

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO VOLUNTARIO SOBRE
LAS CAPACIDADES DE MEMORIA EN UN MODELO
ANIMAL DE ASFIXIA PERINATAL”**

JAVIER IGNACIO SILVA GARCÍA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN NEUROCIENCIAS

Directores de tesis:

Dra. Paola Morales Retamales

Dr. José Luis Valdés Guerrero

2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Javier Ignacio Silva García

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Neurociencias en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 6 de Junio de 2017

**Dr. José Luis Valdés
Director de Tesis
Universidad de Chile**

**Dra. Paola Morales R
Directora de tesis
Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Adrián Ocampo

Prof. Dr. Fernando Torrealba

**Prof. Dra. Jimena Sierralta
Presidente Comisión**

A la evolución

La curiosidad

Y la ciencia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Valdés, por aceptarme en su laboratorio, guiarme en este proceso, y por toda su ayuda y conocimiento entregado.

A la Dra. Paola Morales, por guiar mi tesis con alta rigurosidad, y a la vez con empatía y calidez lo que hizo más amable y efectivo todo este proceso

A Andrea Birkner, por su ayuda, constante preocupación y cariño.

A los integrantes del laboratorio de aprendizaje, memoria y neuromodulación, por el buen ambiente, buena disposición, y por tener la paciencia de enseñarle a un kinesiólogo, procesos de laboratorio desde lo más sencillo.

A Noemí Grinspun, por orientarme en mi investigación, solucionar mis dudas, y por su amistad.

Al equipo de Neuro-rehabilitación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Por cubrir mis turnos, pacientes y soportar mis locuras

A la jefatura del Servicio de Medicina Física y Rehabilitación, por otorgarme permisos administrativos para poder completar este grado académico.

Al departamento de Kinesiología de la Universidad de Chile, por su apoyo económico.

Y finalmente a mi madre, que desde siempre me mostró la ciencia y generó, quizás sin saber, esta inquietud por el conocimiento.

ÍNDICE	
Resumen	5
Abstract	7
Abreviaturas	9
Introducción:	10
1. Asfixia Perinatal	10
1.1 Modelo animal de asfixia perinatal	11
2. Ejercicio Físico	13
2.2 Protocolos de ejercicio físico	15
3. Histamina	16
Hipótesis	20
Objetivo General	20
Objetivos Específicos	20
Materiales y Métodos	21
1. Sujetos	21
2. Modelo de Asfixia Perinatal	21
3. Grupos experimentales	22
4. Aparatos y procedimientos	24
5. Histología	27
6. Inmunohistoquímica	28
7. Cuantificación de la expresión de c-fos, Arc, ADA-fos	30
Resultados	31
Efecto del ejercicio físico sobre el rendimiento en una tarea de memoria	31
Parámetros de ejercicio	34
Efecto del ejercicio sobre la plasticidad neuronal hipocampal	38
Efecto del ejercicio sobre la actividad histaminérgica cerebral	41
Correlación entre las variables observadas	49
Discusión	52
Referencias	63

RESUMEN

La asfixia perinatal (AP) es una de las principales causas de muerte y daño neurológico en los recién nacidos, y se presenta generalmente asociada al periodo de parto. Es definida como un insulto metabólico causado por la interrupción temporal del aporte de oxígeno al organismo, que conlleva a muerte celular induciendo efectos deletéreos a nivel neurológico.

Esta patología ha sido ampliamente estudiada en modelos animales, siendo el modelo en ratas bien caracterizado y clínicamente relevante para reproducir la asfixia perinatal humana. Dentro de las regiones cerebrales más vulnerables a la asfixia se encuentran el hipocampo, ganglios basales y cerebelo induciendo alteraciones motoras y cognitivas.

Es ampliamente reconocido que el ejercicio físico posee un efecto neuroprotector frente a eventuales daños del sistema nervioso central, ya sea por envejecimiento o una injuria específica. En respuesta al ejercicio se liberan distintos factores tróficos que promueve un aumento en plasticidad y neurogénesis; a la vez que produce mejoras en nuestras capacidades cognitivas como la memoria. Estudios previos de nuestro laboratorio sugieren que el ejercicio tendría un efecto benéfico en la memoria que se correlacionaría con un incremento en la actividad histaminérgica cerebral.

Por otro lado, se ha descrito que la AP genera déficits cognitivos evaluados con una tarea de reconocimiento de objetos que se correlacionan a una disminución en el número de células histaminérgicas en el núcleo túberomamilar del hipotálamo.

Así, el objetivo de este trabajo es estudiar si el ejercicio físico voluntario es capaz de mejorar el deterioro cognitivo, específicamente de memoria y la plasticidad hipocampal en ratas con AP. Para ello, en ratas sedentarias (espontánea n=6, cesárea n=6 y asfíctica n=6) y ratas que hacen ejercicio voluntario en rueda por 21 días (espontánea n=6, cesárea n=6 y

asfíctica n=5) se evaluó (i) la memoria dependiente de hipocampo mediante una tarea de reconocimiento de la posición de objetos; (ii) la plasticidad neuronal hipocampal mediante inmunohistoquímica (IHQ) para Arc y (iii) la actividad histaminérgica en el núcleo túbero-mamilar mediante doble IHQ para c-fos y ADA, (un marcador de fenotipo histaminérgico).

Los resultados obtenidos evidencian que el ejercicio indujo (i) un incremento en la capacidad de memoria de los animales con AP alcanzando un desempeño similar al del grupo control, (ii) un incremento en la inmunoreactividad de Arc en el hipocampo de ratas con AP. La actividad histaminérgica cerebral en las ratas AP no evidenció cambios, lo que si fue observado en los grupos controles, donde aumentó la activación del sistema histaminérgico

Estos datos sugieren que el ejercicio voluntario mejora las capacidades de memoria de animales que sufren AP en paralelo a un incremento en la plasticidad hipocampal, independiente del sistema histaminérgico. Sin embargo, se requieren estudios que incorporen un mayor número de variables del ejercicio para poder determinar qué parámetro del mismo se correlaciona con estas ganancias cognitivas.

ABSTRACT:

Perinatal asphyxia (PA), is a leading cause of death and neurological damage in the neural system between the newborns, and generally, it presents associated at the delivery. Is defined by a metabolic insult caused by a temporary interruption of oxygen supply to the organism, which leads to cellular death-inducing deleterious effects at the neurological level.

This pathology has been widely studied in animal models, been the rat model well-characterized and clinically relevant to study human PA. Hippocampus, basal ganglia, and cerebellum are within the most vulnerable regions in asphyxia inducing cognitive and motor disorders.

It's widely known that physical exercise has a neuroprotector effect against possible damage in central nervous system, either by aging or a particular injury. In response to exercise different kind of trophic factors are released which promote an increase in plasticity and neurogenesis; at the same time, it produces improvements in our cognitive capacities like memory. According to previous results from our laboratory exercise it would have a beneficial effect on memory, correlated with an increase in histaminergic cerebral activity.

By the other side, it has been proposed that perinatal asphyxia generates cognitive deficits evaluated by an object recognition test and that is correlated with a decrease in the number of histaminergic cells in tuberomammillary nucleus (TMN) at the hypothalamus.

The primary objective of this work was study if voluntary physical exercise is able to improve the cognitive impairment, specifically in memory, and hippocampal plasticity in PA rats. For that objective hippocampal-dependent memory was evaluated by object location task in sedentary rats (spontaneous n=6, cesarean n=6 and asphytic n=6) versus rats that are able to

voluntary run by 21 days in an exercise wheel (spontaneous n=6, cesarean n=6 and asphytic n=6). It was also evaluated hippocampal plasticity by Arc immunohistochemistry and histaminergic activity in the TMN by double immunohistochemistry to c-Fos and ADA (an histaminergic phenotype marker).

The obtained results show that exercise (i) induced a memory increase in PA animals, achieving similar performance to the control group, (ii) Produced an increase in Arc immunoreactivity (plasticity associated protein) in PA rats at the hippocampus. (iii) There are no changes in histaminergic activity of the perinatal asphyxia rats, which in turn, was observed at control groups, where histaminergic system activation increased.

This data suggest that voluntary exercise improves memory capacities in PA animal, at time with an increase in hippocampal plasticity, independent of the histaminergic system. Nevertheless, further studies are needed with a greater number of exercise variables to determine which one is correlated with this cognitive improvement.

ABREVIATURAS

ADA: Adenosin deaminasa

AP o PA: Asfixia perinatal / Perinatal Asphyxia

ARC: proteína del citoesqueleto regulada por actividad (activity regulated cytoskeleton protein)

BDNF: Factor de crecimiento derivado de cerebro (brain derived neurotropic factor)

CA1: *cornu ammonis 1*

CA3: *cornu ammonis 3*

cAMP: adenosin mono-fosfato cíclico

DG: giro dentado

HDC: histidina descarboxilasa

IEG: genes de expresión temprana (immediate early gene)

IGF-1: factor de crecimiento insulínico 1 (insulinic grow factor 1)

IHQ: inmunohistoquímica

ir-ADA o ADA⁺: inmunoreactividad para ADA

ir-Arc o Arc⁺: inmunoreactividad para Arc

ir- c-Fos/ADA o ADA⁺/Fos⁺: doble inmunoreactividad para c-fos y ADA

LTP: potenciación a largo plazo

NMDA: N-metil D-aspartato

PBS: buffer fosfato salino

TMN: núcleo túberomamilar

TMND: núcleo tuberomamilar dorsal

TMNV: núcleo tuberomaminlar ventral

INTRODUCCIÓN

1. Asfixia perinatal

La asfixia perinatal (AP), consiste en una interrupción de la disponibilidad de oxígeno, debido a una alteración del intercambio gaseoso materno fetal, o una falla en el equilibrio pulmonar del neonato, que implica una disfunción metabólica importante, la cual no necesariamente lleva a la muerte del individuo. Esta disminución del aporte de oxígeno al cerebro, el cual depende principalmente de metabolismo aeróbico, lleva a las neuronas (y células en general) a un proceso de glicólisis menos eficiente para producir energía, con el consecuente aumento en los niveles de lactato que se traduce en una acidosis del medio extracelular, lo que se ha visto que está en directa relación con las consecuencias neurológicas. Conjuntamente al déficit energético, la AP induce un incremento en la excitotoxicidad con daños subsecuentes a las células nerviosas (Mañeru, 2002; Karl, 2010; Herrera-Marschitz M, 2011; Morales, 2011; Herrera-Marschitz, 2014). La AP presenta una alta mortalidad, la cual corresponde aproximadamente a un tercio del total de los casos, (Badr Zahr, 2006), la encefalopatía hipóxico isquémica resultante de la asfixia, muestra una incidencia variable a nivel mundial entre 1 – 6 de cada 1000 nacidos vivos (Simola, 2008; Vannucci, 2000) siendo mayor en los países en vías de desarrollo (Galeano, 2011) debido a los avances en las unidades de neonatología. Se estima que la incidencia en nuestro país, es 4 a 6 por cada mil nacidos vivos en todos los grados, y de 2 a 3 por cada mil en los casos severos. (Novoa, 2012). De los sobrevivientes, las complicaciones en el desarrollo se han descrito a corto y largo plazo, (Van Handel, 2010) (30% a un 40% del total), (Badr Zahr, 2006), consistentes en alteraciones neurológicas, retraso en el desarrollo psicomotor, alteraciones en el aprendizaje, parálisis cerebral, alteraciones sensoriales, epilepsia, entre otras, (Romero, 2014; Karl J, 2010;

Bustamante, 2007). La severidad del daño neurológico producto de esta asfixia, se relaciona con el retardo en obtener una respiración de manera eficiente y la madurez del sistema nervioso del feto al momento del nacimiento, y otros aspectos perinatales como puede ser el caso de desprendimiento prematuro de placenta, o compresión del cordón umbilical, (Morales, 2011; de Haan, 2006)..

La AP induce un proceso similar al envejecimiento a nivel cerebral, con disminución en las conexiones sinápticas y con mayor susceptibilidad a la degeneración (Strackx, 2010). El grado de afección del SNC es variable y está en relación a la edad gestacional, pudiendo afectar diversas áreas del SNC, que incluyen: tronco encefálico, tálamo, hipocampo, núcleos de la base, y daño disperso en la sustancia blanca (Romero, 2004, De Haan, 2006; Herrera-Marschitz, 2014).

1.1 Modelo animal de asfixia perinatal

Se ha demostrado, en modelos animales de AP realizados en ratas, que la hipoxia, produce daño neuronal y apoptosis a nivel del hipocampo, que se correlaciona con déficits cognitivos a largo plazo y dependientes del tiempo de hipoxia. Al respecto, se ha observado una disminución del número de neuronas en el hipocampo, (Morales, 2010) en las regiones CA1, CA3 y en el Giro dentado (DG), (Yang, 2011; Hoeger, 2006; Morales, 2005; Bjelke, 1991) así como también un aumento de núcleos apoptóticos en todo el hipocampo un mes post-hipoxia (Morales 2010) acompañado de alteraciones en la conectividad neuronal y sinaptogénesis (Fleiss 2011; Herrera-Marschitz et al. 2014; Marriott et al. 2015), También se han reportado alteraciones en las conexiones sinápticas a nivel de los ganglios basales, la corteza prefrontal y el cerebelo (Strackx, 2010; Bustamante, 2007; Weitzdoerfer, 2004; Van de Berg, 2003), así como también pérdida neuronal en el núcleo ventral anterior del tálamo (Hoeger, 2006).

Recientemente ha sido documentado el efecto de la AP sobre el sistema histaminérgico, encontrándose menor cantidad de neuronas de este fenotipo (específicamente en el núcleo tuberomamilar ventral), y también una menor expresión de la enzima sintetizadora de histamina (histidina descarboxilasa) en ratas sometidas a AP (Flores-Balter, 2016)

Los efectos de la AP se han reflejado en déficits de memoria no espacial medida en una prueba de reconocimiento de objetos, (Simola, 2008), y memoria espacial registrada en el laberinto acuático de Morris (Galeano, 2011).

Si bien se han registrado alteraciones a nivel de estriado y de la corteza frontal, que están involucrados en la coordinación durante la locomoción, las ratas con AP, no presentan deficiencias en la locomoción, medidas como distancia recorrida y velocidad en una prueba de campo abierto, comparadas con controles a las 6 semanas de vida (Van de Berg, 2003; Galeano, 2011). Tampoco se registraron diferencias en cuanto a la actividad motora en ratas de 3 meses evaluadas en el laberinto acuático de Morris, o en el laberinto elevado en cruz en relación a controles (Hoeger, 2000) ni tampoco presentan diferencias en actividad motora gruesa (Simola, 2008). Sin embargo, existen otros resultados que muestran que las ratas caminan menos a los 21 días en el test de campo abierto, sólo al inicio del test, por lo que el mismo autor lo atribuía más que a una alteración a nivel motor, a una disminución en la motivación (Galeano, 2011). Acorde a esta descripción, existen registros que indican que las alteraciones motoras que puedan ser producto de las lesiones a nivel del cerebelo, se tienden a normalizar a la edad de 3 meses. La única alteración motora significativa que se ha documentado sería la observada usando el test de rotarod, en el cual las ratas asfícticas muestran un peor desempeño en relación a las ratas controles (Hoeger, 2006; Simola, 2008);

por lo tanto podemos afirmar que las ratas que sufren AP no presentan grandes alteraciones en la locomoción, pero si a nivel de la coordinación y equilibrio.

2. Ejercicio físico

En humanos los efectos beneficiosos del ejercicio se han demostrado a nivel de diversos sistemas fisiológicos, siendo un factor protector de diversas enfermedades crónicas, (por ejemplo diabetes, osteoporosis, cáncer) y de una muerte prematura (Warburton, 2006). Por otra parte tiene efectos específicos a nivel del sistema nervioso: es capaz de aumentar el volumen del cerebro a la vez que produce mejoras en las habilidades cognitivas independiente de la edad, afectando positivamente la velocidad y capacidad del aprendizaje, la capacidad de atención y la retención de la información (Alomari, 2013; Kennard, 2012), y también es capaz de proteger al individuo ante los declives cognitivos asociados al envejecimiento (Smith, 2013; Praag, 2009). Más específicamente, el ejercicio es capaz de aumentar el flujo sanguíneo cerebral, aumentar los factores que favorecen la angiogénesis, cambios a nivel de conexiones sinápticas, en el volumen cerebral en los ancianos, así como también es capaz de aumentar la neurogénesis a nivel del hipocampo (DG) y en la región sub-ventricular. (Smith, 2013)

Se ha reportado en estudios en ratas, que distintos factores neurotróficos aumentan en relación al ejercicio como el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y el IGF-1 (factor de crecimiento insulínico 1) (Alomari, 2013; Kim, 2010). El BDNF facilita la liberación de las vesículas en los terminales presinápticos de sinapsis excitatorias, induce la modulación del reciclaje de vesículas así como también, aumenta la probabilidad de liberación de neurotransmisores en las sinapsis excitatorias de CA3-CA1, (Tyler y Zhang, 2006)

produciendo conjuntamente mejoras en las capacidades de memoria (Griffin, 2009). Se ha descrito que el ejercicio induce un aumento del BDNF en el DG, y la corteza perirrinal (Griffin, 2009). El IGF-1 favorece la neurogénesis a nivel del hipocampo, a la vez que reduce los déficits cognitivos producto de la edad, (Alomari, 2013). Conjuntamente a estos cambios en los factores neurotróficos se ha descrito un aumento en los mecanismos de plasticidad tales como el LTP (*long term potentiation*), que podría explicarse por un cambio en las propiedades de las espinas dendríticas, las cuales cambian en tamaño y cantidad, considerado como un cambio en la fuerza de las conexiones sinápticas (Praag, 2009; O' Callaghan, 2007), en el DG, en CA1 y en la corteza entorrinal (Stranahan, 2007). El ejercicio físico genera una mejora en el rendimiento de tareas de memoria espacial dependientes de hipocampo, memoria no espacial, condicionamiento al miedo contextual y el aprendizaje de evitación pasiva (Praag, 2009; Stranahan, 2007; O' Callaghan, 2007, Farmer, 2004). El ejercicio físico es capaz de mejorar la memoria espacial tanto en ejercicio forzado, como voluntario, conjuntamente a un aumento en el número de neuronas (Cetinkaya, 2013; Farmer, 2004; Holmes, 2004) y una disminución de la apoptosis en DG y CA1, en ratas hasta 24 meses de edad (Kim, 2010). El aumento de la proliferación celular en DG, se relacionaría con la duración e intensidad del ejercicio físico realizado (Holmes, 2004; Kim, 2003).

