidi et al. (2013). Stem Cells in the Adult Brain: Neurogenesis.**

Actualmente los avances técnicos han permitido estudiar el proceso de la neurogénesis a través de distintos abordajes. Si bien, lo ideal sería una combinación de distintos métodos para tener una visión más comprensiva de este fenómeno, uno de ellos es un procedimiento no invasivo que consiste en el seguimiento de marcadores celulares específicos de estado: proteína ácida fibrilar glial (**GFAP**); región determinante del sexo Y-box 2, SRY-box (**Sox2**); **Nestina**; Doblecortina (**DCX**); antígeno nuclear (**NeuN**) y **Calbindina** que permiten estudiar la población total (o subpoblaciones) de nuevas neuronas (Ryu et al., 2016), (**Figura 3**).

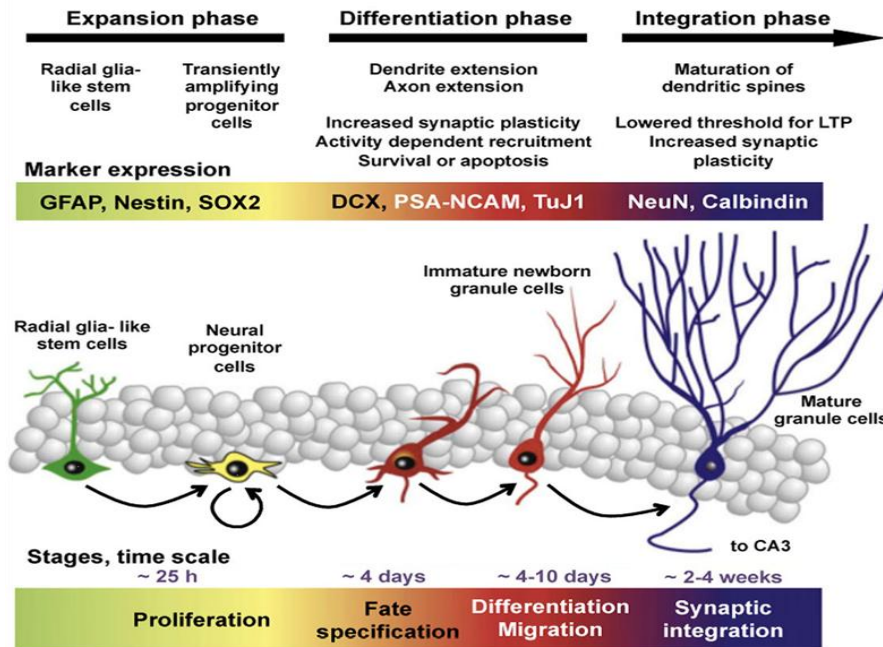


Figura 3. Neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo: marcadores específicos de estado y escala de tiempo. Esquema mostrando la correspondencia de los estados de la neurogénesis en el giro dentado con la expresión de marcadores celulares de las subpoblaciones neuronales y la duración de las etapas desde la proliferación hasta la integración sináptica. Símbolos: CA3, área 3 del cornu ammonis. **Adaptado de Schouten et al. (2012). New neurons in aging brains: molecular control by small non-coding RNAs.**

Durante la maduración de nuevas neuronas, su refinamiento dendrítico y formación de sinapsis intervienen, como ya comentamos en párrafos anteriores, distintos mecanismos y factores. Por ejemplo, el envejecimiento, la actividad eléctrica neuronal, los ambientes enriquecidos y el ejercicio físico regulan la proliferación de NSCs y la supervivencia y diferenciación de las nuevas neuronas producidas en el hipocampo adulto (Ryu et al., 2016). La abundante investigación en la última década ha mostrado que el ejercicio es uno de los promotores más potentes de la neurogénesis adulta, que, a su vez, podría contribuir con la amplificación de la función cognitiva observada en modelos animales sometidos a actividad física (Gomez-Pinilla et al., 2013; Van Praag et al., 2005). A partir de este notable hallazgo, se sucedieron numerosos trabajos referidos al impacto del ejercicio en la función cognitiva de sujetos físicamente activos (Berchtold et al., 2010; Kaliman et al., 2011; Kramer et al., 2006; Morgan et al., 2015; Sarauli et al., 2016). Actualmente, las evidencias aportadas por numerosos ensayos clínicos y modelos experimentales con animales muestran que el ejercicio tiene un efecto significativo sobre el aprendizaje y la memoria y puede reducir el riesgo de enfermedades neurodegenerativas, así como retrasar la declinación cognitiva dependiente de la edad. Notablemente, estos efectos correlacionan positivamente con la neurogénesis adulta en el hipocampo y con el aumento de la plasticidad sináptica dependiente de la actividad (Sarauli et al., 2016; Van Praag, 2009; Vivar et al., 2013).

