



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS EMPRESARIALES Y SOCIALES
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION

Proyecto de Investigación:

**CAMBIOS DE LA NOS/NADPH-d EN LA CORTEZA CEREBRAL Y CUERPO
ESTRIADO DE RATAS WISTAR SOMETIDAS A ENTRENAMIENTO
AERÓBICO CRÓNICO.**

Pietrelli A.^a, Basso N.^b, Goñi R.^c, Brusco A.^d, Lopez-Costa JJ.^d.

^a Fac. Medicina, UCES; ^b IFCV, Fac. Medicina, UBA-CONICET; ^c Fac. Psicología, UBA; ^d
IBCN Prof. De Robertis, Fac. Medicina, UBA-CONICET.

★ Correspondencia a:
api_0@yahoo.com.ar

nidiabasso@yahoo.com.

Informe de avance

Abril de 2009

Palabras clave: *NADPH-d ; treadmill – running; cognition; learning; memory; exercise; aging.*

RESUMEN: Se estudiaron los efectos en el largo plazo del ejercicio moderado sobre el sistema nitrérgico en corteza y cuerpo estriado y su posible relación con el desempeño cognitivo-conductual de ratas Wistar de 18 meses entrenadas aeróbicamente (EA) durante toda su vida vs. controles sedentarios (CS). Luego de la anestesia con Pentobarbital sódico (50 mg/kg), los cerebros fueron fijados por perfusión con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1M, post-fijados y cortados con vibrátomo. Las secciones fueron teñidas con la técnica de la NADPH-diaforasa (NADPH-d). Se cuantificó por densitometría y se estudiaron parámetros morfométricos por análisis de imágenes: área somática (AS) (μm^2); diámetro somático máximo (DSM) (μm); densidad óptica (OD). Las neuronas corticales NADPH-d positivas de EA presentaron mayor tamaño y dendritas más largas y ramificadas. Resultados: **AS** (μm^2) CS: 82 ± 4.1 ; EA: 157 ± 5.9 ($p < 0.01$); **DSM** (μm) 13 ± 0.4 CS y 24 ± 0.9 EA ($p < 0.01$); **OD** 0.65 ± 0.01 CS y 0.86 ± 0.03 EA ($p < 0.01$). Las neuronas estriales : **OD** 0.72 ± 0.028 y 0.88 ± 0.0246 ($p < 0.01$) de CS vs. EA, pero no hubo diferencias significativas en **AS** ni **DSM**.

Se detectó un menor **número de errores** en la memoria espacial (7 ± 0.25 vs 5 ± 0.17 , $p < 0.01$), un mayor **número de éxitos** (35 ± 1.6 vs 26 ± 1.4 , $p < 0.01$) y menor **tiempo total** (233 ± 4.5 vs 324 ± 7 , $p < 0.01$) en EA vs CS.

Postulamos que el ejercicio moderado tendría un efecto neuroprotector en el largo plazo que podría estar mediado parcialmente por el sistema nitrérgico.

1. INTRODUCCIÓN: El ejercicio moderado y regular parece promover los efectos más saludables en humanos y animales (17, 20, 38, 39), por lo que constituye una intervención no-farmacológica altamente recomendable para prevenir y/o atenuar los efectos secundarios al envejecimiento particularmente a nivel del SNC y la función cognitiva (22).

Los efectos del ejercicio son dosis y tiempo-dependientes (10, 20), por consiguiente, la magnitud de la respuesta será función de estas variables y generará resultados diferentes dependiendo del tipo de protocolo de entrenamiento (22). En este estudio presentamos un modelo de ejercicio regular, crónico de baja a moderada intensidad, con manipulación periódica de la carga para mantener la intensidad aproximadamente en un 60% del VO_2 máximo, que es la mejor medición de la capacidad aeróbica (49), y acorde a la edad y nivel de rendimiento. El ejercicio regular en humanos ha demostrado tener un efecto positivo sobre la depresión, trastornos de la ansiedad, calidad de sueño y performance cognitiva en ancianos (10). También en roedores la actividad física crónica ha demostrado incrementar la expresión génica de factores neurotróficos que tienen incidencia en el crecimiento, desarrollo y supervivencia de ciertos tipos neuronales (10,14, 27, 35, 48).

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa generada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del sustrato L-arginina. Tiene acción

parácrina y es producido por células endoteliales, macrófagos y neuronas (1, 26). Se ha postulado que esta molécula tiene un rol destacado en los procesos de envejecimiento, particularmente a nivel cerebral (17, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 34). Se conoce la asociación positiva que muestra el NO con los procesos de aprendizaje y memoria (26, 28, 40, 41).

Trabajos recientes realizados en roedores han reportado cambios dependientes de la edad en la NOS de la corteza prefrontal, de la región parahipocampal e hipocampal que correlacionan significativamente con el desempeño en distintas pruebas de comportamiento: laberinto radial, laberinto de agua, laberinto elevado en cruz -T y open field, entre otros (26, 28, 29, 30, 31, 32, 40, 41, 45). Estudios anteriores han descrito una asociación positiva entre la habilidad motora, la NOS, la arginasa y la función hipocampal (28, 29, 30, 32). Distintos trabajos realizados en modelos animales han demostrado que el ejercicio causa cambios en la producción de NO así como en el nivel de la relación nitritos/nitratos (NOx, productos finales y estables del NO) que son específicos de cada tejido (17, 34, 42, 45). En humanos, se ha informado que las concentraciones plasmáticas de NOx y la biodisponibilidad del NO disminuyen con la edad, y están significativamente incrementadas por el entrenamiento aeróbico de alta intensidad en jóvenes y en atletas ancianos, sin embargo, no se ha estudiado si un entrenamiento suave o moderado podría tener el mismo efecto en adultos mayores (34, 42) .

Basado en la información precedente, el presente trabajo se ha propuesto los siguientes objetivos en un modelo de ejercicio moderado regular y de largo plazo:

1. Analizar si tiene algún efecto sobre el sistema nitrérgico (actividad y morfología de neuronas que expresan NOS) en regiones cerebrales relacionadas con la memoria, aprendizaje y control motor.
2. Determinar si es capaz de mediar algún efecto neuroprotector y/o neuroadaptativo sobre la declinación en variables cognitivo-conductuales presentes en sujetos adultos mayores.
3. Estudiar si el sistema nitrérgico está involucrado en estos posibles efectos neuroprotectores y neuroadaptativos.