Se ha demostrado que el ejercicio promueve la neurogénesis en el adulto (Cetinkaya, 2013; Kim, 2010; Praag, 2009; Farmer, 2004; Holmes, 2004) la cual produce mejorías en la memoria, cognición y procesos de aprendizaje, así como también se encuentra involucrada en procesos de recuperación de daño cerebral y en mediar respuestas del cerebro al estrés, (Austin, M. 2014).

En resultados de estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se encontró que el ejercicio físico es capaz de aumentar la actividad histaminérgica a nivel del núcleo túberomamilar (TMN), lo cual se correlaciona con una mejoría en el rendimiento en tareas de memoria no espacial. Por otra parte antagonistas de los receptores H1 de histamina, reducen significativamente el rendimiento de tareas de memoria no espacial en animales sedentarios, mientras que los que hacen ejercicio manifiestan una resistencia al efecto de estos antagonistas, sobre el rendimiento cognitivo (Grinspun et al. En Preparacion). Taati y colaboradores (2014), demostraron que los efectos del ejercicio sobre el aprendizaje y memoria estarían mediados por el receptor H2, ya que al utilizar un bloqueador de este receptor (cimetidina), no se observan las mejoras cognitivas producto del ejercicio, (Taati y cols, 2014).

2.2 Protocolos de ejercicio físico

En ratas se han utilizado protocolos de ejercicio forzado (treadmill) como voluntario (rueda) para estudiar los efectos del mismo, encontrando beneficios por ambas partes, sin embargo el ejercicio forzado se asocia a factores estresantes (O' Callaghan, 2007), los cuales aumentan los niveles de corticosterona, provocando cambios crónicos en el eje hipotálamo-adrenal, que afectan al sistema inmune y provocan alteraciones reproductivas (Droste, 2003). Estos cambios en los niveles de corticosterona son capaces de provocar atrofia de las neuronas piramidales del hipocampo lo cual puede llevar a un déficit en las pruebas de aprendizaje y memoria (Alomari, 2013; Kennard, 2012). Existe evidencia divergente acerca de qué tan perjudicial pueda ser el efecto del ejercicio forzado, existiendo reportes de que ambos tipos de ejercicio, forzado y voluntario, provocan mejoras a nivel del aprendizaje espacial. Sin embargo, en ellos se considera un estímulo aversivo altamente estresante, una descarga

eléctrica en las patas del animal (o foot shock), para forzar a la rata a proseguir en el entrenamiento (Cetinkaya, 2013; Farmer, 2004; Holmes, 2004; Praag, 2009). Además esta mejora en ejercicio forzado se percibe luego de exposición prolongada, (6 semanas) pues se produciría un fenómeno de habituación al estímulo estresante, el cual está siempre ausente en un protocolo de ejercicio voluntario, (Alomari, 2013). En esta investigación se utilizó ejercicio voluntario dado que i) no implica un estresor para movilizar al animal, ii) es un paradigma más ecológico del como harían ejercicio los animales en la naturaleza, ya que incluso animales en estado salvaje (wild type) les motiva correr en rueda sin ningún tipo de refuerzo (Meijer, 2014).

En relación a la intensidad del ejercicio, se ha visto que intensidad moderada, es decir entre un 30 y 50% de la capacidad máxima de velocidad del animal (capacidad física) obtenida en un test de ejercicio, sería lo más efectivo en lesiones agudas como el accidente cerebrovascular, reduciendo la inflamación, el tamaño de la lesión y promoviendo la neurogénesis (Austin, 2014). Por otra parte, ha sido descrito en ratas que, 21 días de ejercicio es suficiente para expresar cambios a nivel conductual como neurofisiológico producto del ejercicio (Radahmadi y cols, 2015; Wang y Wang, 2016).

3. Histamina

El sistema histaminérgico se preserva a través de la filogenia, desde un molusco al humano, como un sistema modulador que es capaz de modificar el nivel de activación del sistema nervioso de acuerdo a las demandas a las que se ve enfrentado, tales como el ciclo sueño vigilia, homeostasis endocrina, funciones sensoriomotrices, atención, cognición, aprendizaje y memoria (Shan, 2013; Haas, 2008). La histamina es una imidazol amina que puede actuar como neurotransmisor y neuromodulador a nivel del sistema nervioso central y

periférico. Los receptores que permiten su función son dos post-sinápticos (H1R y H2R) con efectos depolarizantes a nivel de neuronas postsinápticas, y otro pre-sináptico (H3R) por el cual se modula la liberación y síntesis de histamina y otros neurotransmisores como glutamato, acetilcolina y noradrenalina (Torrealba, 2012; Torkaman-Boutorabi, 2014). Existe otro receptor que es periférico (H4R) y está relacionado con el sistema inmune. Todos ellos son receptores acoplados a Proteínas G. (Bernardino, 2012). La expresión de receptores del tipo H1 y H2 se distribuye en variadas regiones cerebrales tales como el hipotálamo, tálamo, corteza, hipocampo, ganglios basales, amígdala y tronco encefálico (Haas, 2008; Schneider, 2014). La histamina se sintetiza a partir del aminoácido histidina por la enzima histidina descarboxilasa, y en el sistema nervioso central es sintetizada exclusivamente en el TMN, (ver figura 1), inerva casi todas las regiones cerebrales, desde la corteza prefrontal a la médula espinal, incluyendo por ejemplo la corteza, hipocampo y estriado (Haas, 2008; Schneider E, 2014; Torrealba, 2012). La actividad de la histamina seguiría un patrón circadiano, observándose mayor actividad neuronal en el TMN durante el día subjetivo (oscuridad) en los roedores (Shan, 2013; Haas, 2008).

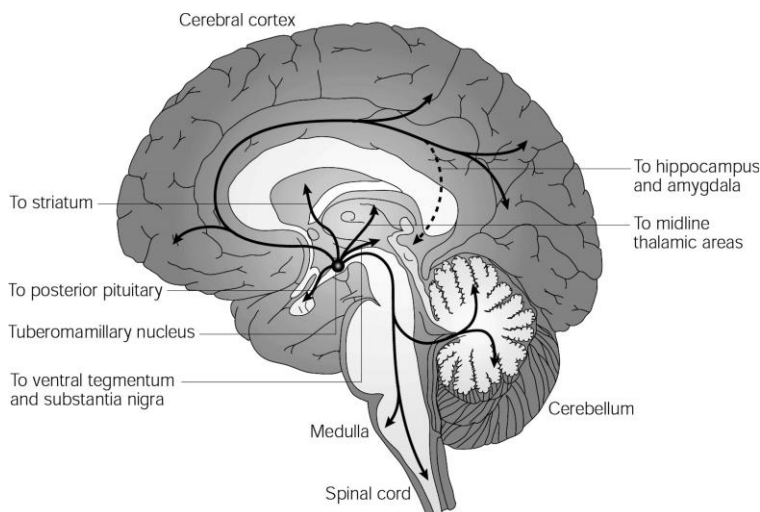


Figura 1: Sistema histaminérgico en el SNC; desde el núcleo tuberomamilar (TMN) se proyectan neuronas histaminérgicas a gran parte del cerebro. Haas, 2008

Dentro de las conductas naturales del roedor, está la exploración hacia cosas novedosas (Bevins, 2005), lo cual requiere un alto nivel de alerta para su normal desarrollo, para esto es importante la contribución de las neuronas histaminérgicas (Valdés, 2010). Se ha observado que la actividad exploratoria se altera si falta la enzima sintetizadora o el receptor H1, H2 o H3 (Da Silveira, 2013; Schneider, 2014), igualmente se ha descrito que el *rearing*, que es una expresión de una conducta exploratoria, se ve alterada en ratones mutantes (Knock Out, K.O.) para el receptor H1 (Zlomuzica, 2008), indicando la importancia de la histamina en el alerta inducido por novedad para desarrollar conductas motivadas, (Valdés, 2010). A nivel de pruebas conductuales se ha evidenciado la importancia de la histamina en el aprendizaje y la memoria. Ratas K.O. del receptor H1 presentaban alteraciones en este nivel cognitivo, sin alteración para explorar objetos nuevos, pero si en reconocerlos, a la vez que presentaban alteración en la memoria de orden temporal, (Zlomuzica, 2008; Zlomuzica, 2013).

En suma, la AP induce: i) alteraciones morfo-funcionales en el hipocampo (Morales, 2010), ii) déficits en pruebas cognitivas como en la prueba de reconocimiento de objetos (Simola, 2008), y en la memoria espacial (Galeano, 2011), que es dependiente de hipocampo (Broadbent, 2009; Gareth, 2011) y iii) disminución en el número y activación de neuronas histaminérgicas (Flores-Balter, 2016), la cual tiene alta influencia sobre los procesos de aprendizaje y memoria (Brown, 2001) y específicamente en la memoria de reconocimiento de objetos (Taati y cols, 2014); Así el objetivo de este proyecto fue estudiar el efecto que tiene el ejercicio físico voluntario en ratas con AP en el aprendizaje y memoria, evaluado a través del paradigma de reconocimiento de objetos, mediante la prueba de localización de objetos y su correlato neurofisiológico a nivel de la plasticidad hipocampal (registrado mediante la

expresión de la proteína de citoesqueleto regulada por actividad, Arc); y actividad del sistema histaminérgico (medida a través de la expresión del gen de expresión temprana c-Fos que indica actividad neuronal, y la expresión de Adenosin Deaminasa, ADA, que indica fenotipo histaminérgico)

HIPÓTESIS

El ejercicio físico voluntario, realizado por ratas adultas con asfixia perinatal, mejora el deterioro cognitivo, favorece la actividad y plasticidad hipocampal y aumenta la actividad histaminérgica cerebral en relación a ratas adultas asfícticas sedentarias.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del ejercicio físico voluntario sobre memoria, plasticidad hipocampal y la actividad histaminérgica en ratas con asfixia perinatal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar si el ejercicio físico voluntario en ratas con asfixia perinatal mejora su rendimiento en una tarea de memoria *de localización de objetos*.
- 2.- Determinar que parámetros del ejercicio físico (distancia, velocidad y capacidad física) se correlacionan con el efecto en la mejora cognitiva de las ratas con asfixia perinatal.
- 3.- Determinar si el ejercicio físico voluntario es capaz de aumentar la plasticidad hipocampal, luego de una tarea de reconocimiento de objetos en animales asfícticos, mediante inmunohistoquímica para Arc.
- 4.- Determinar si el ejercicio físico voluntario es capaz de aumentar la actividad histaminérgica cerebral (en el TMN) luego de una tarea de reconocimiento de objetos en animales asfícticos, mediante el uso de doble inmunohistoquímica para el marcador de actividad neuronal c-fos y el marcador de fenotipo neuronal histaminérgico ADA (*Adenosin Deaminasa*).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sujetos: Se utilizaron 36 ratas Wistar adultas macho, con un peso entre 250 y 300g, de las cuales 18 corresponden al grupo sedentario y la otra mitad al grupo en ejercicio. Se utilizaron 6 grupos de ratas en total, (n= 6 ratas por grupo), 3 grupos que realizaron ejercicio: ratas obtenidas por cesárea que sufren de asfixia perinatal, ratas obtenidas por cesárea y ratas obtenidas por parto vaginal (detalles párrafo siguiente); y otros 3 grupos de ratas sedentarias, de igual distribución a las ratas que realizan ejercicio. Todas fueron obtenidas de la estación experimental del Programa de Farmacología molecular y clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales fueron mantenidos en cajas individuales con ciclos de luz/oscuridad 12/12 (ZT: 07:00AM) con agua y alimentación Ad libitum en una pieza temperada a 23°C. Todos los experimentos fueron llevados a cabo según la guía de manejo y experimentación con animales de laboratorio del NIH, (publicación #80-23, revisada 1996) y la aprobación del comité de bioética local de nuestra facultad, (protocolo CBA #0389 FMUCH; protocolo CBA #0722 FMUCH).

2. Modelo de asfixia perinatal

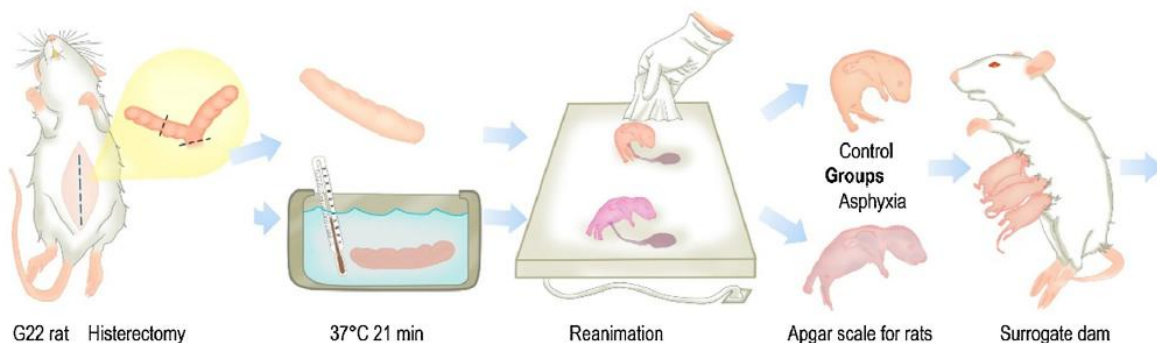


Figura 2: Modelo de asfixia perinatal. Marriot et al. 2015

A ratas Wistar preñadas, en su último día de gestación (día 22), y luego del nacimiento de una o dos crías por vía vaginal, son eutanizadas e histerectomizadas. Dos a tres crías son extraídas de los cuernos uterinos (ratas control cesárea) mientras que el resto de los cuernos del útero que contienen los otros fetos se sumergen en un baño de agua termo-regulado a 37°C por 21 minutos. Después de este periodo de asfixia, se liberan las crías desde los cuernos del útero, se les estimula a respirar, se les liga el cordón umbilical y se les deja recuperar en un cojín temperado. Figura 2.

Cuarenta a sesenta minutos post nacimiento se aplicará a todas las ratas una escala APGAR adaptada para ratas en la cual se evalúan parámetros como el peso corporal, sexo, color de la piel, frecuencia respiratoria y movilidad. La severidad de la asfixia se determina por la tasa de sobrevivencia y recuperación (Morales, 2010; Bustamante, 2007). Posterior a ello se dejan con madres sustitutas para ser utilizadas en la edad adulta.

3. Grupos experimentales

Cuando las ratas alcanzan un peso aproximado de 250-300g se dividen en cuatro grupos experimentales:

1) Ratras sedentarias: este grupo está formado por ratas nacidas por parto vaginal, cesárea y cesárea + asfixia (n=6 cada grupo), y mantenidas en jaulas independientes con agua y comida ad libitum sin ejercicio. Previo a realizar la prueba conductual se les aplicó una prueba de ejercicio realizada en una trotadora (descrita en aparatos y procedimientos), en los dos días siguientes se realizó la habituación al ambiente de la prueba de reconocimiento de objetos (día 2 y 3). Al cuarto día se expusieron a la familiarización y aplicación de una prueba de retención a los 60 minutos; 24 horas después se realizó una segunda prueba de retención, y una hora posterior a esto, se procedió con la eutanasia del animal para realizar los procedimientos

asociados a la histología e inmunohistoquímica, (5 días en total). En la figura 3 se puede observar un flujograma de los procedimientos descritos.

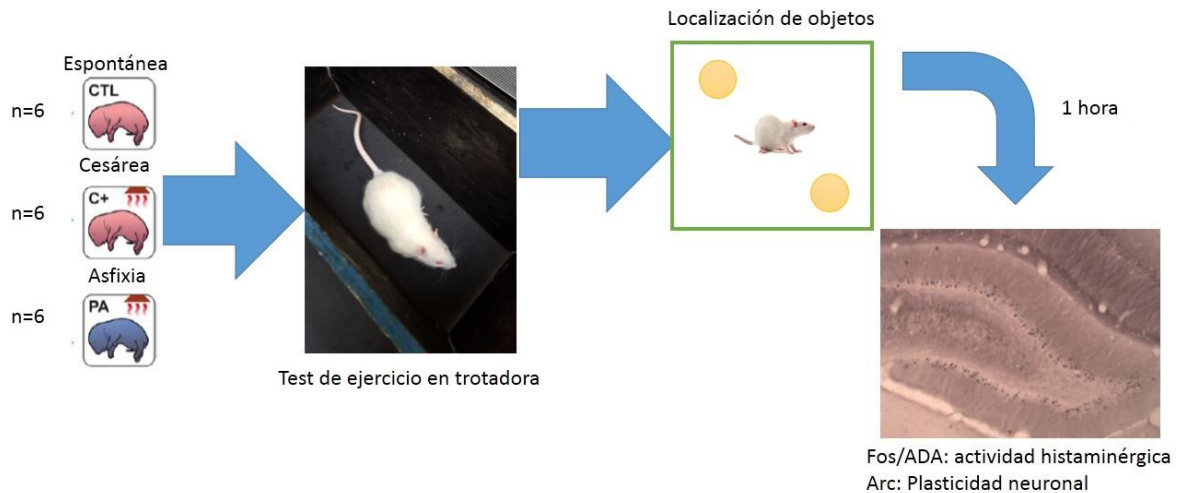


Figura 3: Flujograma de los procedimientos experimentales aplicados al grupo de ratas sedentarias.