La creciente evidencia sugiere que las nuevas neuronas contribuyen significativamente a un comportamiento adaptativo especializado a través de un refinamiento de circuitos neuronales preexistentes (Bonaguidi et al., 2013). Ésto se pone de manifiesto en la capacidad de separación de patrones, un mecanismo de la memoria que permite una representación diferencial de estímulos similares codificados por circuitos hipocampales (Schouten et al., 2012). Existen otras hipótesis como la teoría de la “reserva cognitiva” (Dik et al., 2003) que sostiene que la neurogénesis estaría dirigida a compensar la declinación funcional y/o patológica de la cognición, utilizando procesos cognitivos pre-existentes. Estudios epidemiológicos parecen apoyar esta visión y sugieren que la promoción de esta reserva a través de, por ejemplo, la práctica de ejercicio regular, puede redundar en una mejor salud cerebral en el largo plazo (Sarauli et al., 2016).

Estudios en roedores y monos han mostrado que existen diferencias regionales selectivas en la sensibilidad del hipocampo al deterioro dependiente de la edad. In conclusion, la proliferación, diferenciación, supervivencia y sinaptogénesis parecen ser diferencialmente afectadas por el envejecimiento durante la compleja maduración y proceso de selección a través del cual nuevas neuronas establecen su conectividad final funcional en el giro dentado. El giro dentado es particularmente afectado por el envejecimiento (Schouten et al., 2012). La buena noticia es que el efecto robusto del ejercicio sobre la neurogénesis, se mantiene a través de la vida en roedores, aunque no se sabe aún cómo opera en animales jóvenes y viejos o si los mecanismos que median estos efectos son los mismos (Pietrelli et al., 2011 and 2012). Más aún: ratones que comenzaron el ejercicio en el Wheel-running en la mediana edad o en la vejez mostraron una elevación en el número de neuronas hipocampales (Vivar et al., 2013). En el mismo sentido, estudios en humanos saludables de edad avanzada mostraron una correlación directa entre niveles

incrementados de actividad física y una mejoría en la respuesta cognitiva con incrementos paralelos en el volumen hipocampal, flujo cerebral, memoria y menor pérdida de tejido cerebral (Phillips et al., 2014).

Las hipótesis más extendidas y consensuadas en el campo de la Neurobiología del Ejercicio, que intentan modelar y explicar estos fenómenos se focalizan en el rol de las neurotrofinas (Bimonte-Nelson et al., 2008; Vilar et al., 2016) y de sus vías de señalización (Phillips et al., 2014). El mediador y facilitador principal del efecto pro-neurogénico del ejercicio, parece ser el Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Gomez-Pinilla and Hillman, 2013).

El ejercicio representa un estresor físico que desafía la homeostasis porque muestra un comportamiento bifásico (“hormético”): a muy bajas dosis, la respuesta es mínima; a dosis medias, produce efectos muy significativos y a dosis altas, genera los efectos opuestos (Gradari et al., 2016; Heijnen et al., 2016). En años recientes se puso el foco en una modalidad particular de ejercicio: el ejercicio moderado porque, al actuar dentro del rango hormético, es el que parece producir los efectos más saludables (Kim et al., 2003; Pietrelli et al., 2011). Sin embargo, la gran diversidad de protocolos de ejercicio que reporta la literatura científica, demuestra que las respuestas son muy heterogéneas, poco reproducibles y a veces, difíciles de interpretar. Es sabido que los efectos sobre el cerebro y la cognición del modelo de ejercicio voluntario en el Wheel-running no son similares a los efectos del ejercicio forzado en el treadmill-running (Bayod et al., 2011). Factores como la intensidad o duración del ejercicio también parecen afectar la proliferación celular en el hipocampo: roedores que fueron ejercitados durante 3 a 9 meses mostraron una reducción en el deterioro de la neurogénesis dependiente de la edad con aumentos concomitantes en el número de neuronas maduras (Soya et al., 2007; Vivar et al., 2013). Teniendo en cuenta que los estudios longitudinales son los que aportan mayor información sobre la evolución temporal de estos procesos, proponemos un estudio que abarque el ciclo vital del sujeto de experimentación y nos permita estudiar los posibles cambios cuali y cuantitativos de los estados iniciales, intermedios y finales de la neurogénesis, en el giro dentado. Además, evaluaremos el posible impacto de la edad de inicio del ejercicio y los efectos del detraining sobre los principales marcadores celulares de la neurogénesis, en la zona subgranular del hipocampo.