2. MATERIALES Y METODOS:

2.1 Población en estudio y diseño experimental.

La población en estudio fueron 24 ratas Wistar machos recién destetadas obtenidos del Bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) que se alojaron en jaulas de 35 cm. de ancho x 45 cm. de largo x 25 cm. de alto, con 3 animales en cada una. Éstos fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los siguientes grupos: **EA (N= 12)** ó **A CS (N = 12)**. Previo al inicio del estudio se realizó un monitoreo microbiológico para evaluar el estado sanitario inicial. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con pellet para roedores y tuvieron acceso libre a la bebida. Todos fueron mantenidos bajo las mismas condiciones ambientales a lo largo de la experiencia: ciclo de 12h:12 h de luz y oscuridad (17:00 pm- 5:00 am oscuridad: 5:00 am – 17 pm luz) con una intensidad durante el período lumínico que no superaba los 700 luxes; temperatura de 20 ± 2 °C; humedad del 45-55% y con extracción y renovación de aire automatizada. Se realizaron registros semanales de

los pesos corporales así como de la cantidad de comida y bebida. La adaptación al nuevo ambiente de alojamiento fue de 15 días. El uso y cuidado de los animales así como el diseño del estudio, puesta a punto y realización de todos los procedimientos experimentales empleados siguieron las recomendaciones de:

- Guidelines for the care and use of mammals in Neuroscience and Behavioural Research. *The National Academic Press*.2003.
- American Physiological Society. Resource Book for the design of animal exercise protocols. *Feb., 2006*.
- Physical Activity and Public Health. Updated Recommendation for Adults. From the American College of Sports Medicine and the American Heart Association Physical Activity and Public Health. *Med Sci Sports Exerc. 2007. Aug; 39 (8): 1423-34*.
- 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. 2007. Aug; 39 (8): 1435-45*.

2.2 Descripción del Treadmill Running:

El aparato fue especialmente diseñado para este proyecto siguiendo algunas características del equipo desarrollado por Ulrico Wisloff y col. (50).

Consiste en una caja estanca de acrílico transparente de 60 cm. de ancho x 80 cm. de largo y 12 cm. de alto, dividida en 6 carriles para correr de 10 cm. de ancho y de 50 cm. de largo. El piso fue construido con goma antideslizante flotante sobre la base que permite el apoyo elástico al correr. El aire interno consumido es repuesto por un

caudalímetro a razón de 6 litros/minuto y renovado con un extractor. Los gases intercambiados son enviados a un sensor de dióxido de carbono para ser muestreados y analizados. Es accionado por un motor regulable. El software, también diseñado especialmente, permite recoger datos como: concentración de CO₂ (ppm), velocidad (m/min) , pendiente (grados) , tiempo de carrera (minutos), selección de carga (distintas rutinas), metros acumulados y posee un graficador de concentración en función del tiempo de carrera.

2.3 Protocolo de Entrenamiento

Las ratas fueron entrenadas en el treadmill descrito desde el período pre-puberal (2 meses) hasta los 18 meses de edad siguiendo una rutina de características aeróbicas : baja a moderada intensidad con una frecuencia de 3 veces/semana y, con un progresivo aumento de la carga (volumen x intensidad) en cuanto a : **1)** duración desde 5 a 60 minutos por sesión ; **2)** velocidad desde 4 m/min hasta 18 m/min y **3)** pendiente de la cinta desde 0° hasta 10°. En cada sesión eran elegidas 6 ratas (2 jaulas) al azar entre las corredoras para evitar sesgo. El protocolo fue diseñado siguiendo los principios básicos del entrenamiento en humanos: especificidad, sobrecarga progresiva, intensidad variable y periodicidad acompañando el nivel de entrenamiento y el proceso de envejecimiento del animal y teniendo en cuenta que la programación de un ejercicio debe permitir pasar el umbral mínimo de carga para producir una mejoría.

El entrenamiento se realizó 3 veces por semana, porque es la frecuencia recomendada como suficiente y necesaria para el desarrollo de resistencia aeróbica y permite la adecuada recuperación de las reservas

energéticas. Previamente se realizó la habituación al equipo y manipulación del operador durante 1 semana para corredores y controles, permitiendo el libre acceso y la actividad exploratoria. Todos los animales **EA** aprendieron la dirección de carrera. Ninguna rata fue excluida por negarse a correr ni debió ser retirada del estudio por presentar signos de stress agudo, enfermedades o lesiones ósteo-articulares. Los **CS** eran sometidos a las mismas condiciones experimentales pero con la cinta del treadmill detenida. El orden que se siguió en los ajustes semanales de la carga fue incrementar la duración, luego la velocidad y finalmente la pendiente. Cada sesión de entrenamiento se estructuró de la siguiente forma: 5 minutos de exploración y actividad motora libre para reducir la ansiedad del sujeto; 5 minutos de “entrada en calor “; trabajo central y 5 minutos de “enfriamiento”. La duración total de la sesión incluyó los 5 minutos iniciales y finales pero no los 5 minutos de actividad libre. La mayor carga se produjo entre los 6-8 meses de edad (16-24 semanas de entrenamiento) con una duración de 60 minutos, una velocidad máxima de 18 m/minuto y una pendiente de 10°, que trataría de evocar un programa regular aplicado a un sujeto adulto joven entre 20-30 años que se encuentra en el tope de su rendimiento físico. Se mantuvo entre 8 y 12 meses de edad con pequeñas variaciones y a partir de allí comenzó a reducirse hasta los 18 meses de edad (corresponde aproximadamente a un sujeto adulto mayor entre 60 y 70 años), siguiendo el orden inverso: descenso de la pendiente, luego de la velocidad y por último disminución de la duración hasta un mínimo necesario de 30 minutos, a pendiente 0° y una velocidad máxima de 8 m/minuto y habiendo cumplido un total de 64 semanas de ejercitación. No se utilizaron estímulos agresivos de ningún tipo para reforzar el aprendizaje durante el período de habituación

ni durante las sesiones para mantener al animal corriendo ni tampoco se dieron recompensas al final de la carrera. El equipo era desinfectado exhaustivamente entre sesiones.