Ratas en ejercicio: este grupo está formado por ratas nacidas por parto vaginal, cesárea y cesárea + asfixia (n=6 cada grupo). El primer día se les realizó una prueba de ejercicio (descrita en aparatos y procedimientos), a partir del día 2 se les mantuvo en su jaula con acceso a rueda por 21 días (hasta día 22), para que realizaran ejercicio voluntario. Al día 21 se les aplicó nuevamente la prueba de ejercicio para poder registrar los efectos del ejercicio voluntario en la capacidad física. Los días 24 y 25 se realizó la habituación al ambiente de la prueba de reconocimiento de objetos, y el día 26 se realizó la familiarización y la prueba de retención a los 60 minutos. El día 27 (24 horas después), se realizó nuevamente una prueba de retención y una hora después la eutanización del animal, para proceder con la histología. Veintisiete días en total durante los cuales no se privó a las ratas del acceso a la rueda, para evitar factores ansiogénicos u otras variables no deseadas. La figura 4 muestra el orden temporal de los procedimientos antes descritos.

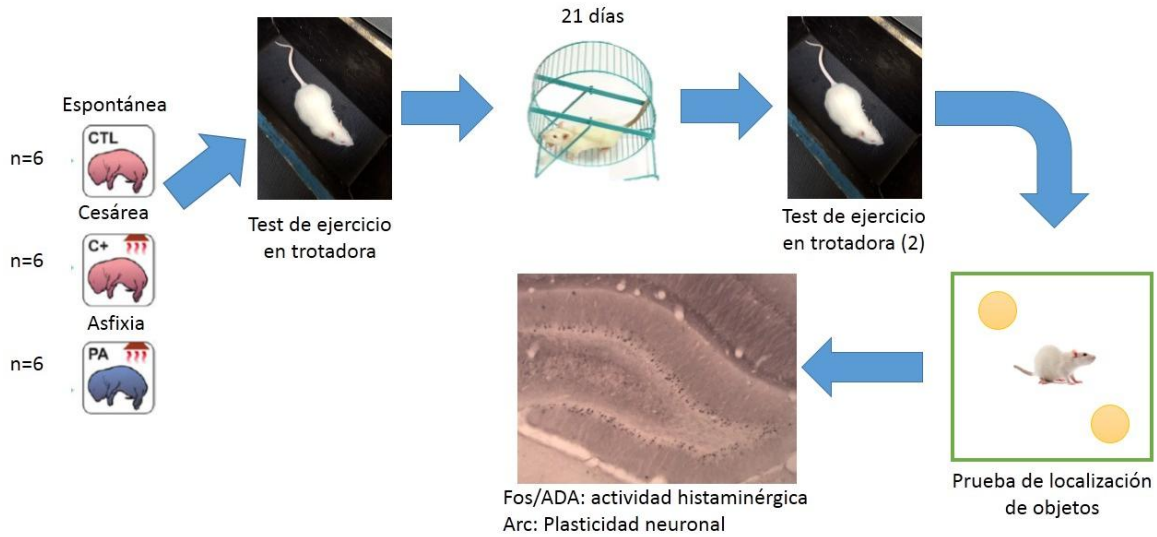


Figura 4: Diagrama de flujo de los procedimientos experimentales aplicados al grupo de ratas en ejercicio.

4. Aparatos y procedimientos:

Caja de mantención y ejercicio: Se construyó una jaula de mantención habilitada con una rueda de 28cm de diámetro (0,8796m de perímetro) para la mantención de las ratas que realizan ejercicio. Para poder determinar la distancia recorrida, la velocidad alcanzada y la temporalidad del ejercicio, se construyó un sensor electromagnético, el cual entregó los datos antes mencionados para su posterior análisis. Las ratas tuvieron acceso a la rueda desde el inicio del experimento hasta la eutanización. Las ratas sedentarias se mantuvieron en cajas de mantención estándar sin rueda.

Sensor electromagnético: Se confeccionó un circuito utilizando un sensor de efecto hall, el cual produce una corriente al detectar un campo magnético. Este sensor se ubicó adyacente a un imán dispuesto en la rueda de ejercicio, de manera que al girar la rueda, este sensor detectara el campo magnético producido por el imán. El circuito fue conectado a una placa de Arduino™, en el cual se programó una interfaz que detectó estos cambios de corriente generados por el sensor, y les estableció temporalidad (fecha y hora). La placa de Arduino™

se conectó hasta a 4 jaulas con ruedas, cada una con el circuito anteriormente descrito. Los datos obtenidos por Arduino™ fueron exportados por Phyton™ a un archivo de texto, en el cual se expresaba la identificación de la rata, en qué jaula corrió, la temporalidad de las vueltas, y una estimación de la distancia total recorrida.

Protocolo de ejercicio: Las ratas de los grupos que realizaron ejercicio tuvieron libre acceso a la rueda, por lo que pudieron realizar ejercicio de forma voluntaria, desde el inicio del experimento hasta el final de este (eutanización del animal). Este tiempo de ejercicio (21 días), ha demostrado ser suficiente para obtener aumentos cognitivos significativos en animales sedentarios (Radahmadi y cols, 2015; Wang y Wang, 2016)).

Prueba de reconocimiento de objetos:

Se realizó la prueba de localización de objetos (figura 5), para poder evaluar memoria espacial dependiente de hipocampo (Gareth y Warburton. 2011). Para esto se utilizó una caja negra cuadrada de 60x60x60 cm, con un piso de color negro. En ella se ubicaron 2 objetos idénticos, y posteriormente uno de ellos cambió de posición durante la etapa de prueba (60 minutos o 24 horas). Los animales cursaron 3 etapas, una de habituación, una de familiarización y finalmente se les aplicó un ensayo de retención. Las pruebas de la conducta del animal fueron registrados con una cámara digital, ubicada en posición cenital.

Habituación: consistió en permitirle a la rata explorar libremente la arena en la cual se realizaría la prueba, en ausencia de objetos u otro estímulo que pueda ser relevante, por 20 minutos durante 2 días consecutivos, para evitar conductas de tipo ansiogénicas producidas por la exposición a un ambiente desconocido (Da Silveira, 2013).

Familiarización: consistió en exponer a la rata a un ensayo en el cual se les permitió explorar el ambiente con dos objetos iguales ubicados en forma adyacente, cada uno a 10 cm del borde



Figura 5: familiarización y test en Object location task, Barker, 2011

de la arena por un periodo de 5 minutos.

Prueba de retención: consistió en exponer a la rata a la arena en la cual se cambia la posición de uno de los objetos, de manera tal que queden en las esquinas opuestas de la arena. Esta prueba se realiza una hora y 24 horas posteriores a la familiarización. De esta manera los dos objetos serán igualmente familiares, pero uno se encuentra en una nueva localización. La posición del objeto movido fue balanceada entre las ratas. Se registró el tiempo y número de veces que el animal exploró el objeto en la nueva posición. Se cuenta con un set de objetos en duplicado y entre cada ensayo y la prueba de reconocimiento fueron limpiados con alcohol al 70% para evitar claves olfatorias (Griffin, 2009)

Prueba de ejercicio:

Se aplicó una prueba de ejercicio en una trotadora, para poder registrar la capacidad física inicial del animal y los cambios en la misma luego de 21 días de actividad física voluntaria. Para medir la capacidad física la velocidad de la trotadora fue aumentando cada minuto con el fin de obtener la velocidad máxima que puede alcanzar el animal. Se construyó

una caja de 15cm de ancho, 40cm de largo y 25cm de alto, que fue ubicada sobre la trotadora de manera tal que la rata pudiese correr y la caja se mantuviera en una posición estable. Esta prueba se realizó antes del acceso a rueda (o al inicio de todos los procedimientos en los grupos sedentarios) y después de la práctica voluntaria de 21 días de ejercicio con el objeto de evaluar cambios en la capacidad física del animal. Para esto se ubicó a la rata sobre la trotadora, en la caja diseñada y se le permitió explorarla por 5 minutos. Luego se activó la trotadora a una velocidad inicial de 0.8km/h y se incrementó la velocidad en una razón de 0.1km/h cada minuto, hasta encontrar la velocidad en cual el animal no pudiera seguir caminando a causa de la velocidad, o presentase claudicaciones (velocidad máxima alcanzada). Los datos aquí obtenidos se utilizaron para obtener información acerca de la capacidad de hacer ejercicio en forma basal por el animal (velocidad máxima alcanzada), y buscaban establecer algún tipo de correlación con la velocidad alcanzada en la rueda de ejercicio. Las pruebas de ejercicios máximos y submáximos son seguros y bien tolerados, y son una medida simple de capacidad funcional (Rodríguez, 2007).

5. Histología

Una hora posterior a la finalización de la prueba de localización de objetos, las ratas fueron anestesiadas profundamente con hidrato de cloral al 7% (350mg/Kg, i.p., 100µl/100grs de peso) y luego perfundidas transcardialmente a través del ventrículo izquierdo con solución salina (NaCl 0.9%, 200mL) seguido de paraformaldehído al 4% en *buffer* fosfato (0.1M, pH 7.4, 500 mL). Posteriormente los cerebros fueron removidos y postfijados por dos horas en la solución de fijación y luego criopreservados en una solución de sacarosa al 30% con un 0.02% de azida de sodio en *buffer* fosfato salino (PBS) hasta que estuviesen impregnados

completamente para realizar cortes coronales de 50 μ m en un micrótopo de congelación (Thermo, Microm).

6. Inmunohistoquímica

Con el fin de medir plasticidad neuronal se utilizó un anticuerpo anti Arc, este es un gen de expresión temprana (IEG) ampliamente utilizado como marcador de plasticidad neuronal (Clark, 2001). Este fenómeno, (la plasticidad), depende de la activación de los canales de NMDA, lo cual induce la transcripción del mRNA de Arc (Link, 1995; Waltereit, et al. 2001), el cual se traslada a las dendritas donde se acumula y traduce (Bramham, 2010). Además la expresión de Arc juega un rol crítico en la fase de mantención de la LTP y consolidación de memorias a largo plazo (Plath y Ohana. 2009; Guzowski, 2000).

Para medir la actividad de la neuronas histaminérgicas se realizó una doble inmunohistoquímica para expresión del marcador de fenotipo histaminérgico Adenosin Deaminasa (ADA) y un marcador de actividad neuronal c-Fos, este último corresponde a un gen de expresión temprana, el cual se expresa en las neuronas luego de una despolarización sostenida de la membrana, debido a un aumento del calcio intracelular y/o un aumento en los niveles de cAMP. (Harris, 1998; Morgan, 1991; Sheng, 1990). En cuanto al uso de ADA, se ha demostrado que las neuronas histaminérgicas, junto con expresar la enzima histidina-decarboxilasa (HDC, la cual sintetiza la histamina), co-expresan ADA. Basado en que casi todas las neuronas que expresan HDC, también expresan ADA, es válido utilizar este marcador para fenotipo histaminérgico (Flores-Balter, 2016; Senba, 1985).

Se obtuvieron tres series de cortes coronales de cerebro de 50 μ m, de las cuales dos se utilizaron para inmunohistoquímica, y la restante se reservó en caso de tener errores en los procedimientos de IHQ y la realización de la tinción de Nissl (Cresil violeta).

Los cortes flotantes fueron incubados en H₂O₂ al 0.3% por 30min, luego lavados en PBS y transferidos a una solución de bloqueo (0.4% Triton X-100, 0.02% de azida de sodio y 3% de suero normal de cabra en PBS) por una hora. Luego fueron incubados con anticuerpo policlonal para Arc (Synaptic Systems, Goettingen, Germany,, diluido 1:5000 en la solución de bloqueo por toda una noche a temperatura ambiente. Aquellos cortes seleccionados para doble IHQ para c-Fos y ADA (del TMN), se incubaron con el anticuerpo primario de Fos (anticuerpo policlonal de conejo anti-fos, Ab-5, Oncogene, San Diego, CA, diluido en una razón de 1:20,000) en la solución de bloqueo durante toda la noche a temperatura ambiente. Los cortes fueron lavados en PBS por 1 hora antes de ser incubados con el anticuerpo secundario, [Biotin-SP-conjugated Affinipure goat antirabbit IgG (H+L) de Jackson ImmunoResearch, PA, USA] diluido 1:1000 en 0.4% Triton X-100 y en suero normal de cabra al 1,5% en PBS. Luego del lavado con PBS por 40 minutos, los cortes fueron incubados por 1h en el kit Vectastain ABC Elite (Laboratorios Vector, CA, USA, diluido 1:500 en PBS), lavado e incubado en una solución al 0.05% de 3-3' diaminobencidina Hidrocloruro (DAB), la cual contiene 0.003% de H₂O₂ y 0.05% cloruro de níquel para generar una reacción cuyo producto sea azul oscuro. Los cortes seleccionados del TMN c-Fos⁺, fueron sometidos a una segunda inmunohistoquímica para identificar neuronas histaminérgicas ADA-ir. Esta se realizó luego de completado el proceso anteriormente descrito y después de un lavado durante toda una noche en PBS con azida de sodio al 0.02%. Luego se repitió el proceso anterior pero esta vez usando como anticuerpo primario uno contra ADA y luego revelando con DAB sin (intensificación de níquel), de esta manera se obtuvo un precipitado citoplasmático de color café que contrastará con el precipitado de localización nuclear y de color azul oscuro para Fos (intensificación con Níquel). El anticuerpo que se utilizó fue anti ADA (Policlonal, hecho en conejo, diluido en 1:10000, de Chemicon, CA, USA)

7. Cuantificación de la expresión c-fos, Arc, ADA-fos:

Se midió la inmunoreactividad del TMN y del hipocampo a través de la contabilización de neuronas inmunoreactivas (c-Fos, Arc, ADA), bilateralmente, en 3 cortes coronales de cada estructura por rata. Se contaron las neuronas Arc⁺ en hipocampo (Bregma -2,4mm; -2,92mm y -3,36mm) y las neuronas doblemente marcadas para c-fos y ADA a través de 3 cortes consecutivos del núcleo túberomamilar (Bregma -3,72mm; -3,84mm y -3,96mm). Se utilizaron microfotografías y se contaron las neuronas con el software ImageJ (NIH, Bethesda; MD, USA), a la vez que se estableció la densidad neuronal del hipocampo determinando el área de la capa granular del giro dentado en cada corte, y la densidad del TMN sobre una grilla de 0,125mm² (Flores-Balter, 2016)

RESULTADOS

Efecto del ejercicio físico sobre el rendimiento en una tarea de memoria (Prueba de localización de objetos)

Se analizó el efecto del ejercicio voluntario en el rendimiento de la prueba de localización de objetos, expresado como el porcentaje de tiempo de exploración del objeto que cambia de posición (O2) respecto al tiempo total de exploración de los objetos. Al comparar el rendimiento 60 minutos luego de la familiarización entre los grupos sedentario y ejercicio, como se observa en la Figura 6 (grupos espontáneo, cesárea y AP), no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos (AP $p=0,256$; Cesárea $p=0,671$ y espontánea $p=0,407$ en t de student). Al analizar estos mismos grupos 24 horas después de la prueba se observó que el grupo de ratas con AP que realizaron ejercicio evidenciaron mejoras en su desempeño en relación a su contraparte sedentaria, ($p=0,039$ en t de student), no se encontraron diferencias en los grupos espontáneo y cesárea ($p=0,244$ y $p=0,076$ respectivamente en t de student; ver Figura 6).

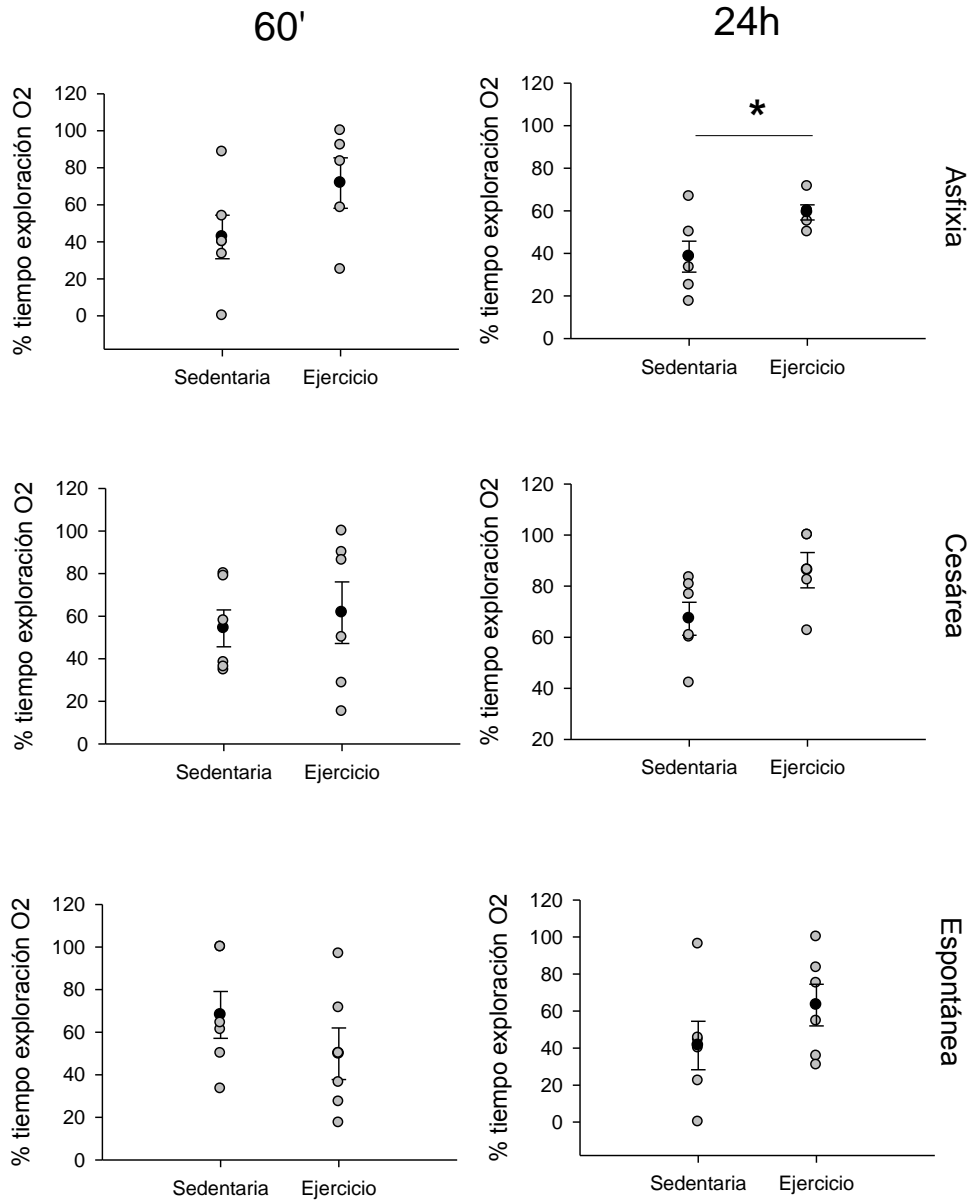


Figura 6: Porcentaje de tiempo de exploración en la prueba de localización de objeto en la condición sedentaria y en ejercicio de los grupos asfixia (n=6 sedentario, 5 ejercicio), cesárea (n=6) y espontáneo (n=6) 1h (columna izquierda) y 24h (columna derecha) posterior a la familiarización. Los puntos grises muestran la distribución de los datos, el punto negro muestra el promedio \pm el error estándar. * $p < 0,05$ Prueba t-Student

Al comparar el porcentaje de tiempo de exploración de un objeto en una nueva ubicación a las 24h de los grupos sedentarios (Figura 7A) o de los grupos en ejercicio (figura 7B) no se observaron diferencias significativas ($p=0,09$ y $p=0,752$ respectivamente, ANOVA de una vía).