8.) Objetivos

8.1. Objetivos generales

Estudiar el efecto del ejercicio moderado y regular sobre la neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo y su posible relación con la edad de inicio de dicha práctica, utilizando la rata como modelo. También se estudiará si la respuesta adaptativa al ejercicio moderado crónico produce cambios reversibles o irreversibles en este proceso.

8.2.) Objetivos específicos: Las preguntas a responder serán las siguientes:

1. ¿El ejercicio moderado afecta la expresión de los principales marcadores de la neurogénesis adulta hipocampal?
2. Si existiera algún efecto del ejercicio moderado sobre la evolución temporal de la expresión de marcadores celulares, ¿qué etapa/marcadores se vería más afectada?
3. Si existieran cambios selectivos en algunos marcadores en relación con otros ¿habría alguna relación con la edad al inicio del entrenamiento físico? ¿Cómo evolucionaría esta respuesta en el corto, mediano y largo-plazo?
4. ¿Los posibles efectos del ejercicio moderado generan respuestas reversibles o irreversibles? ¿las respuestas dependen de la presencia del estímulo o perduran en el tiempo?

9.) Hipótesis

El ejercicio moderado produce efectos proliferativos y plásticos en el hipocampo que son dependientes de la edad de inicio del ejercicio y del tiempo de su aplicación e inducen respuestas celulares parcialmente reversibles.

10.) Metodología

10.1 Población de estudio y Diseño experimental: Una cohorte de N= 60 crías destetadas de rata macho de la cepa Wistar, será adquirida en el Bioterio Central de la Universidad de la Plata, y luego alojada en jaulas standard de laboratorio (2 crías por jaula) en el Bioterio de UCES. Los animales destetados de 21 días de edad tendrán un período de habituación de 15 días a la sala de alojamiento antes de su identificación y aleatorización a alguno de los 2 grupos: **Controles (C, n=30)** o **Ejercitados (E, n=30)**. Los animales estarán bajo un ciclo de luz:oscuridad de 12h reverso. 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. Para el diseño experimental, se tuvo en cuenta la escala de edad de esta cepa (promedio de vida aprox. entre 18-22 meses de edad). El estudio tiene un diseño longitudinal con tres puntos de corte (Experimento 1) que son suficientemente representativos del status fisiológico que corresponde al adulto joven (6 meses); a la rata de mediana edad (12 meses), y a la rata senescente (20 meses). Finalmente, se realizaran todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento, la incomodidad y el número de animales usados. Todos los procedimientos para el cuidado y el uso de animales de experimentación se someterán a la evaluación del Comité