2.4 Descripción del Laberinto Radial.

Consiste en un laberinto construido en acrílico transparente, con ocho brazos dispuestos en forma radial de 60 cm. de largo x 12 cm. de alto x 10 cm. de ancho que convergen en una plataforma central de 40 cm. de diámetro. La posición de las diferentes señales externas como mesa, silla, globos de distintos tamaños colgando del techo y autoadhesivos con dibujos en las paredes, inclusive la del operador, se mantuvo constante a lo largo del protocolo.

2.5 Protocolo para evaluar parámetros cognitivos-conductuales en el laberinto radial

Previo a la finalización del período de entrenamiento se estudió la capacidad cognitiva y conductual. Para evitar que el posible agotamiento físico de los animales interfiriera con el estudio, se comenzó con el laberinto seguido de un descanso de 1 hora y posteriormente el entrenamiento aeróbico suave. Los EA y CS iniciaron el test a los 16 meses y finalizaron a los 18 meses de edad. La sala experimental tenía las mismas condiciones estandarizadas que la de alojamiento y se trabajó en el período de luz (5:00 am-17:00 pm). El equipo era desinfectado exhaustivamente entre sesiones. El protocolo se desarrolló en 3 etapas:

- ***Handling*** (manipulación): se procedió a la manipulación durante 5 minutos por sujeto durante 5 días consecutivos.

▪ **Shaping** (moldeamiento): Se realizaron 7 días de moldeamiento conductual. El animal se introdujo en el laberinto y se colocaron porciones de zucarcitas (“frut-loops”) en los 4 corredores habilitados. El animal debe aprender que sólo hay comida en cuatro brazos de los ocho posibles y que esta disposición se mantiene hasta el final del protocolo con la misma secuencia espacial.

▪ **Período de evaluación:** Este período se extendió por 40 días consecutivos: el animal se colocó en la plataforma central del laberinto y debió realizar dos recorridos de no más de 5 minutos cada uno, con un intervalo de no más de 15 segundos para limpieza profunda de posibles señales olfatorias. En el primero o de “inspección” el animal sólo puede encontrar comida en dos brazos habilitados para ese fin, los otros dos, de los cuatro permitidos para comer, están cerrados por una puerta guillotina que impide el acceso y la visión del interior del corredor, en esta oportunidad, si el animal entra en otro brazo que nunca tuvo comida, se registra un error de memoria de referencia ya que no pudo recordar o evocar la información disponible del procedimiento adecuado en función de señales ambientales externas.

En el segundo o de “elección” se lo colocó nuevamente y se habilitaron los dos corredores restantes, si entró en un corredor en el cual ya había comido, se cuenta un error de memoria de trabajo ya que no pudo registrar en el corto plazo esa secuencia anterior de la búsqueda, en este caso el ingreso a los corredores que nunca tuvieron comida se consideran como errores de referencia.

Las variables que se estudiaron son: **1)** número de éxitos; **2)** número de errores en la memoria de referencia; **3)** número de errores en la memoria de trabajo; **4)** tiempo total empleado en la realización de la tarea; **5)** número de brazos recorridos; **6)** número de veces que realizó

acicalamiento o “grooming” y 7) número de defecaciones y/o micciones. Estos últimos dos parámetros son considerados marcadores de ansiedad.

2.6 Perfusión y preparación del tejido para estudios citoquímicos y morfológicos.

Finalizado el período de entrenamiento forzado y el test cognitivo-conductual a la edad de 18 meses, se procedió al sacrificio , previa anestesia con Pentobarbital sódico (50 mg/kg) y posterior fijación por perfusión en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1M. Los cerebros fueron postfijados 2 horas en el mismo fijador y cortados con vibrátomo (espesor: 50 μm). Las secciones se tiñeron con la técnica de NADPH-d, la cual revela las neuronas que sintetizan NO. Se estudiaron parámetros morfométricos: área somática (AS, μm^2); diámetro somático máximo (DSM, μm); densidad óptica (OD) y densidad óptica relativa (ROD) de las neuronas positivas por análisis de imágenes. Todas las mediciones fueron realizadas sobre secciones tratadas de ambos grupos, en la misma sesión, el mismo día y por el mismo operador. Se estudiaron de 6-10 cortes por cerebro y se seleccionaron 10 campos totales de cada área. Las imágenes fueron obtenidas del microscopio óptico Axiophot-Zeiss equipado con una cámara de video Olympus 35 mm. ,conectada a un software de captura y análisis, Image Pro- Plus v.6, Media Cybernetics.

2.7 Algunas consideraciones metodológicas sobre el protocolo entrenamiento.

Por último, quisiera hacer algunas consideraciones con respecto a la modalidad y al protocolo de entrenamiento seleccionado que fundamente el criterio que empleamos para su diseño y para la interpretación de los resultados .

Para que los cambios producidos por el ejercicio a distintos niveles ocurran, es fundamental considerar el tiempo y la intensidad de su aplicación ya que, si bien los efectos parecerían poder operar a lo largo de la vida, es cierto que la cantidad y calidad de actividad física para sostenerlos , variarán también a través de la vida del sujeto (10). El modelo de entrenamiento que planteamos en este estudio pretende simular la práctica regular de entrenamiento aeróbico en humanos sin fines de alto rendimiento deportivo, ajustando progresivamente la carga en función de la edad y nivel de rendimiento físico. Estos ajustes periodizados deberían evocar adaptaciones similares a las que induce el entrenamiento aeróbico en humanos (4, 50), como por ejemplo el aumento del consumo de oxígeno, de la eficiencia mecánica y la tolerancia al esfuerzo.

Muchos estudios, sean regímenes voluntarios o forzados, usan intensidades fijas a través del experimento o frecuencias semanales de entrenamiento menores al mínimo requerido para inducir cambios adaptativos en el largo plazo verdaderamente robustos (4) ó, al contrario, que la excedan y no respeten el descanso adecuado para que se produzcan los procesos regenerativos que darán como resultado mayor adaptabilidad y tolerancia al ejercicio.