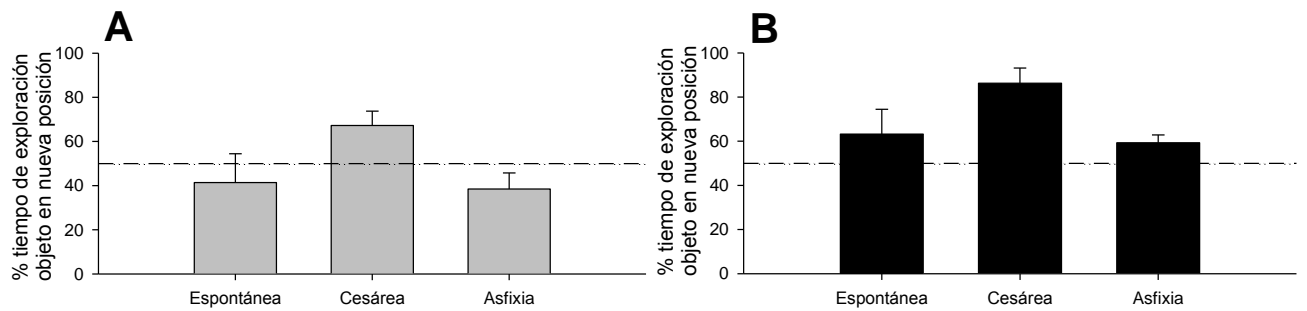


Figura 7: Porcentaje de tiempo de exploración en la prueba de localización de objetos en la condición sedentaria (A) y en ejercicio (B) de los grupos asfixia (n=6 sedentario, 5 ejercicio), cesárea (n=6) y espontáneo(n=6) 24 horas posteriores a la familiarización a la prueba. La línea punteada marca el 50% del tiempo de exploración. Los datos se ilustran como el promedio \pm el error estándar. ANOVA de una vía.

Debido al antecedente de que las ratas con AP tienen un peor desempeño que las ratas nacidas por cesárea, en cuanto a memoria espacial, (Galeano, 2011), en el laberinto acuático de Morris, se realizó una comparación sólo entre estos dos grupos para determinar si se encontraba la misma diferencia, considerando también que es una prueba distinta, localización de objetos. Al realizar dicha comparación a las 24 horas luego de la prueba de familiarización de la prueba de reconocimiento de objetos, entre el grupo AP y cesárea en condición sedentaria se encuentra que el segundo tiene mejor rendimiento ($p=0,026$ en prueba de Mann-Whitney). Al realizar este mismo análisis en los grupos AP y cesárea en ejercicio, se encuentra también una mejor memoria de las ratas nacidas por cesárea, ($p=0,016$), como se puede observar en la figura 8.

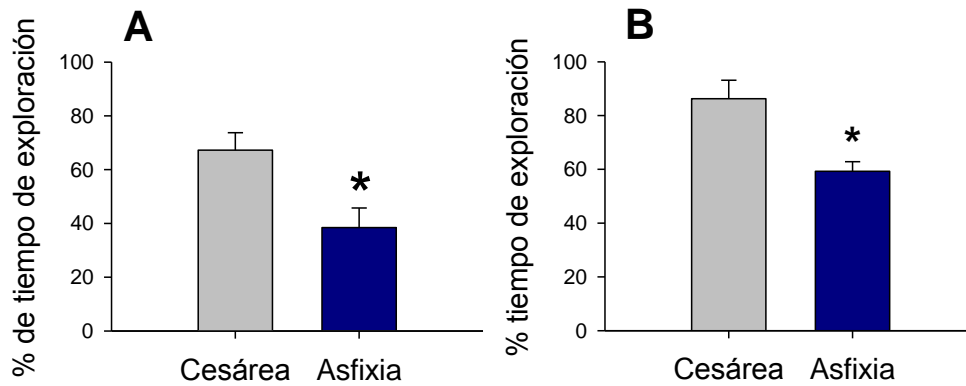


Figura 8: Porcentaje de tiempo de exploración en la prueba de localización de objetos a las 24 en la condición sedentaria (A) y en ejercicio (B) de los grupos asfixia (n=6 sedentario, 5 ejercicio) y cesárea (n=6). *p<0,05 en prueba de Mann-Whitney

Parámetros de ejercicio

Se analizaron los siguientes parámetros de ejercicio: velocidad máxima alcanzada (vam) en una trotadora acondicionada (antes y después de los 21 días de ejercicio), velocidad en rueda, distancia total recorrida y distancia diaria promedio, como indicador de mejora en la capacidad de ejercicio de los distintos grupos de animales.

No se encontraron diferencias en los diferentes grupos en la velocidad alcanzada en la prueba de ejercicio al comparar el valor inicial (vam1), con el valor obtenido luego de 21 días (vam2) de acceso a rueda (p=0,396 ANOVA de dos vías, figura 9). Tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la velocidad promedio registrada en la rueda entre los diferentes grupos (p=0,26 en ANOVA de rangos), con velocidad promedio del grupo AP 2,64km/h y 2,66km/h en el grupo cesárea. El grupo espontáneo registró un promedio de 3,2km/h, sin embargo este resultado se debe interpretar con precaución, debido al n=2 de este grupo en esta variable, que fue menor que el resto de los grupos debido a problemas técnicos con el registro de velocidades.

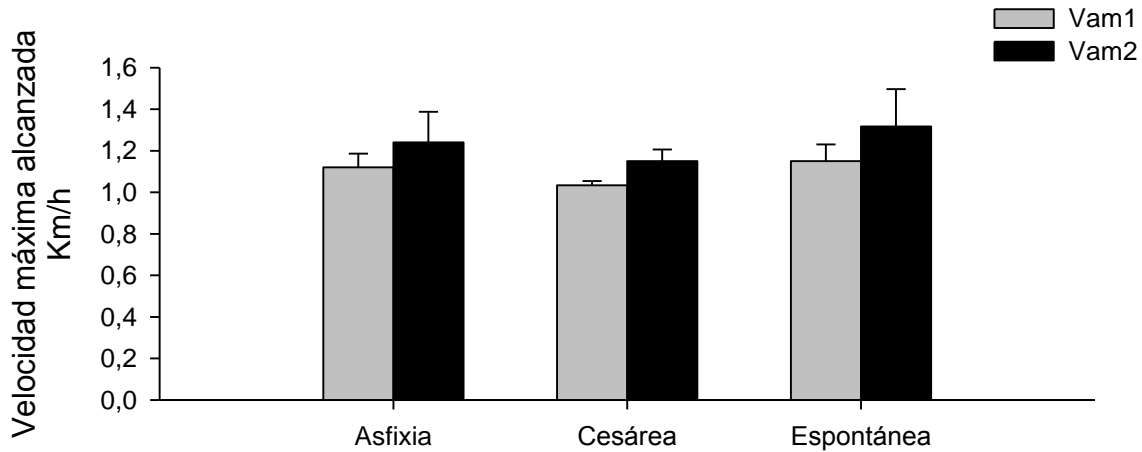


Figura 9: Prueba de ejercicio. Se ilustra la velocidad máxima alcanzada (vam) por las ratas previo al acceso a rueda (velocidad en trotadora), (vam1, las barras grises) y posterior a 21 días ejercicio (vam2, barras negras) en las condiciones de asfixia (n=5), control cesárea (n=6). Control espontáneo (n=6) \pm error estándar. ANOVA de dos vías

Ya que la variación entre la velocidad inicial alcanzada en la trotadora, y el registro obtenido luego de 21 días de ejercicio, y que la velocidad promedio no tuvo variación entre los diferentes grupos en ejercicio. Se analizó la variación de la velocidad promedio registrada en la rueda al comparar los primeros 3 días con los últimos 3 días en las diferentes condiciones de ejercicio, como se expresa en la figura 10. Las ratas asfícticas corrieron a velocidades menores en relación al grupo cesárea al inicio de los 21 días de ejercicio ($p < 0,05$ en ANOVA de dos vías, post hoc método de Holm-Sidak). Producto del ejercicio, las ratas asfícticas aumentaron su velocidad promedio en la cual corrieron en la rueda, al comparar inicio (primeros 3 días), con el final del período de ejercicio (últimos 3 días; $p < 0,05$ en ANOVA de dos vías. Post hoc método de Holm-Sidak).

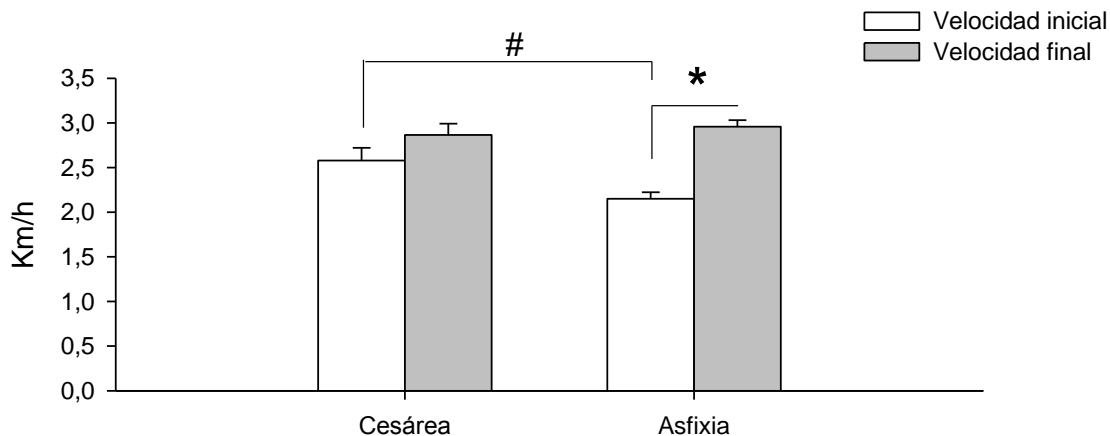


Figura 10: comparación entre la velocidad promedio alcanzada por las ratas en la rueda de ejercicio. Primeros 3 días versus últimos 3 días. * $p < 0,05$ (comparación velocidad inicial vs final en misma condición de nacimiento), # $p < 0,05$ (comparación velocidad promedio inicial entre diferentes condiciones de nacimiento). ANOVA de dos vías, post hoc método de Holm-Sidak. (Grupo cesárea $n=4$; grupo asfixia $n=5$)

En cuanto a la distancia total recorrida registrada durante 21 días, no se encontraron diferencias entre el grupo cesárea o asfixia ($p=0,067$ en t de student). Si en cambio, se analiza la distancia promedio recorrida diariamente (ver figura 11 A), las ratas asfícticas corrieron en promedio cada día, distancias mucho mayores que el grupo control cesárea, ($p < 0,001$ ANOVA de dos vías), los datos obtenidos del grupo espontáneo en cuanto a distancia no se presentan, ya que es un n muy pequeño ($n=2$), no permitiendo mayores análisis. La variación de la distancia promedio recorrida diariamente entre el grupo asfíctico y control cesárea se observa en la figura 11 B, encontrando que el grupo asfixia corrió distancias mayores específicamente en los días 15 a 20, dentro del período de ejercicio, en relación al grupo cesárea ($p < 0,05$ en ANOVA de dos vías, post hoc método de Holm-Sidak).

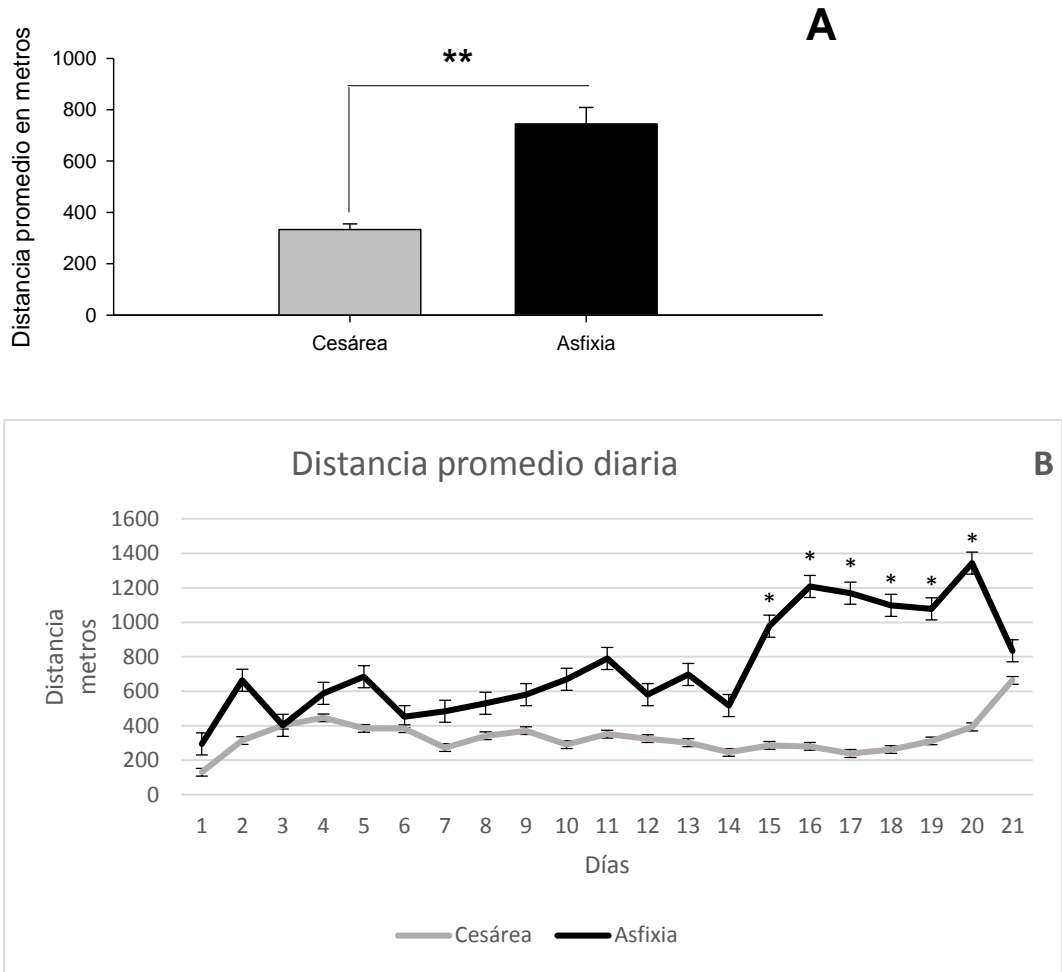


Figura 11: A Distancia promedio recorrida diariamente en la rueda de ejercicio de los grupos asfixia (n=5) y control cesárea (n=6). *p<0,05; **p<0,001 ANOVA de dos vías, post hoc método de Holm-Sidak. **B Distribución** diaria de la distancia recorrida en promedio de los grupos asfixia (n=5, línea negra) y control cesárea (n=6, línea gris).

Efecto del ejercicio sobre la plasticidad neuronal hipocampal

Con el fin de estudiar el correlato neuroanatómico funcional de nuestros estudios conductuales se analizó la densidad de neuronas inmunoreactivas para Arc (proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad) en el hipocampo, como marcador de plasticidad.