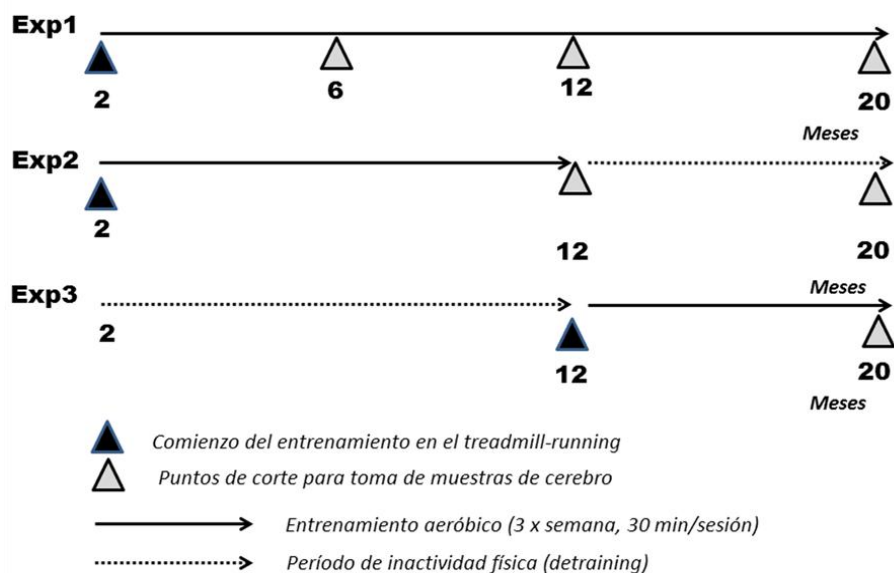
Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad Medicina de la UCES. Además, el diseño y los procedimientos propuestos se ajustan a las recomendaciones de las guías internacionales referidas a la especialidad:

- ✓ *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).*
- ✓ *Physical Activity Practice with Adults. American College of Sports Medicine and the American Heart Association Physical Activity and Public Health (Haskell et al., 2007).*
- ✓ *Physical Activity Practice with Older Adults. American College of Sports Medicine and the American Heart Association (Nelson et al., 2007).*

Luego de la aleatorización, todos los animales, controles y ejercitados, cumplirán el proceso de habituación a la cinta motorizada (treadmill-running) durante 1 semana. Según a qué experimento serán asignadas las ratas, algunas comenzarán el entrenamiento a los 2 meses de edad y otras, nó: en los **experimentos 1 y 2**, el entrenamiento físico se iniciará a los 2 meses de edad. En el **experimento 3**, el entrenamiento empezará más tarde, en la mediana edad (12 meses). Ver esquema general (**Figura 4**).

- ✓ **Experimento 1 (N=36):** Los animales (E, n=18) iniciarán el entrenamiento físico a los dos meses de edad hasta los 20 meses de edad cumpliendo un total de **72 semanas** de ejercicio crónico. Los controles (C, n=18) recibirán la misma manipulación y exposición al treadmill **SIN MOVIMIENTO**. Los puntos de corte establecerán el orden de los sacrificios programados para la obtención de cerebros por fijación.
- ✓ **Experimento 2 (N=12):** Los animales (E, n=6) iniciarán el entrenamiento físico a los dos meses de edad hasta los 12 meses de edad cumpliendo un total de **40 semanas** de ejercicio crónico. Los controles (C, n=6) recibirán la misma manipulación y exposición al treadmill **SIN MOVIMIENTO**. El punto final se establecerá a los 20 meses de edad para la obtención de cerebros por fijación.
- ✓ **Experimento 3 (N=12):** Los animales (E, n=6) iniciarán el entrenamiento físico a los 12 meses hasta los 20 meses de edad cumpliendo un total de **32 semanas** de ejercicio crónico. Los controles (C, n=6) recibirán la misma manipulación y exposición al treadmill **SIN MOVIMIENTO**. El punto final se establecerá a los 20 meses de edad para la obtención de cerebros por fijación.

Figura 4. Esquema general del trabajo: Líneas de tiempo de los tres experimentos.



Una vez completado el cronograma de entrenamiento, se procederá a realizar los respectivos sacrificios (ver puntos de corte en el esquema) para obtener muestras fijadas de cerebro por la técnica de perfusión *in vivo*, luego serán procesadas y criopreservadas a -20°C en el IBCN hasta la inmunodetección de marcadores de interés.