En este sentido, hemos seguido las recomendaciones para adultos y adultos mayores humanos que sugieren una frecuencia óptima de 5 días

semanales con una duración mínima de 30 minutos de ejercicio suave-moderado ó en su defecto, 3 veces semanales de moderado a intenso de, al menos 30 minutos, con, al menos, 2 sesiones semanales de fuerza. En función de este objetivo, dá lo mismo un método por duración ó intervalado. Desde luego, en la medida que el sujeto busque mayor nivel de fitness deberá aumentar la carga de trabajo.

Este tipo de entrenamiento demanda tiempo, esfuerzo y permanente atención a su respuesta física y conductual , sin embargo, en el presente estudio, los animales han respondido satisfactoriamente mostrando una conducta apetitiva hacia el mismo: cuando se los colocaba en el treadmill running saltaban espontáneamente y muchos cuando eran retirados de la cinta querían volver a ella.

En numerosos reportes se ha planteado la conveniencia de utilizar regímenes de ejercicio voluntario y nó forzados, por resultar menos estresante para el sujeto (4, 5, 11, 16, 18, 37, 43, 46).

La participación voluntaria en actividades físicas intensas e inclusive agotadoras sobre una base de regularidad es un modelo inusual de comportamiento que no se observa en ni en humanos ni en modelos animales de envejecimiento (49). Éste es un punto a considerar cuando se utilizan esta modalidad con acceso voluntario al ejercicio durante períodos prolongados como el wheel running para roedores, ya que un animal conforme envejece elegirá naturalmente correr menos, en consecuencia el descenso en la cantidad de ejercicio y el efecto de la edad actuarán de manera conjunta reduciendo el nivel de fitness y evidentemente modificando los resultados obtenidos.

Por ésto no es sencillo diferenciar los efectos del envejecimiento de los efectos de la reducción progresiva de la actividad ó de la inactividad total cuando se hacen estudios longitudinales para evaluar la performance física ó los posibles efectos del ejercicio sobre determinados parámetros de estudio. Todavía no se sabe cuánto contribuye el envejecimiento en relación con la inactividad o su reducción sustancial que conducirá inevitablemente al deterioro de las capacidades físicas y tolerancia al esfuerzo (49). En cambio, la modalidad de entrenamiento forzado, tomando los debidos cuidados, permite la manipulación específica del estímulo.

Otra fuente de error que se debe controlar es precisamente el tipo de control que se utiliza en estos estudios. Son pocos los autores (50) que permiten una actividad motora mínima y, considero, necesaria, para animales sedentarios que, en definitiva, representan la condición anormal (10, 37) de la especie. En este sentido, proponemos permitir para los controles del grupo corredor, una actividad de caminata suave, de intensidad y frecuencia semanal mínima, que representará una carga fija a lo largo del tiempo ó bien seleccionar un segundo control del primer control de los animales entrenados.

Por último, si bien tomamos el cuidado de entrenar con una mínima intensidad de luz en la sala experimental, entendemos que se debe entrenar durante el ciclo oscuro para no interferir con el descanso del animal. Creemos que ésta es una fuente de error muy importante en este tipo de trabajos.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos en el laberinto radial fueron analizados con ANOVA de medidas repetidas y los restantes con el test t-Student. Los resultados fueron expresados como la media \pm E.S.M. Se consideraron diferencias significativas $p < 0,05$ y altamente significativas con $p < 0,01$.

4. RESULTADOS.

Fig. 1: En las ratas EA (**B**), las neuronas corticales NADPH-d positivas presentaron mayor tamaño y dendritas más largas y ramificadas con respecto a las CS (**A**).

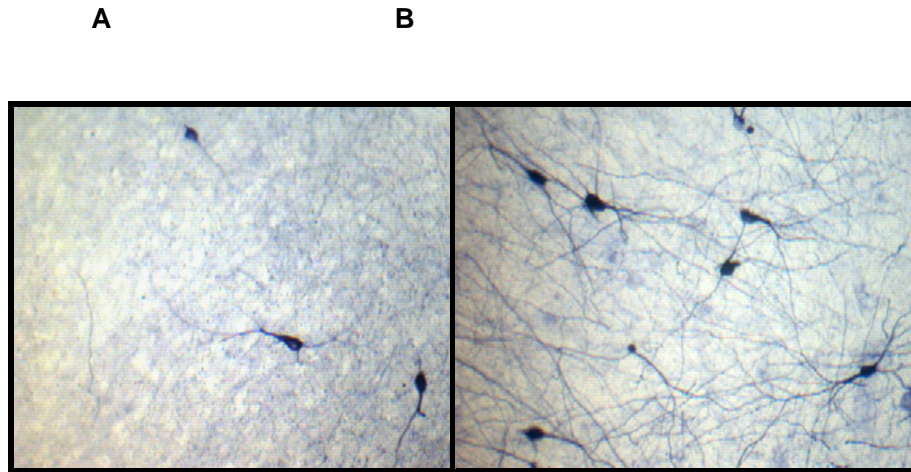
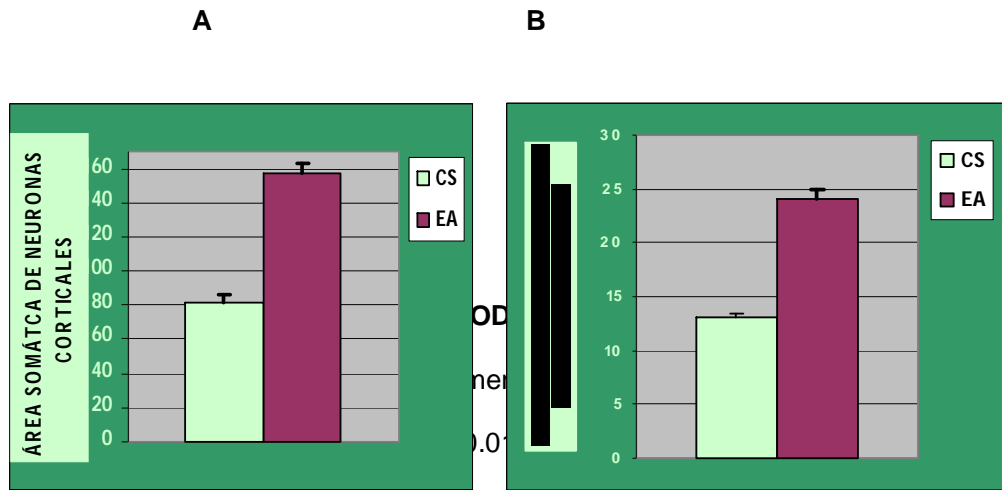


Fig. 2. Efecto del entrenamiento sobre el tamaño de neuronas nitrérgicas corticales, evaluado a través de dos parámetros morfométricos, el área del soma (**A**) y el diámetro medio del soma (**B**). $n = 12$ para cada grupo, $*p < 0,01$. Los parámetros morfométricos que se utilizaron fueron: **AS:** CS 82 ± 4.1 vs. EA 157 ± 5.9 ($p < 0.01$); **DSM:** CS 13 ± 0.4 vs. EA 24 ± 0.9 ($p < 0.01$).



mayor cantidad de NOS y en áreas más extensas en relación con las CS.