Al analizar las neuronas inmunoreactivas para Arc en el hipocampo, se encontró que estas se encontraban fundamentalmente en la capa granular del giro dentado, por lo tanto se compararon los diferentes grupos en base al promedio de la densidad de neuronas inmunoreactivas para Arc (ir-Arc) normalizado por unidad de área, (ARC/mm²) en esta estructura. Al realizar un ANOVA de dos vías, para relacionar ejercicio y la condición de nacimiento (cesárea, AP y espontánea) respecto a la densidad de neuronas inmunoreactivas a Arc, se encontró que el régimen de ejercicio aumenta la expresión de Arc, ($p=0,028$ en ANOVA de dos vías). Al comparar los diferentes subgrupos en base a su condición de ejercicio, se encontró sólo en el grupo de ratas asfícticas en ejercicio una mayor densidad de neuronas ir-Arc que en su control sedentario ($p<0,05$ en ANOVA de dos vías, post hoc método de Holm-Sidak) (Figura 12 A y B). No existen diferencias al comparar todos los grupos sedentarios entre sí, ni al realizar esta misma comparación entre todos los grupos en ejercicio, y esta variación observada en las ratas asfícticas es significativa tanto en la banda suprapiramidal como infrapiramidal ($p<0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak. Figura 13)

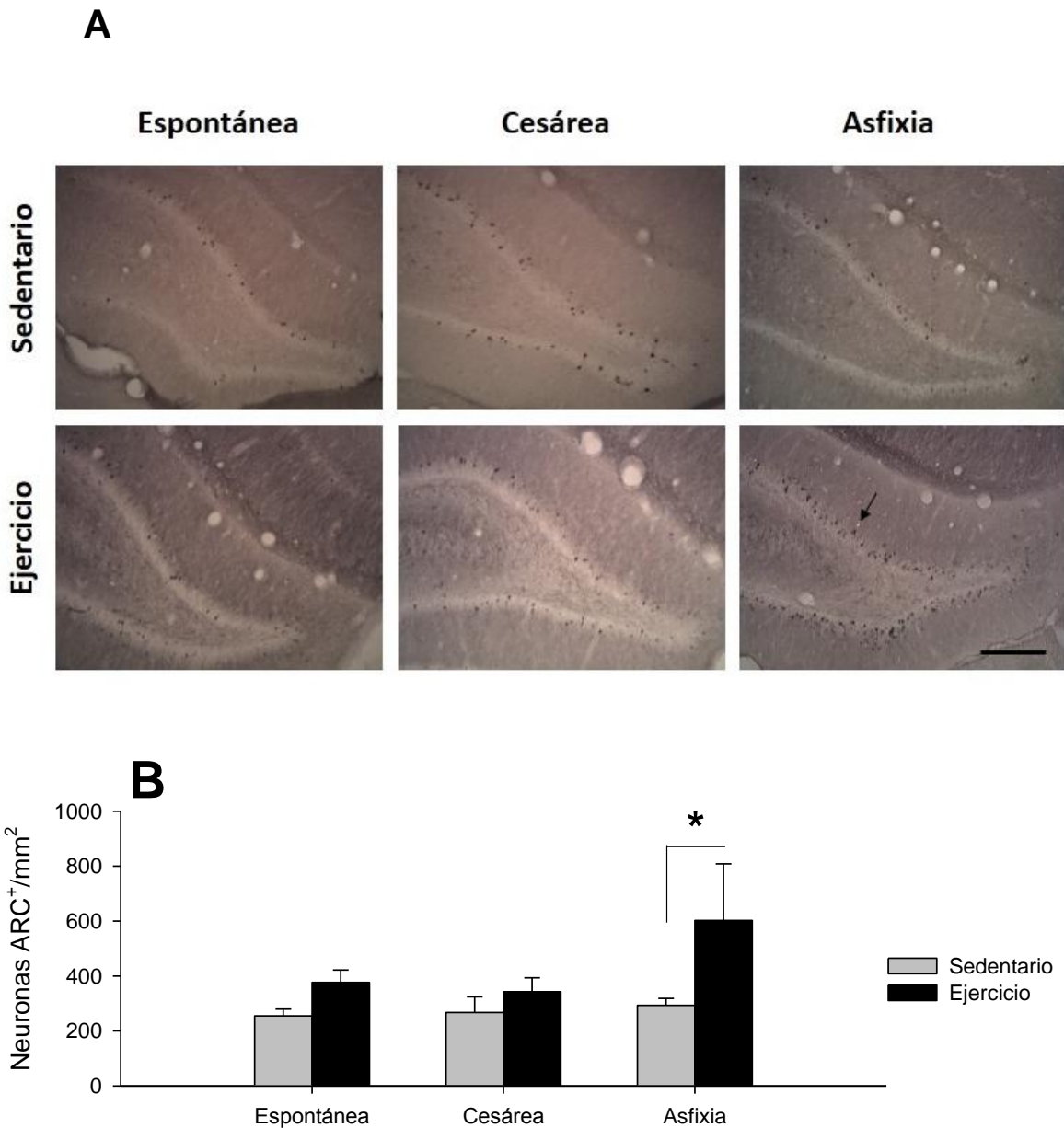


Figura 12: **A.** Microfotografías del giro dentado de ratas en la condición sedentaria (panel izquierdo) y con ejercicio (panel derecho) de los grupos asfixia (panel superior), control cesárea (panel medio) control espontáneas (panel inferior). Las neuronas Arc⁺ se indican por las flechas negras. Barra de escala 2mm **B.** Análisis densitométrico de las neuronas inmunoreactivas para Arc en el giro dentado en la condición sedentaria (barras grises) y con ejercicio (barras negras) de los grupos asfixia (n=5_{sedentario}, 5_{ejercicio}), control cesárea (n=6) control espontáneas (n=5_{sedentario}, 4_{ejercicio}). Los datos se ilustran como el promedio ±el error estándar, *p<0,05 (comparación sedentario vs ejercicio en subgrupos) ANOVA de dos vías post hoc método de Holm-Sidak.

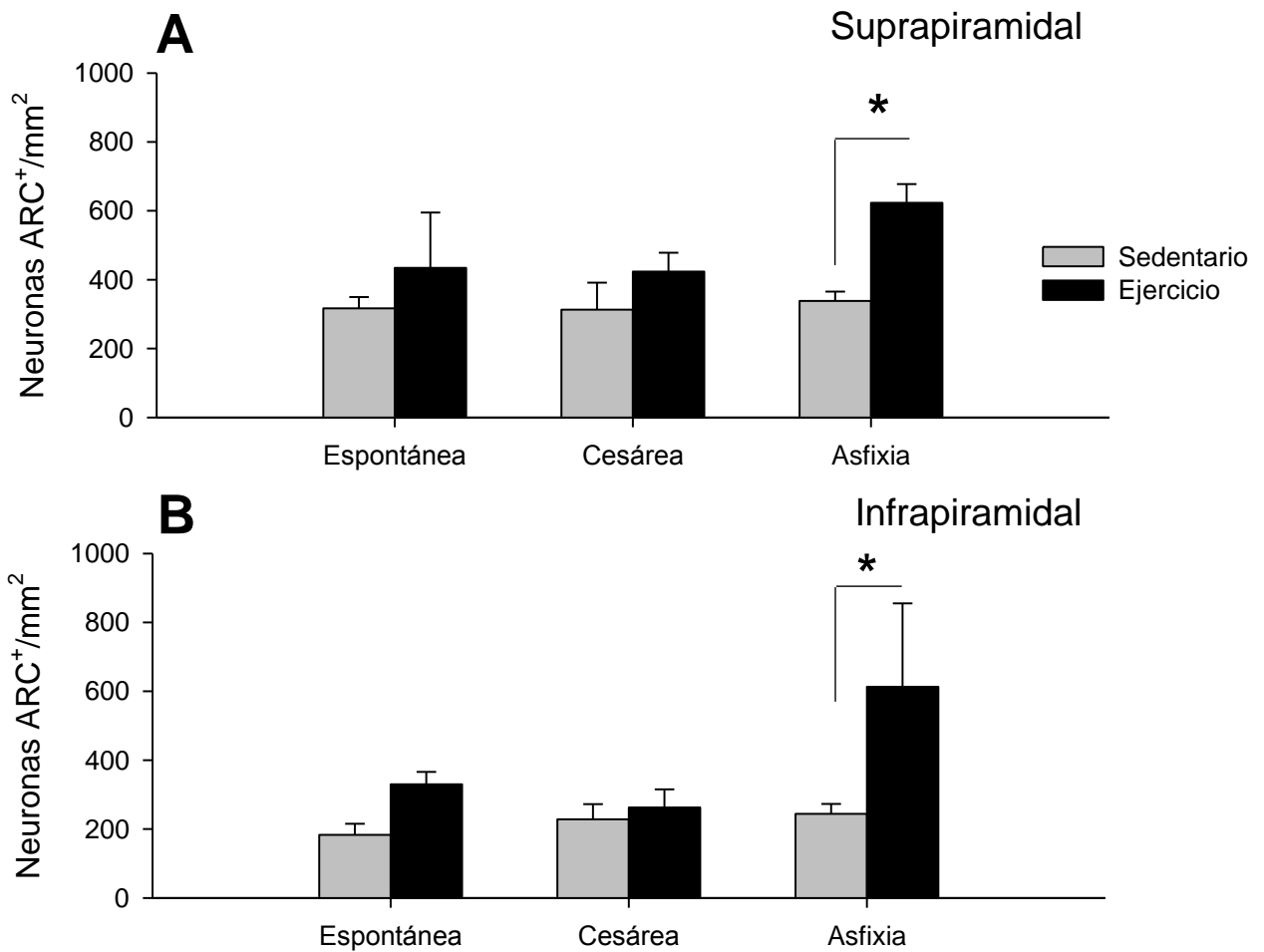


Figura 13: Análisis densitométrico de la distribución de la densidad de neuronas ARC⁺/mm² por banda en el giro dentado. A Banda suprapiramidal. **B** Banda infrapiramidal. Ambos en la condición sedentaria (barras grises) y con ejercicio (barras negras) de los grupos asfixia (n=5_{sedentario}, 5_{ejercicio}), control cesárea (n=6) control espontáneas (n=5_{sedentario}, 4_{ejercicio}). Los datos se ilustran como el promedio ± el error estándar, *p<0,05 (Sedentario vs ejercicio en misma condición de nacimiento). #p<0,05 ANOVA de dos vías (todos los grupos sedentarios vs ejercicio), post hoc método de Holm-Sidak

Efecto del ejercicio sobre la actividad histaminérgica cerebral

Con el objetivo de determinar si el ejercicio físico voluntario modula la actividad histaminérgica cerebral en ratas con asfixia, se analizó la inmunoreactividad de neuronas del núcleo túberomamilar (tanto dorsal (TMND), como ventral (TMNV)) mediante la inspección de 3 cortes coronales secuenciales en el eje anteroposterior de estas estructuras como ha sido descrito previamente (Valdés et al. 2005), obteniéndose el porcentaje de neuronas doblemente inmunoreactivas para c-Fos y ADA (es decir neuronas histaminérgicas que presentaron actividad durante el procedimiento experimental) sobre el total de neuronas con fenotipo histaminérgico (neuronas ir-ADA).

Al comparar el porcentaje de neuronas c-Fos⁺/ADA⁺ en el TMNV entre los grupos que realizaron ejercicio y los sedentarios en las diferentes condiciones estudiadas, se encontró que el hecho de correr produce un aumento sobre el porcentaje de estas neuronas en las diferentes condiciones de nacimiento, como puede apreciarse en la figura 14 B ($p < 0,001$ ANOVA de dos vías) encontrando un aumento significativo en el porcentaje de neuronas doblemente inmunoreactivas para los grupos espontáneo y cesárea con ejercicio ($p < 0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak), comparado con sus respectivos grupos sedentarios. Adicionalmente las ratas asfícticas que hacen ejercicio presentan un menor porcentaje de neuronas doblemente inmunoreactivas al compararlas con el grupo control cesárea o espontáneo en ejercicio ($p < 0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak en cada caso). En el TMND, el hecho de correr también produce un aumento sobre el porcentaje de activación de las neuronas histaminérgicas ($p < 0,001$ en ANOVA de dos vías), lo cual fue significativo entre todos los grupos al comparar condición de ejercicio con sedentario ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak), con un aumento en los grupos controles y una

disminución en el porcentaje de neuronas doblemente inmunoreactivas (c-Fos⁺/ADA⁺) en el grupo asfíctico; figura 15 B. Es también relevante el hecho de que en los grupos en condición sedentaria, el grupo asfíctico presenta un mayor porcentaje de activación de neuronas histaminérgicas ($p < 0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak) al compararlo con el grupo espontáneo o cesárea.

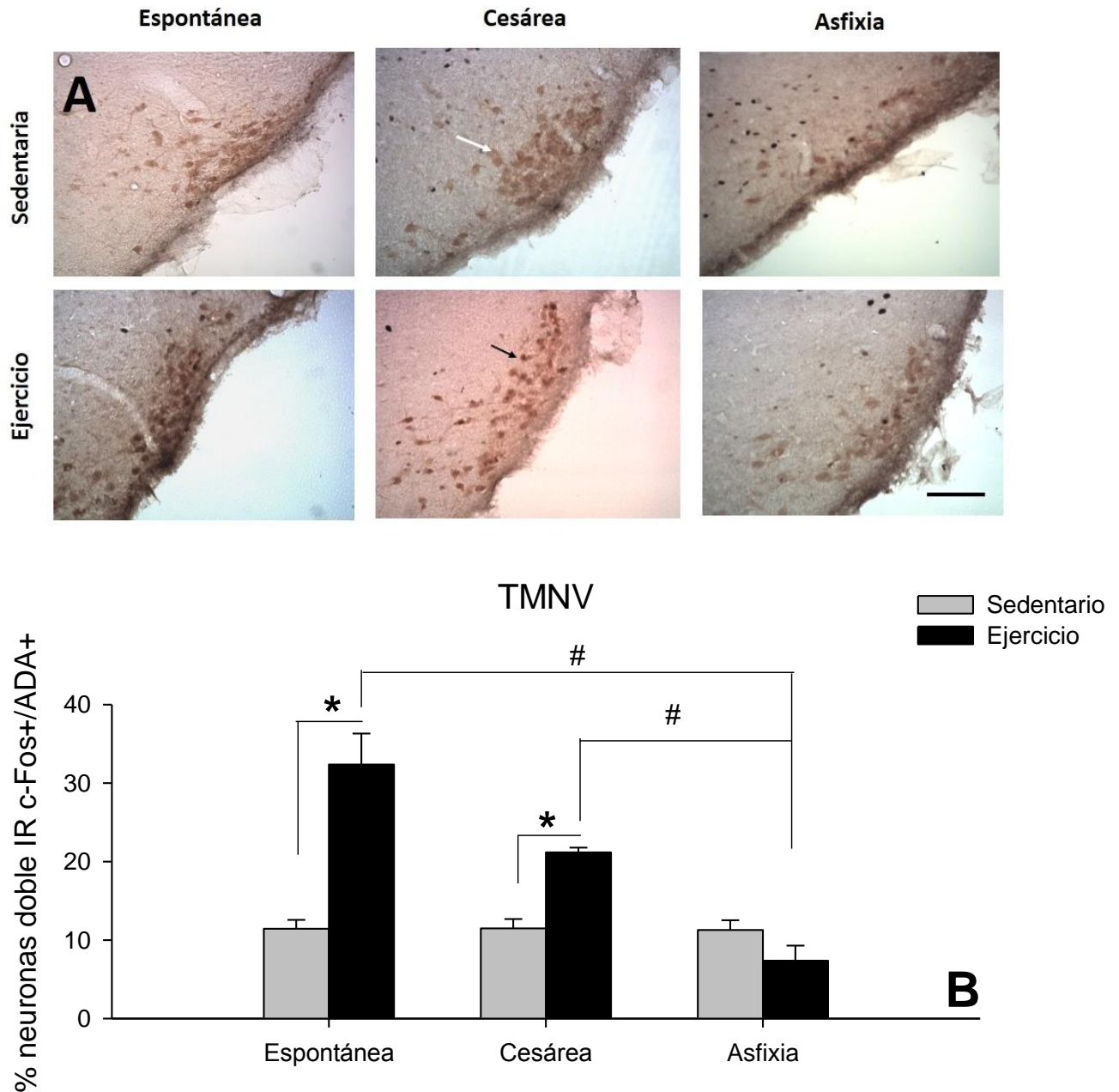


Figura 14: **A** Microfotografías representativas del TMNV tanto de ratas sedentarias (columna izquierda), como en ejercicio (columna derecha) de ratas asfícticas (panel superior), control cesárea (panel medio) y control espontáneo (panel inferior). Las flechas negras indican neuronas ADA⁺, la flecha blanca indica neuronas doble IR, c-Fos/ADA. Barra de escala 100 μ **B** Porcentaje de neuronas doblemente IR para c-Fos y ADA en el TMNV. Promedio obtenido \pm el error estándar tanto en la condición sedentaria (barras grises) como en ejercicio (barras negras). Grupo asfixia (Sedentario: n=4; Ejercicio n=3). Cesárea (Sedentario: n=7; Ejercicio: n=4) Espontáneo (Sedentario: n=5; Ejercicio n= 4). *p<0,05 (sedentario vs ejercicio en misma condición de nacimiento); #p<0,05 (comparación entre grupos en ejercicio) ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak.