10.2 Materiales y Métodos:

10.2.1 Protocolo de Entrenamiento: Equipo: Las ratas serán entrenadas desde los 2 hasta los 20 meses de edad (según el experimento) en una cinta de correr motorizada o "treadmill-running" (Figura 5) que fue especialmente diseñada para trabajar con ratas de gran tamaño y peso. El equipo consiste en una caja estanca de acrílico transparente (60 cm ancho x 12 cm alto x 70 cm largo) dividida interiormente en seis carriles de 10 cm ancho, también transparentes. El funcionamiento mecánico de la cinta de correr está acoplado a un software que registra parámetros del interior de la caja en tiempo real: 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). Procedimiento: para la elección de la periodización del entrenamiento, se seguirán las recomendaciones de Bompa and Haff (2009) y de Wilmore and Costill (2007). 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 serán entrenadas regularmente 3 veces por semana durante 30 minutos (duración fija a lo largo de los experimentos) con una rutina de características aeróbicas de moderada-baja intensidad (aprox. el 60 % del max VO₂). Los controles serán manipulados y colocados en

la cinta inmóvil manteniendo condiciones similares a los ejercitados. Todos 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.



Figura 5. 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.

10.2.2 Técnica de Perfusión *in vivo*.

Las muestras de cerebro serán obtenidas por esta técnica. Los animales (**C**, n=6; **E**, n=6) son anestesiados (IP) con Pentobarbital sódico (50 mg/kg) y sometidos a perfusión transcardíaca 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 realiza el primer lavado con una solución conteniendo 5% de sacarosa en buffer fosfato 0.1 M. Las muestras son cortadas con un vibrátomo (Leyca 400) en secciones coronales de 40 μ m conteniendo el área CA1 del giro dentado del hipocampo según indica la figura del Atlas de Franklin and Paxinos (2007), (**Figura 6**).

Las secciones que no se utilizarán inmediatamente se congelarán a -20°C con una solución crioprotectora de glicerol 50% en PBS con 1% azida sódica. Todos los reactivos fueron de Sigma Chemical Co., USA.

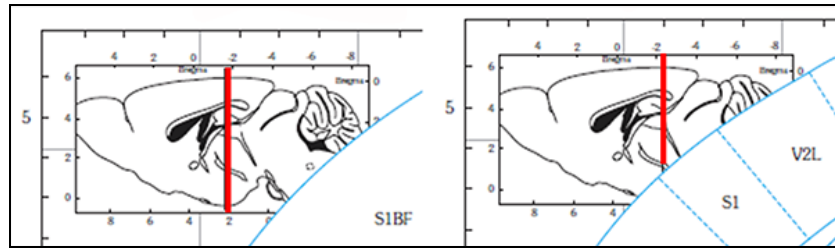


Figura 6. Mapas estereotáxicos. Coordenadas del Hipocampo: desde Bregma -1.58 mm (Placa 44) hasta -2.30 mm (Placa 50). **Extraído del Atlas de Paxinos y Watson (2007).**

10.2.3 Técnica de Inmunoperoxidasa (IHQ) y de 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 de estado:

Anticuerpos primarios (marcadores celulares de estado)
1. Rabbit polyclonal to GFAP (ab48050)
2. Rabbit polyclonal to Sox2 (ab97959)
3. Mouse monoclonal to Nestin (ab11306)
4. Rabbit polyclonal to Doublecortin (ab18723)
5. Rabbit polyclonal to Calbindin (ab49899)
6. Rabbit polyclonal to Neu-N (ab177487)
Anticuerpos secundarios conjugados para IF:
1. Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (ab150160) rojo
2. Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150157) verde

10.4 Análisis estadístico:

El análisis estadístico quedará a cargo del primer autor de este trabajo, la Dra. A. Pietrelli. Se comenzará con un análisis exploratorio de datos, y luego, si las distribuciones son normales, se aplicarán ANOVAS de dos factores (ejercicio x edad). El factor ejercicio tiene dos niveles: control y ejercicio; el factor edad tiene 3 niveles: 6, 12 y 20 meses. Si fuera necesario, se realizarán pruebas no-paramétricas. También se realizarán ANOVAS de uno y/o dos factores para comparar las medias entre experimentos para las mismas edades. El criterio para establecer diferencias significativas será $p < 0,05$ y muy significativas $p < 0,0001$. En todos los casos, las diferencias significativas entre tratamientos serán analizadas con contrastes múltiples de Tukey o Bonferroni. Se utilizará el software SPSS v.23 de IBM y los gráficos se editarán con el software Graphpad Prism v.17.

11.) Cronograma: Ver línea de tiempo para los experimentos 1, 2 y 3 en la sección Metodología. La duración del proyecto es de **2 años**.