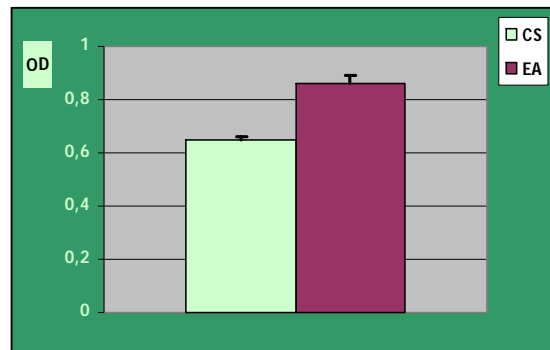


Fig. 4: Las neuronas estriatales de CS (**A**) vs. EA (**B**), no mostraron diferencias significativas en el tamaño ni en la morfología de sus ramificaciones.

A

B

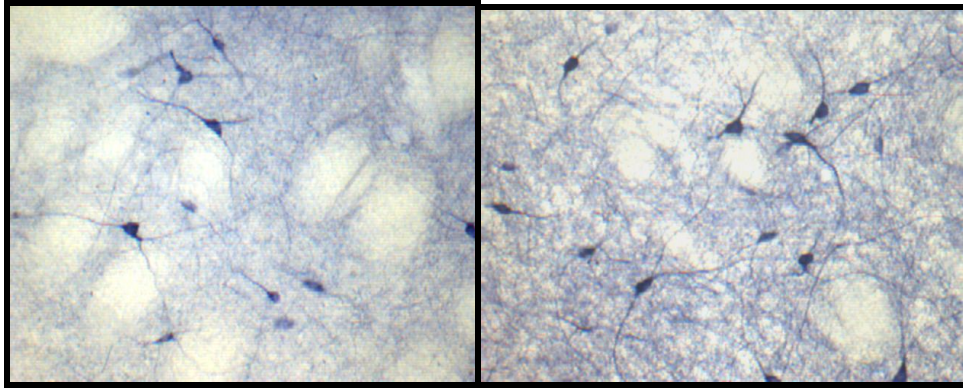


Fig. 5: se detectaron diferencias altamente significativas en las **OD** de neuronas estriatales de CS y EA: 0.72 ± 0.028 vs $0,88 \pm 0.024 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.01$) indicando que las EA expresan mayor cantidad de NOS en áreas más extensas en relación con las CS.

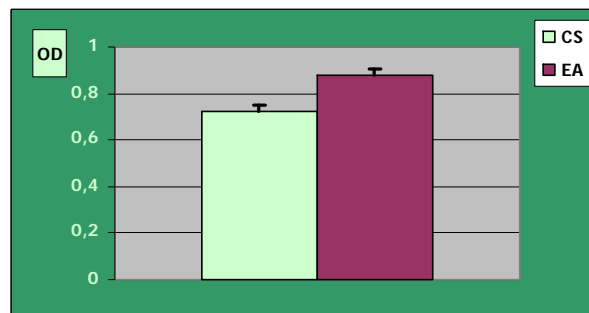


Fig. 6, 7 y 8: Con respecto a los parámetros cognitivo – conductuales, se detectó:

- a)** un menor **Nº de errores en la EMR**: 7 ± 0.25 y 5 ± 0.17 en CS y EA ($p < 0.01$) (**Fig. 6**) Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas de EMR cuando se comparan ratas exitosas de ambos grupos ($p > 0.05$). Se destaca la tendencia en ambos a reducir progresivamente la variabilidad en la respuesta.
- b)** un mayor **Nº de éxitos**: 26 ± 1.4 y 36 ± 1.6 en CS y EA ($p < 0.01$) (**Fig. 7**) y **c)** menor **tiempo total** empleado: 324 ± 7 y 233 ± 4.5

en CS y EA ($p < 0.01$) (Fig. 8).

Fig. 6

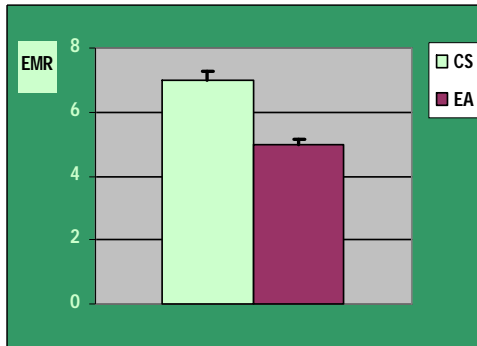


Fig. 7

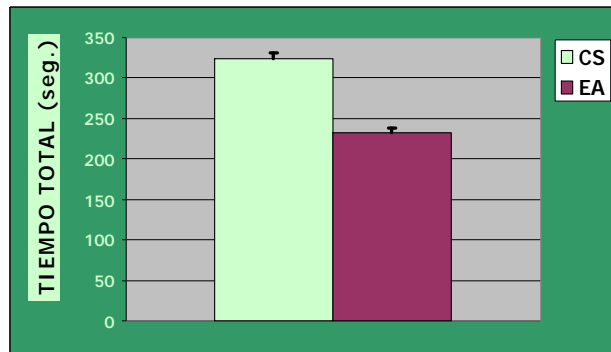
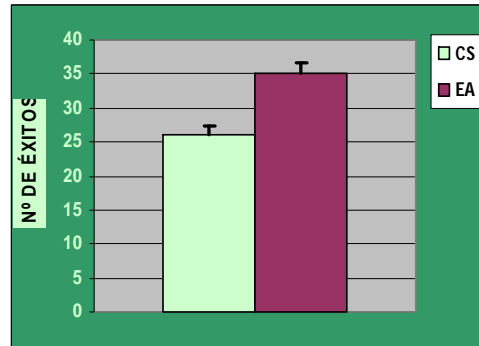
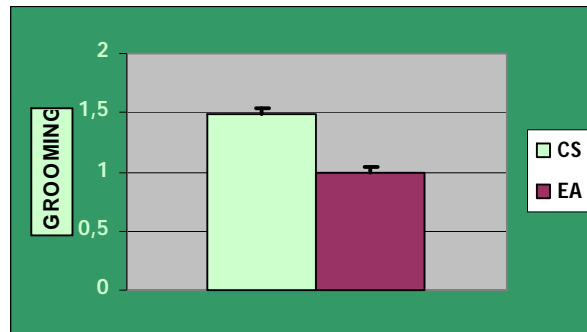