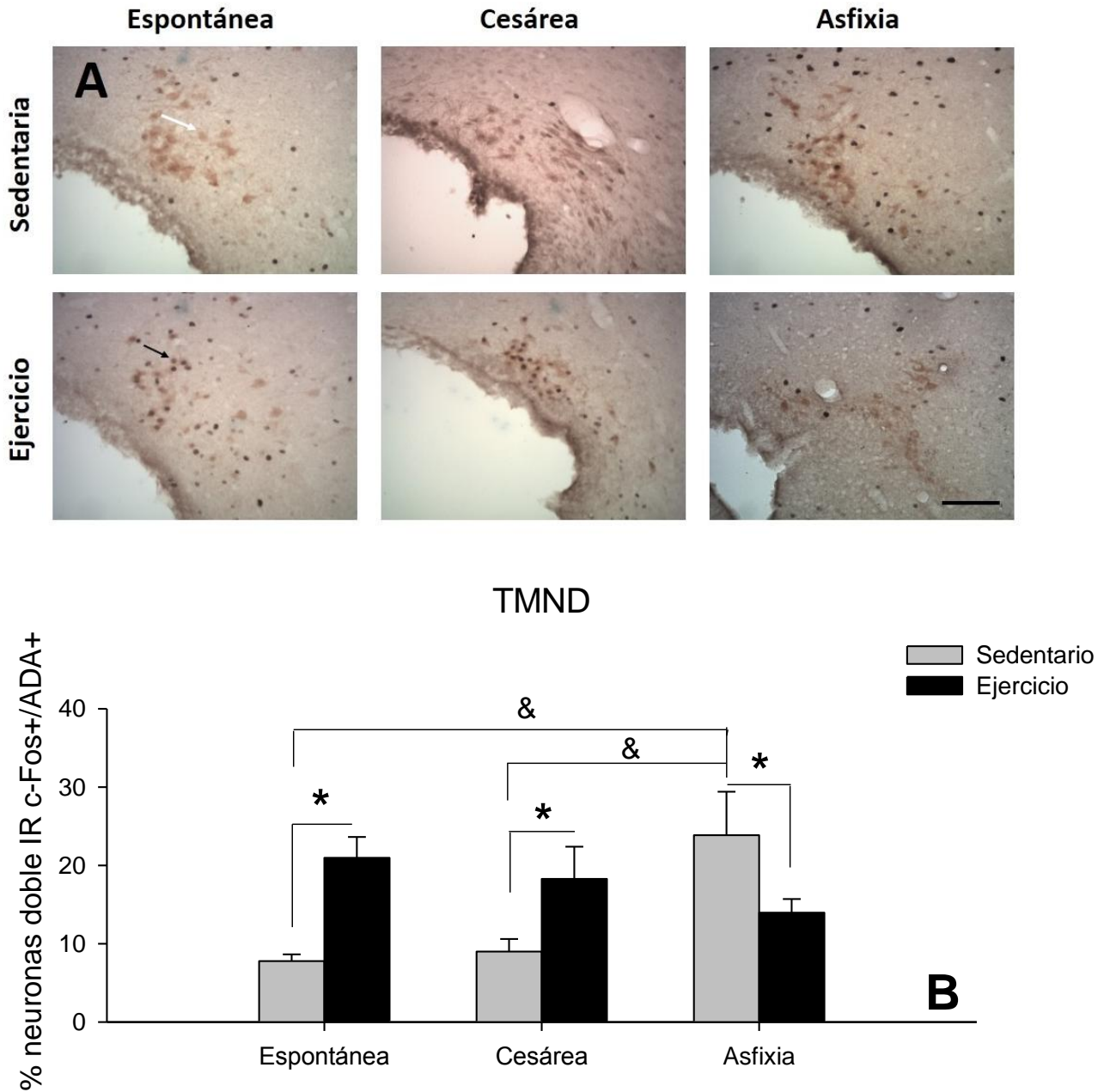


Figura 15: **A** Se ilustran microfotografías representativas del TMND tanto de ratas sedentarias (columna izquierda), como en ejercicio (columna derecha) de ratas asfícticas (panel superior), control cesárea (panel medio) y control espontáneo (panel inferior). La flecha negra representa una neurona ir-ADA, la flecha blanca representa una neurona doble IR, c-Fos⁺/ADA⁺. Barra de escala 100µm. **B** Se ilustra el porcentaje de neuronas doblemente IR para c-Fos y ADA en el TMND. Se ilustra el promedio obtenido ± el error estándar tanto en la condición sedentaria (barras grises) como en ejercicio (barras negras). Grupo asfixia (Sedentario: n= 3; Ejercicio n=4). Cesárea (Sedentario: n=4; Ejercicio: n=3) Espontáneo (Sedentario: n=6; Ejercicio n=4). *p<0,05 (comparación sedentario vs ejercicio en misma condición de nacimiento); &p<0,05 (comparación grupos sedentarios) ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak.

Al analizar la densidad de neuronas histaminérgicas activas en el TMN (número de neuronas doble inmunoreactivas ADA⁺/c-Fos⁺ por milímetro cuadrado), se encontró que la densidad de neuronas doblemente ir- ADA⁺/c-Fos⁺ en el TMNV depende del régimen de ejercicio presente, ($p < 0,001$ en ANOVA de dos vías, post hoc método de Holm-Sidak), encontrando una mayor densidad en el grupo espontáneo ejercicio en relación a su control sedentario, figura 16 A, ($p < 0,05$ en ANOVA de dos vías, post hoc método de Holm-Sidak). Al comparar los grupos en ejercicio, se encontró que el grupo espontáneo presenta una mayor densidad neuronal que el grupo asfixia o cesárea y que el grupo cesárea también presenta una mayor densidad de neuronas doblemente inmunoreactivas en relación al grupo asfixia, ($p < 0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak), no se encontraron diferencias al comparar los diferentes grupos sedentarios. En el TMND se encontró que la densidad de neuronas ADA⁺/c-Fos⁺ aumenta con el ejercicio ($p = 0,014$ en ANOVA de dos vías, post hoc método de Holm-Sidak; figura 16 B), aumentando este parámetro (densidad) en el grupo espontáneo producto del ejercicio respecto a su control sedentario, ($p < 0,05$ en ANOVA de dos vías, post hoc método de Holm-Sidak). Dentro de los grupos sedentarios, fue el grupo asfíctico el que presentó mayor densidad de neuronas ADA⁺/c-Fos⁺ al compararlo con ambos grupos controles ($p < 0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak), no existiendo diferencia entre los grupos en ejercicio.

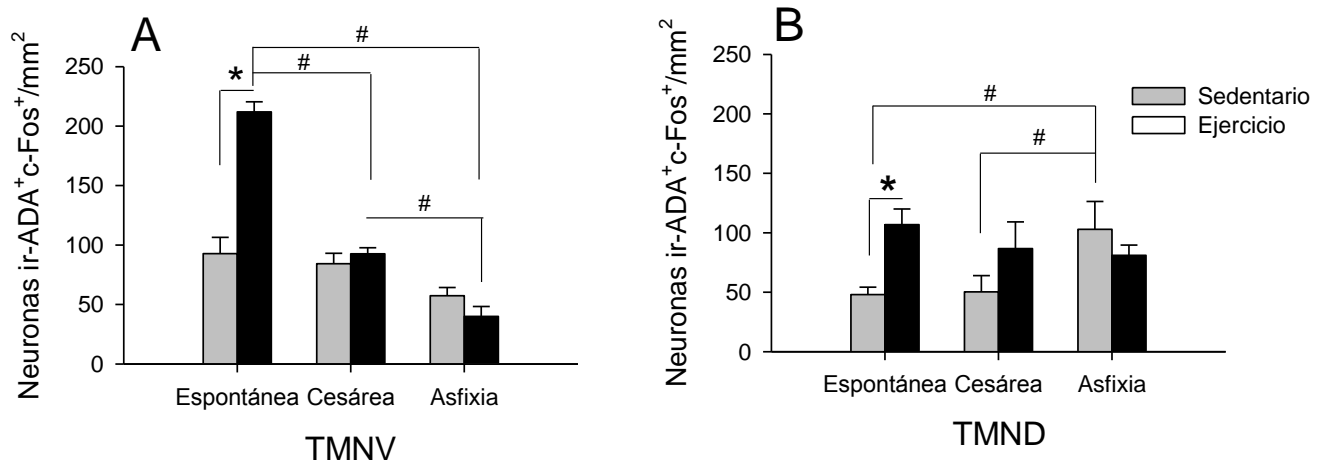


Figura 16: Densidad de neuronas doblemente inmunoreactivas para c-Fos y ADA en el TMN. Los datos se expresan como promedio obtenido \pm el error estándar tanto en la condición sedentaria (barras grises) como en ejercicio (barras negras). **A** TMNV: Grupo asfixia (Sedentario: n=4; Ejercicio n=3). Cesárea (Sedentario: n=7; Ejercicio: n=4) Espontáneo (Sedentario: n=5; Ejercicio n= 4). **B** TMND: Grupo asfixia (Sedentario: n= 3; Ejercicio n=4). Cesárea (Sedentario: n=4; Ejercicio: n=3) Espontáneo (Sedentario: n=6; Ejercicio n=4). * $p < 0,05$ (sedentario vs ejercicio en misma condición de nacimiento); # $p < 0,05$ (comparación entre diferentes condiciones de nacimiento bajo el mismo régimen de ejercicio) en ANOVA de dos vías, post hoc método de Holm-Sidak.

Al analizar la densidad de neuronas histaminérgicas (ADA^+ / mm^2) en el TMNV, se encontró que la densidad de estas neuronas entre los diferentes condiciones de nacimiento depende del régimen de ejercicio (sedentario/ejercicio) existente, ($p = 0,009$ ANOVA de dos vías) como se observa en la figura 17 A. En este análisis el grupo de ratas asfícticas sedentarias presentó una menor densidad de neuronas histaminérgicas al compararla con los grupos controles sedentarios ($p < 0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak). Al comparar los grupos en ejercicio, no hay diferencias entre el grupo asfixia con los controles, pero si hay una menor densidad de neuronas histaminérgicas en el grupo cesárea en relación al espontáneo ($p < 0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak). En el grupo cesárea, existió una disminución significativa de la densidad neuronal (ir-ADA) producto del ejercicio ($p < 0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak)

Al realizar este mismo análisis en el TMND, también se encontró que la densidad de estas neuronas, entre los diferentes condiciones de nacimiento, depende del régimen de ejercicio (sedentario/ejercicio) existente, ($p=0,019$ ANOVA de dos vías). Las ratas asfícticas presentaron menor densidad de neuronas ir-ADA al compararlas con el grupo espontáneo en la condición sedentaria ($p<0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak), no existiendo diferencias entre los grupos en ejercicio. Por otra parte al realizar una comparación dentro de los grupos en misma condición de nacimiento, se encontró un incremento de la densidad de neuronas histaminérgicas en el TMND de las ratas asfícticas producto del ejercicio ($p<0,05$ ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak). Figura 17 B.

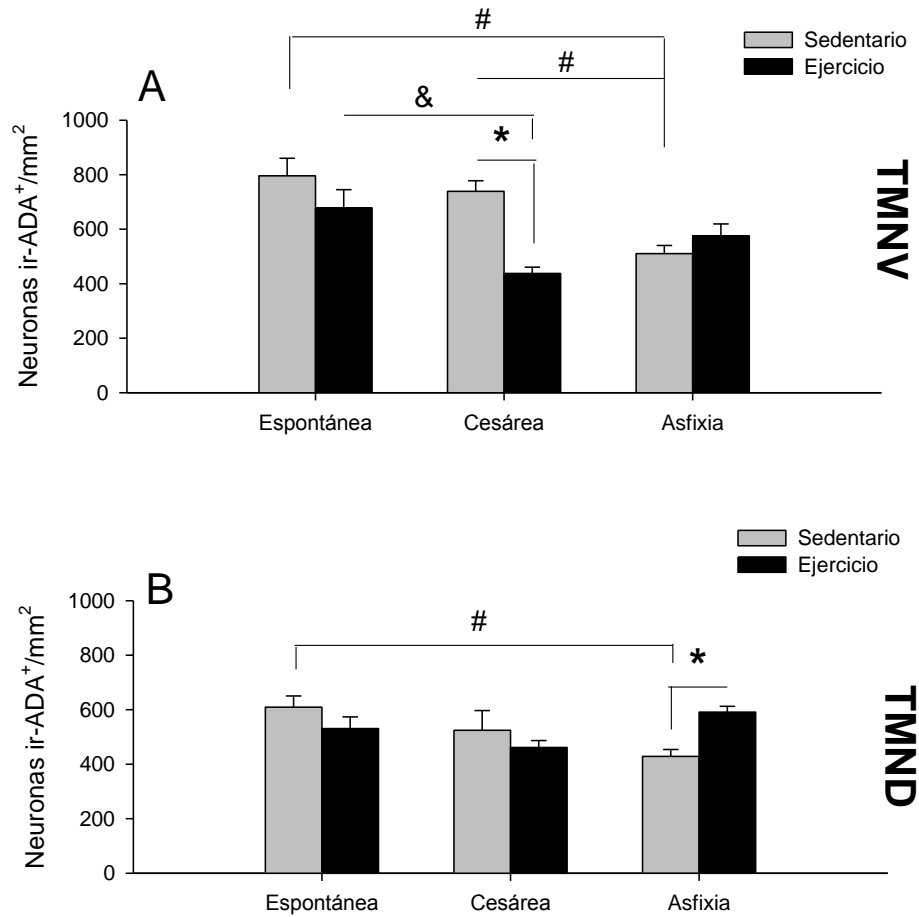


Figura 17: Densidad de neuronas ir- ADA en el TMNV (A) y TMND (B). Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar de los grupos sedentarios (barras grises) y grupos en ejercicio (barras negras) en las diferentes condiciones analizadas. * $p < 0,05$ (sedentario vs ejercicio en misma condición de nacimiento); # $p < 0,05$ (comparación entre grupos sedentarios); & $p < 0,05$ (comparación entre grupos en ejercicio) ANOVA de dos vías, método de Holm-Sidak. TMNV: Grupo asfixia (Sedentario: $n=4$; Ejercicio $n=3$). Cesárea (Sedentario: $n=7$; Ejercicio: $n=4$) Espontáneo (Sedentario: $n=5$; Ejercicio $n=4$) TMND: Grupo asfixia (Sedentario: $n=3$; Ejercicio $n=4$). Cesárea (Sedentario: $n=4$; Ejercicio: $n=3$) Espontáneo (Sedentario: $n=6$; Ejercicio $n=4$)

Correlación entre las variables observadas

Al correlacionar los resultados obtenidos entre las diferentes variables observadas (distancia, velocidad promedio), versus rendimiento en prueba de localización de objetos (conducta), (tabla 1); parámetros de inmunohistoquímica (densidad de ir-Arc, densidad de ir-Fos/ADA y densidad de neuronas ir-ADA), versus parámetros de ejercicio, (tabla 2); o conducta versus parámetros de inmunohistoquímica (tabla 3) entre todos los grupos estudiados, no se encontraron relaciones a nivel global (todos los grupos) o dentro de la misma condición de nacimiento, independiente del régimen de ejercicio (grupo). Al realizar este análisis de manera específica, según condición de nacimiento y régimen de ejercicio presente, se encontró que la expresión de ADA se correlaciona con la velocidad promedio en la rueda de ejercicio, sólo en el grupo de ratas asfícticas con acceso a rueda, y se puede observar la distribución de los datos en la figura 18 ($p=0,034$; $R=0,966$ en regresión lineal). La otra relación encontrada, fue entre la densidad de neuronas doblemente inmunoreactivas ADA/Fos con la distancia recorrida (figura 19), en el grupo de ratas cesárea en ejercicio, ($p=0,024$; $R=0,976$ en regresión lineal). No se consideró en los análisis al grupo espontáneo en ejercicio por su bajo n obtenido, debido a dificultades metodológicas.

Tabla 1: Relación entre la conducta observada y parámetros de ejercicio en rueda. Regresión lineal

		Ejercicio					
		Velocidad			Distancia		
		r	p	n	r	p	n
Conducta	Todos los grupos	0,184	0,784	8	0,379	0,354	8
	Espontáneo	S/C	S/C	2	S/C	S/C	2
	Cesárea	0,209	0,791	4	0,424	0,576	4
	Asfixia	0,245	0,755	4	0,33	0,67	4

Tabla 2: Relación entre análisis inmunohistoquímicos y parámetros de ejercicio en rueda, entre los grupos de estudio. Regresión lineal. Las celdas en gris identifican las correlaciones significativas.

		Ejercicio					
		Velocidad			Distancia		
		r	p	n	r	p	n
ARC	Todos los grupos	0,436	0,18	11	0,505	0,113	11
	Espontáneo	S/C	S/C	2	S/C	S/C	2
	Cesárea	0,702	0,12	6	0,534	0,276	6
	Asfixia	0,63	0,254	5	0,343	0,572	5
ADA/Fos	Todos los grupos	0,334	0,418	8	0,213	0,612	8
	Espontáneo	S/C	S/C	2	S/C	S/C	2
	Cesárea	0,576	0,424	4	0,976	0,024	4
	Asfixia	0,174	0,826	4	0,551	0,449	4
ADA	Todos los grupos	0,000723	0,999	8	0,423	0,296	8
	Espontáneo	S/C	S/C	2	S/C	S/C	2
	Cesárea	0,738	0,262	4	0,853	0,147	4
	Asfixia	0,966	0,034	4	0,883	0,117	4

Tabla 3: Relación entre la conducta observada y análisis de inmunohistoquímica, entre los grupos de estudio. Regresión Lineal.

		Histología									
		Arc			ADA/fos			ADA			
		r	p	n	r	p	n	r	p	n	
Conducta	Todos los grupos		0,0516	0,783	31	0,0212	0,915	28	0,213	0,278	28
	Espontáneo	Sedentario	0,574	0,234	6	0,013	0,98	6	0,423	0,403	6
		Ejercicio	0,201	0,799	4	0,589	0,411	4	0,255	0,745	4
		Grupo	0,0833	0,819	10	0,154	0,672	10	0,371	0,292	10
	Cesárea	Sedentario	0,244	0,641	6	0,000322	1	6	0,339	0,511	6
		Ejercicio	0,533	0,276	6	0,489	0,511	4	0,463	0,537	4
		Grupo	0,271	0,395	12	0,206	0,527	10	0,393	0,261	10
	Asfixia	Sedentario	0,393	0,607	4	0,869	0,131	4	0,325	0,675	4
		Ejercicio	0,391	0,515	5	0,556	0,444	4	0,668	0,933	4
		Grupo	0,281	0,464	9	0,46	0,252	8	0,54	0,167	8

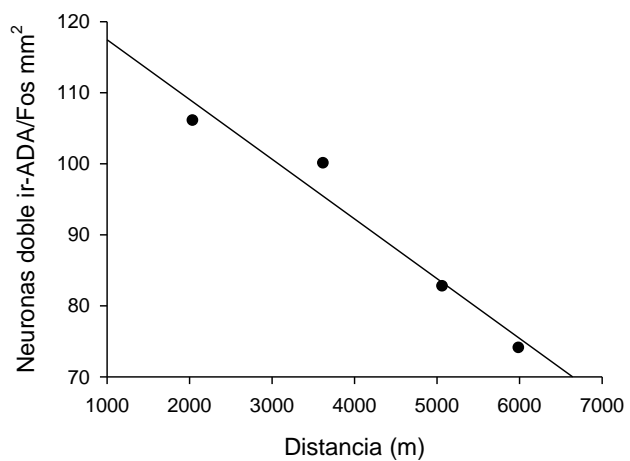


Figura 18: Regresión lineal entre la densidad de neuronas doble ir-ADA/Fos, y la distancia total recorrida en rueda en el grupo cesárea en ejercicio. n=4.