Actividades	Año 1 (MESES)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Exp. 1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Exp. 2		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Exp. 3												X

Actividades	Año 2 (MESES)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Exp. 1	X	X	X	X	X	X	X	X				
Exp. 2												
Exp. 3	X	X	X	X	X	X	X	X				

12.) Resultados Esperados

Esperaríamos encontrar alteraciones selectivas de estado en función de la edad de inicio de la práctica de ejercicio moderado, y modificaciones morfológicas y cuantitativas en las neuronas maduras del giro dentado para dar soporte celular a la función sináptica, y a través de ésta, a la función cognitiva. Además, hipotetizamos que una estimulación temprana del sistema energético cerebral podría actuar como “primer” o impronta sobre el desarrollo posterior de la neurogénesis y tener un alcance parcialmente reversible en el largo plazo.

12.1.) Aportes científicos

Documentos de trabajo: publicación de artículo científico.

Artículos con referato. Publicación en revistas internacionales con referato.

Capítulos de Libros:

Libros:

Traducciones:

Conferencias Científicas: Presentación a Congresos de la especialidad. Exposición en la UCES o en otras Instituciones.

12.2.) Vinculación y Transferencia¹¹

Vinculación con el sector productivo:

Vinculación con la sociedad civil:

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

Otros tipos de vinculaciones:

12.3.) Mediación del conocimiento

Cursos de Capacitación: En todos los casos que aquí se plantean dependerá de las autoridades de UCES.

Conferencias:

Trabajo de consultoría:

Asesoramiento especializado:

12.4.) Otros.

¹¹ Indicar el nombre de la entidad destinataria de la transferencia y el tipo de relación formal que habría que tramitar para concretar el vínculo

Colaboración *ad honorem* de becarios, técnicos y/o investigadores del laboratorio de neuroprotección.

13.) Investigadores¹²:

13.1.) Seniors

Apellido y Nombre: PIETRELLI, Adriana
Grado Académico: Doctora y Profesora
Principal actividad laboral: Investigación y Docencia. Responsable técnico y gestión del Bioterio de UCES.
Dedicación al proyecto. 25 horas/semanales

Asistentes Seniors

Apellido y Nombre: PAGLIA, Nora Patricia
Grado Académico: Médica Veterinaria
Principal actividad laboral: Clínica de pequeños animales, Gestión del Bioterio Central del Instituto Nacional de Investigación Cardiovascular Dr. A. Taquini (ININCA, UBA-CONICET). Clínica de animales de laboratorio en el Bioterio UCES.
Dedicación al proyecto. 6 horas/semanales

Apellido y Nombre: ORZUZA, Ricardo
Grado Académico: Técnico Bioterista (FCV, UBA). Auxiliar de investigación y Técnico extraccionista (UBA).
Principal actividad laboral: Gestión del Bioterio de la Facultad de Odontología (UBA). Bioterista del Bioterio de UCES.
Dedicación al proyecto. 15 horas/semanales

13.2.) Juniors

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

¹² Anexar CV (máximo cuatro folios) para cada uno de ellos.

13.3.) Alumnos asistentes de Investigación.

Apellido y Nombre: (A completar oportunamente)
Breve descripción de las tareas que se asignarán:

Apellido y Nombre:
Breve descripción de las tareas que se asignarán:

Apellido y Nombre:
Breve descripción de las tareas que se asignarán:

14.) Presupuesto

Gastos	Pesos
Animales:	
70 crías Wistar destetadas (21 días)	20000 \$
7 cajas de traslado	1600 \$
2 remises de traslado (se elimina si va la camioneta de UCES)	2000 \$
	23.600 \$ arg.
Anticuerpos primarios (ABCAM): Proveedor TecnoLab SRL	
1. Rabbit polyclonal to GFAP (ab48050)	953,05 U\$S
2. Mouse monoclonal to Nestin (ab11306)	944,16 U\$S
3. Rabbit polyclonal to Sox2 (ab97959)	944,16 U\$S
4. Rabbit polyclonal to Doublecortin (ab18723)	953,05 U\$S
5. Rabbit polyclonal to Neu-N (ab177487)	953,05 U\$S
6. Rabbit polyclonal to Calbindin (ab49899)	930,83 U\$S
Anticuerpos secundarios (ABCAM): Proveedor TecnoLab SRL	
Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (ab150160) rojo	930,83 U\$S
Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150157) verde	930,83 U\$S
Fijador y montaje (SIGMA-MERCK) Proveedor Research AG.	
Paraformaldehído x 2 kg	1594,36 U\$S
Fluorsave	254,95 U\$S
TOTAL:	9389,27 U\$S
Aprox. 180.000 \$ (dólar a 16,60 \$)	