Fig. 9: Los marcadores de ansiedad revelaron que **el número** de veces que la rata realiza acicalado o “**grooming**” muestra diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre CS ($1,48 \pm 0,06$) y EA ($0,67 \pm 0,04$). Sin embargo, no se detectaron diferencias en el **número de defecaciones** entre ambos grupos



5. DISCUSIÓN : En el presente trabajo estudiamos el efecto del ejercicio aeróbico crónico realizado regularmente a lo largo de la vida, desde la etapa pre-puberal hasta la vejez sobre el desempeño cognitivo y conductual de ratas Wistar de 18 meses de edad y su posible relación con la actividad del sistema nitrérgico en regiones cerebrales específicas que se relacionan con la memoria y el aprendizaje: la corteza cerebral y el cuerpo estriado.

Las áreas mencionadas fueron seleccionadas por mostrar patrones de interacción relevantes (44).

Los ganglios basales consisten en: núcleo caudado, putamen, globo pálido, núcleos subtalámicos y sustantia nigra. El núcleo caudado y el putamen constituyen colectivamente lo que se conoce como “cuerpo estriado” (44).

Investigaciones recientes sostienen que entre la corteza y el cuerpo estriado existen conexiones anatómicas y funcionales, que les permiten trabajar juntos como soporte del aprendizaje: el cuerpo estriado interviene en aspectos motores y motivadores de la conducta, en procesos de secuenciación y categorización del aprendizaje y además, sus distintas regiones podrían ser reclutadas diferencialmente durante diversos tipos de aprendizaje (44).

El envejecimiento está asociado con el deterioro en la función cognitiva. Se ha demostrado en modelos de roedores y también en humanos que los sujetos añosos muestran alteraciones significativas en la memoria y aprendizaje, desórdenes en la motricidad y en la conducta emocional (26, 40).

El óxido nítrico (NO) es una molécula que parece desempeñar un rol dual: su presencia es crítica para la regulación fisiológica normal del

sistema nervioso y tiene un papel destacado en la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria, la supervivencia neuronal y la respuesta vascular. Por otra parte, debido a sus propiedades como radical libre, tiene un efecto neurotóxico y pro-apoptótico que podría estar asociado con el envejecimiento normal así como con procesos neurodegenerativos (26, 30, 32).

Trabajos previos (40) demuestran que la producción de NO en regiones asociadas a procesos de memoria y aprendizaje como la corteza cerebral y el cuerpo estriado está significativamente disminuida en ratas senescentes (30 meses) cuando se las compara con ratas adultas jóvenes (3 meses) y que esta alteración podría explicar el deterioro en la memoria espacial que muestran cuando son evaluadas en el laberinto radial. Los autores sugieren que el NO podría jugar un rol importante en procesos de la memoria, particularmente en la fase de adquisición, pero no en la de retención en un aprendizaje espacial (40).

Reportes posteriores (26) muestran que ratas de 24-26 meses, con deterioro cognitivo, presentan menor expresión de la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (nNOS) y mayor de la inducible (iNOS) cuando se las compara con el grupo senescente de mejor desempeño en el laberinto de Morris. Concluyen que el envejecimiento estaría asociado a una declinación en la función de la nNOS y un aumento de la iNOS en ciertas regiones cerebrales, incluyendo el hipotálamo y la corteza frontal, que podría explicar el deterioro en áreas específicamente involucradas en la memoria y el aprendizaje y correlacionaría con el déficit cognitivo detectado (26).

Con respecto al efecto del ejercicio moderado regular de características aeróbicas y de largo plazo sobre el sistema de la NOS (actividad y morfología de neuronas expresando NOS) en las regiones cerebrales

seleccionadas, en el presente estudio se ha detectado un incremento del mismo como lo indica el significativo aumento de la actividad NADPH-d a nivel de corteza y estriado, así como alteraciones morfológicas en neuronas corticales de ratas EA que mostraron el doble de tamaño y mayor desarrollo dendrítico que las de CS. No observamos modificaciones de este tipo en neuronas estriatales, a diferencia de lo reportado en otros trabajos (45).

Asumimos que deberíamos haber realizado estudios de inmunomarcación y co-localización en las regiones seleccionadas e inclusive en hipocampo y cerebelo para identificar las isoformas modificadas por el ejercicio crónico y la edad que aporten más información a la obtenida solamente con técnicas histoquímicas.

Con respecto a las alteraciones morfológicas detectadas en neuronas corticales se podría sugerir que el notable aumento en el tamaño neuronal se debería, al menos parcialmente, a la mayor expresión y actividad de factores de crecimiento dependientes de la presencia de NO.

Existe evidencia (6,7) que demuestra, particularmente en el hipocampo y neocorteza, que el incremento secundario al ejercicio en los niveles de la neurotrofina brain-derived neurotrophic factor ó BDNF y de otras moléculas promotoras de supervivencia neuronal, parece ser dependiente de la síntesis de NO ya que la inhibición de la NOS previene dicho aumento. Las funciones de BDNF a nivel neuronal son varias: supervivencia, migración, diferenciación fenotípica, crecimiento axonal y dendrítico, sinaptogénesis, regulación de la plasticidad sináptica y de la adquisición y consolidación de la memoria (6,7), por consiguiente, el aumento del sistema nitrérgico inducido por el ejercicio podría promover la expresión y actividad de BDNF modificando fenotípicamente las

neuronas motoras corticales (mayor tamaño y desarrollo dendrítico) en los animales EA cuando se las compara con los CS.