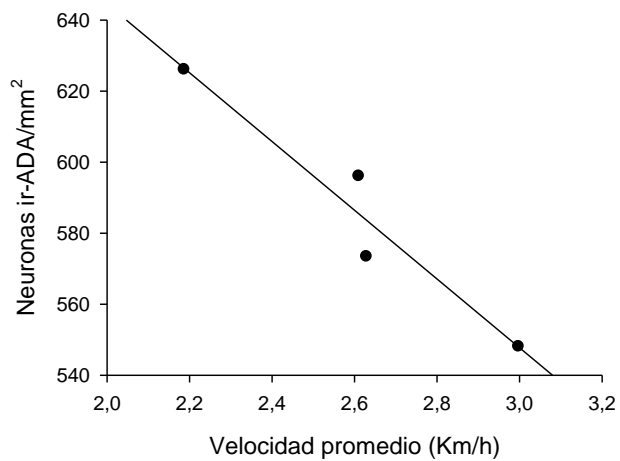


Figura 19: Regresión lineal entre la densidad de neuronas ir-ADA, y la velocidad promedio en rueda de ejercicio, en el grupo asfixia en ejercicio., n=4

DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que: a) las ratas asfícticas que realizaron ejercicio físico voluntario tuvieron mejoras en su rendimiento en la prueba de memoria, 24 horas luego de la familiarización, al compararlas con su grupo control sedentario. Además, en el grupo antes mencionado, el rendimiento en esta misma prueba es equivalente al de los grupos controles en ejercicio. B) No se evidenciaron diferencias en parámetros del ejercicio como la capacidad de ejercicio medida en la trotadora, así como tampoco en la velocidad promedio alcanzada en la rueda de ejercicio durante los 21 días de acceso a ella. Sin embargo se encontró un aumento significativo en la distancia recorrida promedio/ día entre el grupo de ratas asfícticas respecto a su grupo control, y también un aumento en la velocidad promedio alcanzada en la rueda de ejercicio (inicio vs final del periodo de ejercicio). C) el ejercicio físico indujo un incremento en la inmunoreactividad para Arc en el DG en el grupo con AP comparado con su control sedentario. D) La actividad histaminérgica cerebral aumentó en los grupos controles en ejercicio (porcentaje de neuronas doble ir c-Fos⁺/ADA⁺) tanto en el TMNV como TMND; en cambio el grupo asfixia en ejercicio disminuyó su porcentaje de activación en el TMND, sin presentar cambios este aspecto en el TMNV. Al analizar la densidad de neuronas c-Fos⁺/ADA⁺, se observó que en los grupos sedentarios en el TMNV no existen diferencias, y por el contrario en el TMND el grupo asfixia presenta una mayor densidad de neuronas doblemente inmunoreactivas en relación a sus controles sedentarios. Sólo el grupo de ratas espontáneas presentó un aumento de las neuronas doblemente inmunoreactivas por causa del ejercicio (TMNV y TMND). Por otra parte, en cuanto a la densidad de neuronas histaminérgicas de los grupos sedentarios, se encontró que las ratas asfícticas tienen una menor densidad de neuronas ir-ADA tanto en TMNV (al igual que en reportes previos, Flores-

Balter, 2016) como TMND. No se observaron diferencias en la densidad de neuronas histaminérgicas en las ratas asfícticas en ejercicio en relación a sus grupos controles en ejercicio en ambas estructuras. Cabe destacar que el ejercicio indujo un aumento en la densidad de neuronas ADA⁺ en el TMND de las ratas asfícticas. E) no se encontraron correlaciones globales entre las variables estudiadas, sólo en grupos específicos; Asfixia en ejercicio, correlación entre velocidad promedio en rueda y expresión de ADA; Cesárea en ejercicio, correlación entre distancia y neuronas doble ir-ADA/Fos.

Las ratas que practicaron ejercicio por 21 días mostraron diferentes cambios a nivel conductual (mejoras en la memoria) como a nivel neurofisiológico (expresión de Arc, activación del sistema histaminérgico), estos hallazgos van a la par con otros estudios realizados con ratas sin alteraciones neurológicas, en los que se demuestra que 21 días de ejercicio es suficiente para obtener los cambios esperados, como mejoras en la memoria espacial a largo plazo, la memoria de trabajo y la densidad neuronal en el hipocampo (Radahmadi y cols, 2015; Wang y Wang, 2016).

A nivel conductual, el ejercicio físico provocó mejoras en las ratas asfícticas en el rendimiento de la prueba de localización de objetos. Existe evidencia sobre los efectos benéficos del ejercicio al evaluar las capacidades de memoria en ratas, utilizando el paradigma de reconocimiento de objetos, incluso cuando son evaluadas 24 horas posteriores a la familiarización, (O'Callaghan y cols, 2007). No existen, sin embargo, estudios del efecto del ejercicio físico sobre la memoria de ratas con AP. En la tarea evaluada (prueba de reconocimiento de objetos en la versión localización espacial de objetos) el hipocampo es fundamental para la realización de la misma, ya que lesiones bilaterales de esta estructura provocan serios déficits en el rendimiento de ratas en esta prueba (Barker y Warburton. 2011),

conjuntamente existe evidencia que la AP induce diversos daños en el hipocampo por su alta sensibilidad al déficit de oxígeno (Simola y cols 2008, Galeano y cols 2011) razón por la cual se esperaba un mal rendimiento del grupo AP sedentario en esta prueba en relación a los grupos controles en mismo régimen de ejercicio, lo cual no fue encontrado al comparar los 3 grupos. Al comparar el grupo asfixia y cesárea se encontraron diferencias significativas en memoria espacial ($p < 0,05$ en prueba de Mann-Whitney), tanto al comparar los grupos sedentarios y en ejercicio a 24 horas de la prueba de familiarización, evidenciando déficits en memoria espacial, resultados que van en línea con resultados de estudios previos (Galeano y cols. 2011), así como, al hecho de que el ejercicio favoreció la memoria espacial, pero a un nivel menor que en el grupo cesárea

Llama la atención en los grupos controles, (espontáneo y cesárea), que no se encontraran diferencias significativas como efecto del ejercicio al comparar conducta (sedentario versus ejercicio), sin embargo se debe considerar de que el grupo cesárea estuvo cercano a la significancia en esta comparación con un $p = 0,076$ en t de student. Si en cambio se realiza un test no paramétrico (si bien los datos tienen una distribución normal, es más correcta su utilización debido al pequeño tamaño muestral) se obtiene un $p = 0,052$ en la prueba de Mann-Whitney. Por lo tanto, con un aumento del tamaño muestral se observarían diferencias significativas en este grupo control, lo que va a la par con lo esperado y a la evidencia disponible.

Se encontró que el ejercicio físico indujo un aumento de la densidad de neuronas ir-Arc en la capa granular del giro dentado en el hipocampo de ratas asfícticas que realizaron ejercicio (ambas bandas supra e infrapiramidal), indicando una mayor plasticidad en esta zona. Existen antecedentes de que el ejercicio físico regular es capaz de provocar mejoras en la

respuesta y excitabilidad de las neuronas de esta capa (Triviño-Paredes y cols, 2016), por otro lado, la transcripción de ARC es activada por estímulos que codifican el aprendizaje dependiente de hipocampo (con tan solo un ensayo), en la consolidación del LTP y en la formación de memorias a largo plazo en tareas de aprendizaje implícito y explícito (Eriksson TM et al. 2012; Miyashita et al. 2009; Niels y cols, 2006). Tal es su importancia que, en ratones knock-out para Arc, se encontró que presentan una escasa capacidad de aprendizaje en tareas de reconocimiento de objetos (Niels y cols, 2006). Es importante destacar la alteración existente en la conectividad neuronal y sinaptogénesis en ratas sometidas a AP (Herrera-Marschitz et al. 2014; Marriott et al. 2015), y si bien, no se encontró una relación directa entre la expresión de Arc y el rendimiento en la tarea de localización de objetos, el aumento de la ir-Arc producto del ejercicio, (que implica una mayor plasticidad del hipocampo), podría explicar el mejor desempeño en esta tarea por un remodelamiento de las conexiones sinápticas ya alteradas, de este modo el aumento en la expresión de Arc podría correlacionarse con el desempeño cognitivo pero no de una manera lineal sino como parte de otras posibles modificaciones inducidas por ejercicio físico. Para tal fin debieran plantearse estudios posteriores asociando marcadores pre (sinaptofisina) y post sinápticos (proteína de densidad postsináptica 95) a los cambios observados producto del ejercicio.

Otra posible explicación en relación al aumento de neuronas ir-Arc puede asociarse a la vasta evidencia existente sobre el efecto positivo que tiene el ejercicio sobre la neurogénesis (Cetinkaya y cols, 2013; Kim y cols, 2010; Praag, 2009; Farmer et al, 2004; Holmes y cols, 2004, Ma y cols, 2017; Snyder et al, 2009; Wang y Wang 2016). Se ha observado que el ejercicio físico mejora la proliferación de células progenitoras neurales, la maduración y sobrevivencia de nuevas neuronas en el giro dentado, fenómeno planteado como una

base importante en las mejoras de aprendizaje y memoria, (Wang y Wang, 2016; Ma y cols, 2017), ya que estas neuronas están más propensas a generar LTP (Triviño-Paredes y cols. 2016). Está descrito además que en ratones las nuevas neuronas, generadas a lo largo de 21 días de ejercicio, presentan mayor ir-Arc y estarían mejor integradas en los circuitos hipocampales (Snyder y cols, 2009 que junto al hecho de que las nuevas neuronas producidas tendrían una mayor actividad afectando favorablemente el funcionamiento hipocampal al tener potenciados sus mecanismos de LTP (Ma et al, 2017). Si bien en el presente estudio no se evaluó neurogénesis en el hipocampo, por lo que no se puede aseverar que las mejoras conductuales se deban a este fenómeno, la evidencia sugiere una fuerte relación entre el ejercicio, neurogénesis y LTP. Futuras investigaciones podrían incluir doble ir-Arc, y a un marcador de neurogénesis como BdrU (bromo-desoxiuridina) para determinar tal relación.

Respecto a la intensidad del ejercicio, en el presente estudio se analizó la intensidad a la cual corrieron las ratas en la rueda de ejercicio en relación a su velocidad máxima alcanzada en trotadora. Debido a la diferencia entre el tipo de ejercicio (voluntario en rueda versus forzado en trotadora), al estrés asociado y a que en rueda se alcanzaron velocidades mucho mayores, no se pudo determinar la intensidad del ejercicio realizado a través de este método. Existen antecedentes respecto a la diferencia de velocidad alcanzada dependiendo de la naturaleza del ejercicio, los resultados obtenidos van a la par con estos hallazgos (Leasure y Jones, 2008). El ejercicio voluntario en rueda se caracteriza por periodos cortos de ejercicio a alta velocidad, no alcanzando a ser un ejercicio a alta intensidad, ya que para esto se requiere una mayor duración de los periodos de ejercicio lo cual sólo se logra en protocolos de ejercicio forzado (Leasure y Jones. 2008); se desprende entonces que el ejercicio voluntario realizado por las ratas fue de intensidad leve a moderada. Diversos estudios muestran los efectos

benéficos de esta intensidad del ejercicio en el funcionamiento hipocampal, demostrado por un aumento en la neurogénesis, la sobrevivencia neuronal, la maduración de nuevas neuronas, los niveles de BDNF y la memoria dependiente de esta estructura (Triviño-Paredes y cols, 2016; Ma y cols, 2017). En cuanto a la distancia recorrida, se encontró una diferencia significativa de las ratas con AP comparada con el resto de los grupos analizados. Este efecto podría estar asociado al alto nivel de ansiedad que presentan las ratas con AP (Morales y cols 2008; Morales y cols. 2010; Duman y cols, 2008), y a que el ejercicio físico (con bajos niveles de factores estresantes) posee un efecto ansiolítico según se ha demostrado en ratas Wistar sin insultos perinatales (Otsuka y cols. 2015). Sin embargo, se requieren estudios posteriores que correlacionen la distancia recorrida con pruebas de ansiedad como campo abierto y laberinto elevando en cruz para poder determinar esta posible relación, y que además permitan además indagar sobre otras variables fisiológicas. La velocidad promedio alcanzada no tuvo mayores variaciones al considerar la velocidad promedio de los diferentes grupos, pero al comparar la velocidad inicial promedio (primeros 3 días) versus la velocidad promedio final (últimos 3 días en rueda de ejercicio) se encontró un aumento en este parámetro en las ratas asfícticas, demostrando el impacto del ejercicio a nivel del sistema osteomuscular y su capacidad de realizar ejercicio.

La actividad histaminérgica cerebral se estudió en el TMN, realizando una distinción entre su porción ventral y dorsal. Si bien, el TMN ha sido subdividido citoarquitectónicamente en diferentes porciones (E1-E5, o dorsal y ventral), se cree que actuaría como una sola unidad funcional (Brown, 2001). Sin embargo, se ha encontrado evidencia de cierta segregación funcional, lesiones en TMNV o TMND generan diferentes déficits conductuales, tales como alteraciones en la actividad motora (TMND) o en la

termorregulación (TMNV), frente a conductas apetitivas (Valdés, 2010). Por otro lado, existe evidencia de una actividad histaminérgica deficiente en el TMNV pero no en el TMND en ratas asfícticas (Flores-Balter y cols, 2016), lo cual crea un precedente de diferenciación en el daño de esta estructura para ratas asfícticas, y justifica esta división para análisis.

La densidad de neuronas histaminérgicas (ADA^+/mm^2), fue menor en el grupo de ratas asfícticas en relación a sus controles (grupos sedentarios) en el TMNV, lo cual confirma los estudios previos del laboratorio (Flores-Balter y cols, 2016). En el TMND, en cambio, las ratas asfícticas no tuvieron diferencias con el grupo cesárea, pero si una menor densidad en relación al grupo espontáneo. El estudio antes mencionado sólo consideró grupo asfixia y grupo cesárea por lo que este hallazgo no tiene un claro referente previo. Siguiendo con los grupos sedentarios, se observó que en el TMNV de ratas con AP no hay diferencias en los porcentajes de activación de estas células respecto a los grupos controles, por lo cual se desprende una menor actividad de esta estructura producto de la AP. En cambio en el TMND se podría hablar de una compensación del sistema histaminérgico del grupo AP, ya que si bien tiene menor densidad de neuronas ir-ADA, presentaron un mayor porcentaje de activación (doble ir-ADA/Fos).

El ejercicio físico en el grupo de ratas con AP no generó variaciones a nivel del TMNV en ninguno de los parámetros estudiados (porcentaje de activación, densidad de neuronas ir-ADA y densidad de neuronas doblemente inmunoreactivas). Por otro lado, en el TMND se observó un aumento en la densidad de neuronas ir-ADA del grupo AP producto del ejercicio, lo cual podría explicarse por neurogénesis en esta zona. Evidencia reciente demuestra la existencia de este proceso en ratones adultos gracias a los tanicitos, células gliales con capacidad de progenitores neurales y/o células madres, que se encuentran cercanos al tercer

ventrículo, con la capacidad de incorporarse a los circuitos del hipotálamo. El mismo estudio establece que un 47% de estas neuronas se incorporarían al hipotálamo posterior, región donde encontramos al TMN, (Chaker et al, 2016). Sin embargo, no se encontró este aumento de neuronas ir-ADA en los grupos controles producto del ejercicio. Debido a esto y al hecho de que en esta investigación no se utilizaron marcadores de neurogénesis, no se puede afirmar la ocurrencia de este hecho. Por lo tanto, a causa del antecedente de neurogénesis en esta zona, se deberían diseñar estudios posteriores con uso de marcadores de neurogénesis ($ADA^+/BdrU^+$ por ejemplo). Otra opción del aumento de neuronas ir-ADA, es la posible mayor expresión de la enzima histidina descarboxilasa, lo cual podría determinarse a través de un western blot. En el TMND de ratas asfícticas, se encontró una disminución en el porcentaje de activación producto del ejercicio, lo cual no necesariamente implica una menor actividad histaminérgica, ya que este porcentaje se establece sobre el total de neuronas que presentan este fenotipo, el cual estaba aumentado, y también está el hecho de que no se encontraron diferencias en la densidad de neuronas doble ir-ADA/Fos. Un aumento en el porcentaje de activación del TMN se podría asociar a los cambios observados en el hipocampo, debido a la conexión existente entre el TMN y esta estructura que provoca una fuerte estimulación sobre las neuronas piramidales y granulares (Brown, 2001), y a que la actividad histaminérgica es necesaria para la facilitación de procesos de plasticidad tales como LTP en esta estructura (Luo y Leung, 2010), sin embargo no se encontró este aumento en la activación (porcentaje neuronas doblemente ir). Por último la disminución en la densidad de neuronas ir-ADA en el grupo cesárea en ejercicio, no implica necesariamente una muerte celular, sino que probablemente se deba a una menor expresión de la enzima Adenosin Deaminasa, experimentos adicionales se necesitan para corroborar esta afirmación como por ejemplo el conteo de neuronas en la región

del TMN por otras aproximaciones tales como tinción de Nissl y análisis morfológico detallado de la región.

El ejercicio en los grupos controles provocó un aumento en la actividad histaminérgica, tanto en TMND como TMNV. Según reportes previos, las mejoras en aprendizaje y memoria producto del ejercicio podrían estar mediadas por histamina, (Taati y cols, 2014), sin embargo, ningún estudio publicado hasta el momento ha registrado un aumento de la actividad histaminérgica producto del ejercicio, pero tenemos el antecedente de resultados previos de nuestro laboratorio, donde el ejercicio por sí mismo provoca un aumento de la actividad histaminérgica junto a beneficios a nivel de la memoria en tareas de reconocimiento de objetos (Grinspun, N. et al., en preparación). También se debe considerar que el correr es una actividad que involucra activación de diversos sistemas sensoriales, generando un alto nivel de alerta; y que al ser una conducta susceptible de adicción (Macfarlane, 2016; Berczik, 2012) se puede considerar como altamente motivante, y es sabido que la histamina es fundamental en el despliegue de conductas motivadas y que aumentan el nivel de alerta, (Torrealba, 2012; Valdés, 2010).

En cuanto a las correlaciones observadas, no existen reportes previos en la literatura que analicen estas variables y sirvan como precedente a los datos aquí observados. Reportes previos del laboratorio, también registraron una correlación entre la densidad de neuronas doble ir-ADA/Fos y distancia, (Grinspun et al, en preparación). Debido al pequeño tamaño muestral del estudio, es probable de que existan otras correlaciones entre los parámetros estudiados, no evidenciados hasta el momento, y que puedan aportar más al entendimiento del efecto del ejercicio físico en mejoras cognitivas. Investigaciones futuras debieran indagar al respecto, considerando un tamaño muestral mayor.