15.) Bibliografía

1. Bayod, S., Del Valle, J., Canudas, A.M., Lanza, J.F., Sanchez-Roigé, S., Camins, A., Escorihuela, R.M., Pallas, M., 2011. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J. Appl. Physiol.* 111, 1380–1390.
2. Berchtold, N.C., Castello, N., Cotman, C.W., 2010. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience* 19, 588-597.
3. Bimonte-Nelson, H.A., Granholm, A.C., Nelson, M.E., Moore, A.B., 2008. Patterns of neurotrophin protein levels in male and female Fischer 344 rats from adulthood to senescence: how young is “young” and how old is “old?” *Exp. Aging Res.* 34, 13–26.
4. Bompa, T.O., Haff, G., 2009. *Periodization: theory and methodology of training*, 5th ed. Ed. Human Kinetics, Champaign, IL, USA.
5. Bonaguidi, M.A.; Ming, G.; Song, H., 2013. Stem Cells in the Adult Brain: Neurogenesis. *Meyers: Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Stem Cells*, Second Ed. Edited by Robert A. Meyers. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
6. Bond, A. M.; Guo-li Ming, Song, H., 2015. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell* 17: 385-395.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.003>
7. Cotman, C.W., Engesser-Cesar C., 2002. Exercise enhances and protects brain function. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 30, 75–79.
8. Dik, M., Deeg, D.J., Visser, M., Jonker, C., 2003. Early life physical activity and cognition at old age. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 25, 643–653.
9. Dishman, R.K., Berthoud, H.R., Booth, F.W., Cotman, C.W., Edgerton, V.R., Fleshner, M.R., Gandeia, S.C., Gomez-Pinilla, F., Greenwood, B.N., Hillman, C.H., Kramer, A.F., Levin, B.E., Moran, T.H., Russo-Neustadt, A.A., Salamone, J.D., Van Hoomissen, J.D., Wade, C.E., York, D.A., Zigmond, M.J., 2006. Neurobiology of exercise. *Obesity* 14, 345–356.
10. Erickson, K.I., Kramer, A.F., 2009. Aerobic exercise effects on cognitive and neural plasticity in older adults. *Br. J. Sports Med.* 43, 22–24.

11. Foster, P.P., 2015. Rol of physical and mental training in brain network configuration. *Front. Aging Neurosci.* 7:117. DOI:10.3389/fnagi.2015.00117.
12. Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, third Edition. Academic Press, Ed. Elsevier. New York, NY 10010-1710, USA.
13. Gomez-Pinilla, F., Hillman, Ch., 2013. The Influence of Exercise on Cognitive Abilities. *Compr. Physiol.* 1, 403–428.
14. Gradari, S., Pallé, A., McGreevy, K.R., Fontán-Lozano, A., Trejo, J.L., 2016. Can exercise make you smarter, happier, and have more neurons? A Hormetic Perspective. *Front. Neurosci.* <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2016.00093>.
15. Heijnen, S., Hommel, B., Kibele, A., Colzato, L.S., 2016. Neuromodulation of aerobic exercise. A review. *Front. Psychol.* 6:1890. DOI: 10.3389/fpsyg.2015.01890.
16. Kaliman, P., Párrizas, M., Lalanza, J.F., Camins, A., Escorihuela, R.M., Pallàs, M., 2011. Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process. *Ageing Res. Rev.* 4, 475-486.
17. Kamijo, K., Hayash, Y., Sakai, T., Yahiro, T., Tanaka, K., Nishihira, Y., 2009. Acute effects of aerobic exercise on cognitive function in older adults. *J. Gerontol. B. Psychol. Sci. Soc. Sci.* 64B, 356–363.
18. Kim, Y.P., Kim, H.B., Jang, M.H., Lim, B.V., Kim, Y.J., Kim, H., Kim, S.S., Kim, E.H., Kim, C.J., 2003. Magnitude- and time-dependence of the effect of the treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Int. J. Sports Med.* 24, 114–117.
19. Kramer, A.F., Erickson, K.I., Colcombe, S.J., 2006. Exercise, cognition, and the aging brain. *J. Appl. Physiol.* 101, 1237–1242.
20. Kregel, K., Allen, D., Booth, F., Fleshner, M., Henriksen, E., Musch, T., Leary, D., Parks, C., Poole, D., Ra'anan, A., Sheriff, D., Sturek, M., Toth, L., 2006. *Resource Book for the design of animal exercise protocols* 1st. ed. American Physiol. Society, USA.
21. Markham, J., Greenough, W., 2004. Experience-driven brain plasticity: beyond the sinapse. *Neuron Glia Biol.* 1, 351–363.