En el presente estudio se han evaluado parámetros cognitivo-conductuales utilizando el paradigma del laberinto radial de ocho brazos durante 40 días consecutivos que permitió detectar una mayor capacidad de aprendizaje y menor cantidad de errores en la memoria espacial en ratas EA cuando se las comparó con los CS así como mayor actividad exploratoria en las ratas EA en la primera semana del test, durante el período de moldeamiento (datos no presentados) frente a una conducta de inmovilidad de las CS ante la novedad del laberinto. Este comportamiento fue desapareciendo con el correr de los días a medida que los animales aprendían la tarea.

Durante el período de evaluación, las EA mostraron una mayor capacidad de aprendizaje y menos errores en la memoria espacial, resultando más exitosas y veloces a la hora de completar la prueba. Con respecto a los marcadores de ansiedad, los resultados no son concluyentes ya que no se detectaron diferencias significativas en el número de defecaciones pero sí en las veces que se detenían a acicalarse (“grooming”). Este último parámetro y las observaciones conductuales durante el estudio de ambos grupos sugieren la presencia de menor ansiedad en las ratas EA, coincidiendo con lo reportado por distintos autores con respecto al posible efecto ansiolítico del ejercicio (4,5).

Los datos de la bibliografía y los resultados obtenidos, indicarían la existencia de una posible asociación positiva y causal entre el aumento del sistema nitrérgico mediado por el ejercicio crónico moderado y el desempeño cognitivo que mostraron las ratas añosas entrenadas. Sin

embargo, no se puede concluir que el ejercicio moderado modifique específica y regionalmente alguna isoforma de la NOS responsable de este posible efecto protector en el largo plazo y, simultáneamente, disminuya la iNOS cuyo rol en el envejecimiento normal aún es controvertido .

Los resultados obtenidos en el presente trabajo constituyen un aporte al conocimiento de la respuesta al ejercicio moderado crónico realizado regularmente a lo largo del ciclo vital del animal y su posible relación con el sistema nitrérgico en regiones cerebrales específicas en la vejez. En este sentido, complementan los obtenidos por otros autores (45) que han empleado distintas modalidades de ejercicio con ratones jóvenes en el corto plazo.

6. CONCLUSIÓN : Se observó un aumento del sistema de NO en la corteza cerebral y estriado de los animales EA que podría participar en el efecto protector sobre la función y supervivencia de las neuronas corticales y estriatales y por consiguiente sobre la declinación cognitiva dependiente de la edad. El ejercicio aeróbico a lo largo de la vida tendría un efecto neuroprotector en el largo plazo que podría estar mediado parcialmente por el sistema nitrérgico.

El presente trabajo constituye un aporte para abordar futuros estudios longitudinales utilizando el entrenamiento aeróbico de moderada intensidad con ajustes periódicos en la carga con el fin de establecer puntos de corte en las etapas adecuadas. Por otra parte, el estudio del tiempo y la magnitud de la carga constituyen variables de gran interés en sí mismas.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. **Alderton W, Cooper Ch, Knowles R.** Nitric Oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.Society* (2001) 357, 593:615.
2. **Alessio H, Hagerman A, Nagy S, Philip B, Byrnes R, Woodward J, Callahan P, Wiley R.** Exercise improves biomarkers of health and stress in animals fed ad libitum. *Physiology and Behavior* 84(2005) 65-72.
3. **Anderson BJ, Rapp DN, Baek DH, McCloskey DP, Coburn-Litvak PS, Robinson JK.** Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiol Behav.* 2000 Sep 15;70(5):425-9.
4. **Brown D, Johnson M, Armstrong C, Lynch J, Caruso N, Ehlers L, Fleshner M, Spencer R, Moore RL.** Short-term treadmill running in the rat: what kind of stressor is it?. *J Appl Physiol* 103:1979-1985,2007.
5. **Campisi J, Leem T, Greenwood B, Hansen M, Moraska A, Higgins K, Smith T, Fleshner M.** Habitual physical activity facilitates stress-induced HSP72 induction in brain, peripheral and immune tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R520-R530, 2003.
6. **Chen M, Ivy A, Russo-Neustadt A.** Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3'kinase expression. *Brain research Bulletin* 68 (2006) 257-268.
7. **Chen M, Russo-Neustadt A.** Nitric oxide signaling participates in norepinephrine-induced activity of neuronal intracellular survival pathways. *Life Sciences* 81(2007) 1280:1290.

8. **Cotman CW, Berchtold NC.** Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 2002 Jun;25(6):295-301
9. **Dik M, Deeg DJ, Visser M, Jonker C.** Early life physical activity and cognition at old age. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2003 Aug;25(5):643-653
10. **Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Gandevia SC, Gomez-Pinilla F, Greenwood BN, Hillman CH, Kramer AF, Levin BE, Moran TH, Russo-Neustadt AA, Salamone JD, Van Hoomissen JD, Wade CE, York DA, Zigmond MJ.** Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring).* 2006 Mar;14(3):345-56. Review.
11. **Droste SK, Chandramohan Y, Hill LE, Linthorst ACE, Reul JMHM:** Voluntary Exercise Impacts on the Rat Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis Mainly at the Adrenal Level. *Neuroendocrinology* 2007;86:26-37 .
12. **Dudchenko PA.** An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28(2004) 699:709.
13. **Ehninger D, Kempermann G.** Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 2008 Jan;331(1):243-50.
14. **Estévez AG, Sahawneh MA, Lange PS, Bae N, Egea M, Ratan RR.** Arginase 1 regulation of nitric oxide production is key to survival of trophic factor-deprived motor neurons. *J Neurosci.* 2006 Aug 16;26(33):8512-6.
15. **Fabel K, Kempermann G.** Physical Activity and the Regulation of Neurogenesis in the Adult and Aging Brain. *Neuromolecular Med.* 2008 Feb 20.