En suma, el ejercicio físico provocó mejoras cognitivas (evidenciadas en el grupo AP, y cercano a la significancia en el grupo cesárea), pero con mecanismos subyacentes diferentes. Al parecer el sistema histaminérgico no estaría involucrado en la mejora cognitiva observada en animales con AP producto del ejercicio y las mejoras cognitivas podrían obedecer a cambios en la plasticidad sináptica en hipocampo (ir-Arc); en cambio en el grupo cesárea si se encontró mayor actividad del sistema histaminérgico (porcentaje de neuronas con doble ir) producto del ejercicio asociado a una mejora cognitiva, sin cambios en la plasticidad hipocampal (Arc). Por lo tanto debe existir un mecanismo compensatorio al déficit del sistema histaminérgico de la AP, asociado a un aumento de la plasticidad hipocampal, la cual puede estar asociada a un aumento en el LTP, debido a la asociación de Arc con este fenómeno, o mejoras en la eficiencia y conectividad sináptica (que se encuentra alterada en AP), o un mayor número de neuronas en el giro dentado (debido al efecto en neurogénesis del ejercicio, y al daño provocado por la AP en el hipocampo). Al ser este el primer estudio que analiza el efecto del ejercicio físico, en ratas asfícticas, sobre el aprendizaje y memoria, no hay referencias al respecto y abre la opción a diferentes posibilidades y mecanismos que estudien esta modificación, pudiendo involucrar una mayor cantidad de variables fisiológicas (frecuencia cardíaca por ejemplo), variaciones en la conectividad neuronal (marcadores de sinaptogénesis, neurogénesis), y bloqueadores de los receptores de histamina, para determinar, con mayor certeza, en este grupo la posible influencia de este sistema.

Al ser este un estudio preliminar, abre la posibilidad a una serie de otras investigaciones desde las ciencias básicas a la clínica en el tema. El modelo de ratas utilizado refleja una asfixia severa-moderada, pero con consecuencias motoras más leves que las expresadas en humanos, (Singer, 2016; Simola, 2008). El poder determinar específicamente el

efecto a nivel cerebral del ejercicio en la AP, abre la opción de intervenciones farmacológicas que puedan reemplazar la actividad física en individuos con mayores limitaciones motoras, que no puedan hacer actividad física (asfixia severa). Por otra parte, abre la posibilidad de establecer estudios clínicos en los cuales se pueda validar el efecto benéfico del ejercicio físico, en personas secueledas de asfixia perinatal, y a su vez justificaría intervenciones a nivel de prescripción de ejercicio, por lo mismo es clave entender que parámetros del ejercicio son realmente relevantes para generar mejoras en este grupo de pacientes.

REFERENCIAS

1. Alomari M, Khabour O, Alzoubi K, Alzubi M. 2013. Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. *Behavioural Brain Research*. 247:34-39
2. Austin M, Ploughman M, Glynn L y Corbett D. 2014. Aerobic exercise effects on neuroprotection and brain repair following stroke: A systematic review and perspective. *Neuroscience research*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.06.007>
3. Badr Zahr 2006. Brain injury in the infant: the old, the new and the uncertain. *The Journal of perinatal & neonatal nursing*. 20(2):163-75
4. Barker G y Warburton E. 2011. When is the hippocampus involved in recognition memory? *Journal of neuroscience*. 31(29):10721-10731
5. Benes J, Mravec B, Kvetnansky R y Myslivecek J. 2013. The restructuring of muscarinic receptor subtype gene transcripts in c-fos knock-out mice. *Brain research bulletin* 94:30-39
6. Bernardino L, Eiriz M, Santos T, y cols. 2012. Histamine stimulates neurogenesis in the rodent subventricular zone. *Stem cells*. 30:773.784
7. Bevins R, Besheer J. 2005. Novelty reward as a measure on anhedonia. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29:707-714
8. Bjelke B, Andersson K, Ögren S, Bolme P. 1991. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain research*. 543(1): 1-9
9. Bramham C, Alme M, Bittins M y cols. 2010. The Arc of Synaptic memory. *Experimental Brain Research*. 200:125-140
10. Broadbent N, Gaskin S, Squire L y Clark R. 2009. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning and memory* 17:5-11
11. Bustamante D, Morales P, Torres J, Goiny M, Herrera-Marschitz M. 2007. Nicotinamide prevents the effect of perinatal asphyxia on dopamine release evaluated with in vivo microdialysis 3 months after birth. *Experimental brain research* 177:358-369

12. Cannon M, Jones P, Murray R 2002. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *American Journal of Psychiatry* 159, 1080-1092
13. Cetinkaya C, Riza Sisman A, Kiray M et al. 2013. Positive effects of aerobic exercise on learning and memory functioning, which correlate with hippocampal IGF-1 increase in adolescent rats. *Neuroscience letters*. 549:177-181
14. Chaker Z, George C, Petrovska M, Caron J, Lacube P et al. 2016. Hypothalamic neurogenesis persists in the aging brain and is controlled by energy-sensing IGF-I pathway. *Neurobiology of aging* 41: 64-72
15. Clark P, Bhattacharya T, Miller D y Rhodes J. 2011. Induction of c-fos, zif268, y AR from acute bouts of voluntary wheel running in new and pre-existing adult mouse hippocampal granule neurons. *Neuroscience* 184: 16-27
16. Clarke J, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I y Delgado-García J. 2010. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *PNAS*, January 25
17. Da Silveira C, Furini C, Benetti F et al. 2013. The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory* 103:64-71
18. De Haan M, Wyatt J, Roth S y cols. 2006. Brain cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. *Developmental Science* 9:4 350-358
19. Droste S, Gesing A, Ulbricht S y cols. 2003. Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* 144(7): 301-3023
20. Duman C, Schlesinger L, Russell D, Duman R. 2008. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain research*. 1199:148-158
21. Dyrvig M, Hansen H, Christiansen S, y cols. 2012. Epigenetic regulation of Arc and c-Fos in the hippocampus after acute electroconvulsive stimulation in the rat. *Brain research bulletin* 88:507-513
22. Eriksson TM, Delagrè P, Spedding M et al. 2012. Emotional memory impairments in a genetic rat model of depression: involvement of 5-HT/MEK/Arc signaling in restoration. *Molecular psychiatry*. 17:173-184

23. Farmer J, Zhao X, Van Praag H et al. 2004. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats *in vivo*. *Neuroscience* 124:71-79
24. Fleiss B, Coleman H.A., Castillo-Melendez M. et al. 2011. Effects of birth asphyxia on neonatal hippocampal structure and function in the spiny mouse. *International journal of developmental neuroscience* 29:757-766
25. Flores-Balter G, Córdova-Jadue H, Chiti-Morales A, Lespay C y cols. 2016. Effect of perinatal asphyxia on tuberomammillary nucleus neuronal density and novel object recognition memory: a possible role for histamine? *Behavioural brain research*. 313:226-232
26. Galeano P, Blanco E, Madureira D, y cols. 2011. Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 29: 609-619
27. Griffin E, Bechara R, Birch A, Kelly A. 2009. Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism. *Hippocampus* 19:973-980
28. Guzowski J, Lyford G, Stevenson G y cols. 2000. Inhibition of activity-dependent Arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long term memory. *The journal of neuroscience* 20(11):3993-4001
29. Haas H, Sergeeva O y Selbach O. 2008. Histamine in the nervous system. *Physiological reviews*. 88:1183-1241
30. Harris J. 1998. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain research bulletin*. 45(1):1-8
31. Herrera-Marschitz M, Morales P, Leyton L, Bustamante D y cols. 2011. Perinatal asphyxia: current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus on sentinel proteins. *Neurotox Res* 19:603–27
32. Herrera-Marschitz M, Neira-Pena T, Rojas-Mancilla E, y cols. 2014. Perinatal asphyxia: CNS development and déficits with delayed onset. *Frontiers in Neuroscience* (8) article 47.

33. Hoeger H, Engelmann M, Bernet G y cols. 2000. Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. *Life Science* 66(10): 947-962
34. Hoeger H, Engidawork E, Stolzlechner D, et al. 2006. Long-term effect of moderate and profound hypothermia on morphology, neurological, cognitive and behavioral functions in a rat model of perinatal asphyxia. *Amino Acids*. 31: 385-396
35. Holmes M, Galea L, Mistlberger R y Kempermann G. 2004. Adult hippocampal neurogenesis and voluntary running activity: circadian and dose-dependent effects. *Journal of neuroscience research* 76:216-222
36. Karl J, Petter M, Martimbianco A y cols. 2010. Effects of acute perinatal asphyxia in the rat hippocampus. *Cell molecular neurobiology*. 30:683-692
37. Kennard J, Woodruff-pak D. 2012. A comparison of low – and high – impact forced exercise: effects of training paradigm on learning and memory. *Physiology and behavior* 106:423-427
38. Kim Y, Kim H, Jang H, y cols. 2003. Magnitude – and time- dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *International journal of sports medicine*. 24(2):114-117
39. Kim S, Ko I, Kim B et al. 2010. Treadill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. *Experimental Gerontology* 45:357-365
40. Leasure J. Jones M. 2008. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience* 156:456-465
41. Lie D, Song H, et al. 2004. Neurogenesis in the adult brain: New Strategies for Central Nervous System Diseases. *Annu. Rev. Pharmacology Toxicology*. 44:339-421
42. Link W, Konietzko U, Kauselmann G, y cols. 1995. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Neurobiology* 92:5734-5738
43. Luo T y Leung S. 2010. Endogenous histamine facilitates long-term potentiation in the hippocampus during walking. *The journal of neuroscience* 30(23):7845-7852
44. Ma C, Ma X, Wang J, Liu H y cols. 2017. Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. *Behavioural Brain Research*. 317:332-339

45. Mañeru C, Junqué C. 2002. Déficits cognitivos en la asfixia perinatal. *Revista de neurología*. 34 (12): 1171-1177
46. Marcuzzo S, Ferreira Dutra M, Stigger F y cols. 2008. Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology. *Brain research* 1222: 129-140
47. Marriot A, Rojas-Mancilla E, Morales P, Herrera-Marschitz M, Tasker R. 2015. Models of progressive neurological dysfunction originating early in life. *Progress in neurobiology*. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.10.001>
48. Martínez-Mir M, Pollard H, Moreau J y cols. 1990. Three histamine receptors (H1, H2 and H3) visualized in brain of human and non-human primates. *Brain research* 526(2):322-327
49. Meijer JH, Robbers Y. 2014 Wheel running in the wild. *Proc. R. Soc. B* 281:20140210. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.0210>
50. Miyashita T, Kubik S, Haghighi N et al. 2009. Rapid activation of plasticity-associated gene transcription in hippocampal neurons provides a mechanism for encoding of one-trial experience. *Journal of Neuroscience*. 29(4):898-906
51. Morales P, Bustamante D, Espina-Marchant P, y cols. 2011. Pathophysiology of perinatal asphyxia: can we predict and improve individual outcomes? *The EMPA journal* 2(2):211-230
52. Morales P, Reyes P, Klawitter V. y Cols. 2005. Effects of perinatal asphyxia on cell proliferation and neuronal phenotype evaluated with organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 135: 421-431
53. Morales P, Simola N, Bustamante D, Lisboa F, y cols. 2010. Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on apoptosis, non-spatial memory and anxiety in rats. *Experimental brain research*. 202:1 1-14
54. Morgan J y Curran T. 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of neuroscience*. 14:421-451
55. Nakashiba T, Cushman J, Pelkey K, Renaudineau S, y cols. 2012. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*. 149:188-201

56. Niels P, Ohana O, Dammermann B y cols. 2006. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*. 52, 437-444
57. Nishijima T, Llorens-Martin M, Sanchez G y cols. 2013. Cessation of voluntary wheel running increases anxiety-like behavior and impairs adult hippocampal neurogenesis in mice. *Behavioural brain research*. 245:34-41
58. Novoa J, Milad M, Fabres J y cols. 2012. Consenso sobre manejo integral del neonato con encefalopatía hipóxico isquémica. *Revista chilena de pediatría*. 83(5): 492-501
59. O' Callaghan R, Ohle R y Kelly Á. 2007. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial – and non- spatial learning. *Behavioural brain research* 176: 362-366
60. Otsuka T, Nishii A, Natsuko A y cols. 2015. Effects of acute treadmill running at different intensities on activities of serotonin and corticotropin-releasing factor neurons, and anxiety-and depressive-like behaviors in rats. *Behavioural brain research*. 298:44-51
61. Plath N, Ohana O, Dammerman B, Errington M, y cols. 2009. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52: 437-444
62. Praag Henriette. 2009 Exercise and the brain: something to chew on. *Trends in neuroscience* 32(5)
63. Pollard H. y Bouthenet M.L. 1992. Autoradiographic visualization of the tree histamine receptors subtypes in the brain. *The histamine receptors*, 179-192
64. Praag Henriette. 2009 Exercise and the brain: something to chew on. *Trends in neuroscience* 32(5)
65. Radahmadi M, Hosseini N, Alaei H. 2016. Effect of exercise, exercise withdrawal, and continued regular exercise on excitability and long-term potentiation in the dentate gyrus of hippocampus, *Brain Research*.1653:8-13
66. Rodríguez B, Figueroa D, Mostarda C, V Heeren M, Irigoyen M y De Angelis K. 2007. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular diabetology* 6:(38)
67. Romero G, Méndez I, Tello V, Torner C. 2004. Daño neurológico secundario a hipoxia isquemia perinatal. *Archivos de neurociencia (Mex., D.F.)* 9(3)

68. Romero J, Muñiz J, Logica Tornatore T, y cols. 2014. Dual role of astrocytes in perinatal asphyxia injury and neuroprotection. *Neuroscience Letters*. 565:42-46
69. Roohey T, Raju T, Moustogiannis A. 1997. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early human development* 47:115-146
70. Scheepens A, Wassink G, Piersma M, y cols. 2003. A delayed increase in hippocampal proliferation following global asphyxia in the neonatal rat. *Developmental Brain Research*. 142: 67-76
71. Schneider E, Neumann D y Seifert R. 2014. Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from H1R and H2R deficient mice. *Neuroscience and Biobehavioral reviews* 42:252-66
72. Shan L, Swaab D y Bao A. 2013. Neuronal Histaminergic system in aging and age-related neurodegenerative disorders. *Experimental gerontology* 48:603-607
73. Sheng M, McFadden G y Greenberg M. 1990. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. 4(4)571-582
74. Senba E, Dadonna PE, Watanabe T. 1985. Coexistence of adenosine deaminase, histidine decarboxylase, and glutamate decarboxylase in hypothalamic neurons of the rat. *Journal of Neuroscience* 5:3393-3402.
75. Simola N, Bustamante D, Pinna A, y cols. 2008 Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Experimental Brain Research*. 185: 595-601
76. Singer H, Mink J, Gilbert D, Jankovic J. 2016. Cerebral Palsy. *Movement disorders in childhood*. (2) 453-475
77. Smith A, Spiegler M, Sauce B et al. 2013. Voluntary aerobic exercise increases the cognitive enhancing effects of working memory training. *Behavioural Brain Research* 256:626-635
78. Snyder J, Glover L, Sanzone K et al. 2009. The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus* 19(10):898-906

79. Speisman R, Kumar A, Rani A y cols. 2013. Daily exercise improves memory, stimulates hippocampal neurogenesis and modulates immune and neuroimmune cytokines in aging rats. *Brain, behavior, and immunity*. 28: 25-43
80. Strackx E, Van den Hove D, Steinbusch H, y cols. 2010. Fetal asphyxia leads to the loss of striatal presynaptic boutons in adult rats. *International journal of developmental neuroscience*. 28: 227-281
81. Stranahan A, Khalil, D y Gould E. 2007. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus* 17:1017-1022
82. Taati M, Moghaddasi M, Esmaaeili M. y cols. 2014. The role of the central histaminergic receptors in the exercise-induced improvements of the spatial learning and memory in rats. *Brain research*. 1587: 112-118
83. Torkaman-Boutorabi A, Danyali F, Oryan S et al. 2014. Hippocampal α -adrenoceptors involve in the effect of histamine on spatial learning. *Physiology and behavior*. 19:17-24
84. Torrealba F, Riveros M, Contreras M, Valdés JL. 2012. Histamine and motivation. *Frontiers in systems neuroscience*. 6, article 51
85. Triviño-Paredes, Patten A, Gil-Mohapel J, Christie B. 2016. The effect of hormones and physical exercise on hippocampal structural plasticity. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 41:23-43
86. Tyler W, Zhang X, Hartman K, y cols. 2006. BDNF increases release probability and the size of a rapidly recycling vesicle pool within rat hippocampal excitatory sinapses. *Journal of Physiology*. 574.3 787-803
87. Valdés JL, Sánchez, C, Riveros ME, Blandina P et al. 2010. The histaminergic tuberomammillary nucleus is critical for motivated arousal. *European Journal of neuroscience*. 31:1073-2085
88. Van de Berg W, Kwaijtaal M, De Louw A y cols. 2003. Impact of perinatal asphyxia on the gabaergic and locomotor system. *Neuroscience* 117: 83-96
89. Van Handel M, y cols. 2010. Behavioral outcome in children with a history of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia. *Journal of Pediatric Psychology* 35(3) pp. 286–295

90. Vannucci R. 2000. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *American Journal of Perinatology*. 17:113-120
91. Wang X-Q, Wang G-W. 2016. Effects of treadmill exercise intensity on spatial working memory and long-term memory in rats. *Life Sciences* 149:96-103
92. Zlomuzica A, Dere D y Dere E. 2013. The histamine H1 receptor and recollection-based discrimination in a temporal order memory task in the mouse. *Pharmacology, biochemistry and behavior*. 111:58-63
93. Zlomuzica A, Viggiano D, De Souza Silva MA et al. 2008. The histamine H1-receptor mediates the motivational effects of novelty. *European Journal of neuroscience* 27:1461-1474.