22. Morgan, J.A., Corrigan, F., Baune, B.T., 2015. Effects of physical exercise on central nervous system functions: a review of brain region specific adaptations. *J. Mol. Psychiatry* 3. DOI: 10.1186/s40303-015-0010-8.
23. Nelson, M., Rejeski, J., Blair, S., Duncan, P., Judge, J., King, A., Macera, C., Castaneda-Sceppa, C., 2007. Physical activity and public health in older adults recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39, 1435–1445.
24. NIH, 2011. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. Washington, DC: The National Academies Press.
25. Phillips, C., Baktir, M.A., Srivatsan, M., Salehi, A., 2014. Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling. *Front. Cell. Neurosci.* 8:170. DOI: 10.3389/fncel.2014.00170.
26. Pietrelli, A., López-Costa, J.J., Goñi, R., López, E.M., 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.
27. Pietrelli, A., López-Costa, J.J., 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.
28. Ryu, R.J.; Hong, C.J.; Kim, J.Y.; Kim, E.K.; Sun, W.; Yu, S.W., 2016. Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Molecular Brain* 9: 43. DOI 10.1186/s13041-016-0224-4.
29. Saraulli, D., Constanzi, M., Mastorilli, V., Farioli-Vecchioli, S., 2016. The long run: neuroprotective effects of physical exercise on adult neurogenesis from youth to old age. *Curr. Neuropharmacol.* 5, 504-513.
30. Schouten, M.; Renate Buijink, M.; Lucassen, P.J.; Fitzsimons, C., 2012. New neurons in aging brains: molecular control by small non-coding RNAs. *Frontiers in Neuroscience.* doi: 10.3389/fnins.2012.00025.
31. Soya, H., Nakamura, T., Deocaris, C.C., Kimpara, A., Limura, M., Fujikawa, T., Chang, H., McEwen, B., Nishijima, T., 2007. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 358, 961–967.

32. Stranahan, A., Khalil, D.; Gould, E., 2007. Running Induces Widespread Structural Alterations in the Hippocampus and Entorhinal Cortex Hippocampus 17: 1017–1022. doi:10.1002/hipo.20348.
33. Studeski, S., Carlson, M.C., Fillit, H., Greenough, W.T., Kramer, A., Rebok, G.W., 2006. From bedside to bench: can mental and physical activity promote cognitive vitality in late life? Sci. Aging Knowledge Environ. 2006(10):pe21.
34. Van Praag H., 2009. Exercise and the brain: something to chew on. Trends Neurosci. 32, 283–290.
35. Van Praag, H., Schubert, T., Zhao, Ch., Gage, F.H., 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. J. Neurosci. 25, 8680–8685.
36. Vilar, M., Mira, H., 2016. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles. Front. Neurosci. 10:26. DOI: 10.3389/fnins.2016.00026.
37. Vivar, C., Potter, M.C., Henriette van Praag, H., 2013. All About Running: Synaptic Plasticity, Growth Factors and Adult Hippocampal Neurogenesis. Curr. Top. Behav. Neurosci. 15, 189–210.
38. Wilmore, J.H., Costill, D.L., 2007. Fisiología del Esfuerzo y del Deporte, 6ta. ed, p 776. Ed. Paidotribo, Barcelona, España.