16. **Filipović D, Gavrilović L, Dronjak S, Radojčić MB.** The effect of repeated physical exercise on hippocampus and brain cortex in stressed rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jan;1096:207-19.
17. **Goto S, Radak Z, Nyakas C, Chung H, Naito H, Takahashi R, Nakamoto H, Abe R.** Regular exercise: an effective means to reduce oxidative stress in old rats. *Ann. NY. Acad (2004)1019:471-474.*
18. **Hayes K, Sprague S, Guo M, Davis W, Friedman A, Kumar A, Jimenez D, Ding Y.** Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol.* 2008 Mar;115(3):289-96.
19. **Kim YP, Kim H, Shin MS, Chang HK, Jang MH, Shin MC, Lee SJ, Lee HH, Yoon JH, Jeong IG, Kim CJ.** Age-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Neurosci Lett.* 2004 Jan 23;355(1-2):152-154
20. **Kim YP, Kim H, Jang MH, Lim B, Kim H, Kim SS, Kim E, Kim C.** Magnitude and Time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Int J Sports Med (2003);24:114-117.*
21. **Klempin F, Kempermann G.** Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2007 Aug;257(5):271-80
22. **Kramer AF, Erickson KI, Colcombe SJ.** Exercise, cognition, and the aging brain. *J Appl Physiol.* 2006 Oct;101(4):1237-42. *Epub 2006 Jun 15. Review*

23. **Lacerda AC, Marubayashi U, Coimbra C.** Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise. *Brain Research Bulletin* 67 (2005) 110-116.
24. **Lacerda AC, Marubayashi U, Balthazar C, Leite L, Coimbra C.** Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise, reducing running performance in rats. *Neuroscience Letters* 393 (2006) 260-263.
25. **Lacerda AC, Marubayashi U, Balthazar C, Leite L, Coimbra C.** Central nitric oxide inhibition modifies metabolic adjustments induced by exercise in rats. *Neuroscience Letters* 410 (2006) 152-156.
26. **Law A, O'Donnell J, Gauthier S, Qu R.** Neuronal and inducible Nitric Oxide Synthase expressions And activities in the hipocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired ad impaired Long Evans rats. *Neuroscience Vol.* 112, No. 2, pp. 267:275, 2002.
27. **Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L.** Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behavioral Brain Research* 163 (2005), 78:90.
28. **Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK.** Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex. *Neurobiol Aging.* 2004 Apr;25(4):547-52.
29. **Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK.** Hippocampal nitric oxide synthase and arginase and age-associated behavioral deficits. *Hippocampus.* 2005;15(5):642-55.

30. **Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK.** Nitric oxide synthase and arginase in the rat hippocampus and the entorhinal, perirhinal, postrhinal, and temporal cortices: regional variations and age-related changes. *Hippocampus*. 2003;13(7):859-67
31. **Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK.** Potential involvement of NOS and arginase in age-related behavioural impairments. *Exp Gerontol*. 2004 Aug;39(8):1207-22.
32. **Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK.** Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience*,2003;119(3):679-87.
33. **Lytle ME, Vander Bilt J, Pandav RS, Dodge HH, Ganguli M.** Exercise level and cognitive decline. The MOVIES Project. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2004 Apr-Jun;18(2):57-64
34. **Maeda S, Tanabe T, Otsuki T, Sugawara J, Lemitsu M, Miyauchi T, Kuno S, Ajisaka R, Matsuda M.** Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. *Hypertens Res*. 2004 Dec;27(12):947-53.
35. **Markham J, Greenough W.** Experience-driven brain plasticity: beyond the sinapse. *Neuron Glia Biol*. 2004. Nov; 1(4); 351:363
36. **Mattson M.** Hormesis and disease resistance: activation of cellular stress response pathways. *Human and Experimental Toxicology (2008) 27: 155-162.*
37. **Moraska A, Deak T, Spencer R, Roth D, Fleshner M.** Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *AJP-*

Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.
Vol.279, Issue 4, R 1321-1329, Oct 2000.

38. **Navarro A, Boveris A.** Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radical Biology and Medicine* 44 (2008) 224-229.
39. **Navarro A, López-Cepero JM, Báñez MJ, Sánchez-Pino MJ, Gómez C, Cadenas E, Boveris A.** Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Feb;294(2):R501-9.
40. **Noda Y, Yamada K, Nabeshima T.** Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behavioural Brain Research* 83(1997) 153-158.
41. **Pistell PJ, Daffin LW Jr, Nelson CM, Duffy KB, Bowker JL, Spangler EL, Ingram DK, Devan BD.** Combined administration of subthreshold doses of the nitric oxide inhibitor, nitro-L-arginine, and muscarinic receptor antagonist, scopolamine, impairs complex maze learning in rats. *Behav Pharmacol.* 2007 Dec;18:801-805.
42. **Rassaf T, Lauer T, Heiss C, Balzer J, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Drexhage C, Meyer C, Kelm M.** Nitric oxide synthase-derived plasma nitrite predicts exercise capacity. *Br J Sports Med.* 2007 Oct;41(10):669-73.
43. **Sarbadhikari S, Saha A.** Moderate exercise and chronic stress produce counteractive effects on different areas of the brain by acting through various neurotransmitter receptor subtypes: A hypothesis. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 2006,3:33.

44. **Seger AC.** The Basal Ganglia in human learning. *The Neuroscientist. Vol 4 ,285:290 August 2006*
45. **Torres JB, Assunção J, Farias JA, Kahwage R, Lins N, Passos A, Quinteiros A, Trévia N, Diniz CW.** NADPH-diaphorase histochemical changes in the hippocampus, cerebellum and striatum are correlated with different modalities of exercise and watermaze performances. *Exp Brain Res. 2006 Nov;175(2):292-304.*
46. **Tsatsoulis A, Fountoulakis S.** The protective role of exercise on stress system dysregulation and comorbidities. *Ann N Y Acad Sci. 2006 Nov;1083:196-213.*
47. **Van Praag H, Schubert T, Zhao Ch, Gage F.** Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of Neuroscience. 2005. 25(38):8680-8685.*
48. **Van Praag H.** Neurogenesis and Exercise: Past and Future Directions. *Neuromol.Med.2008*
49. **Wilmore J, Costill D.** Fisiología del Esfuerzo y del Deporte. *Ed. Paidotribo, 5ta. ed, 2004.*
50. **Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O.** Intensity-controlled treadmill running in rats: VO₂ max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001, Mar;280(3):H1301- H1310.*