



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesi Doctoral
Neurociències

**Reversió dels dèficits de memòria associats a dany cerebral
traumàtic mitjançant exercici físic:
mecanismes neuroprotectors i neuroreparadors, i influència de
les pautes temporals de tractament**

Laura Amorós Aguilar

Codirigida per

Margalida Coll Andreu

Isabel Portell Cortés

Institut de Neurociències

Departament de Psicobiologia i Metodologia de les Ciències de la Salut

Unitat de Psicobiologia

Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 2018



Tesi Doctoral
Neurociències

**Reversió dels dèficits de memòria associats a dany cerebral
traumàtic mitjançant exercici físic:
mecanismes neuroprotectors i neuroreparadors, i influència de
les pautes temporals de tractament**

Laura Amorós Aguilar

Bellaterra, 2018

El projecte en què s'emmarca aquesta tesi doctoral ha sigut finançat pel Ministerio de Ciencia e Innovación (PSI2009-08034) i pel Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad del Ministerio de Economía y Competitividad (PSI2014-55087-R).

Agraïments

A les meves directores i a tot el grup de recerca. Marga, Mabe, David i Meritxell, gràcies per tot el vostre suport, disponibilitat i bon humor.

A la Mar Castillo, per tota l'ajuda i paciència en la posada a punt dels procediments histològics.

A la Núria Barba i la Saioa Mendizuri, per la facilitat i creativitat per emprendre noves tècniques de quantificació amb els equips disponibles.

Al Karlos, per fer que la vida dins el laboratori sigui més fàcil.

Al Carlos Barcia, per l'ajuda brindada en estereologia.

A l'Èlia, per tota la feina realitzada amb la part de neuroinflamació

A la Bea, pel seu assessorament amb la immunohistoquímica i valoració de la neuroinflamació.

Índex

1.	Plantejament, hipòtesi i objectius experimentals.....	3
2.	Marc teòric i antecedents experimentals	13
2.1	Dany cerebral traumàtic (TBI)	13
2.1.1	Dades epidemiològiques	13
2.1.2	Fisiopatologia del dany cerebral	14
2.1.3	Conseqüències funcionals del TBI i evolució temporal	22
2.2	TBI en animals	24
2.2.1	Models experimentals de TBI.....	25
2.2.2	Efectes del TBI	26
2.3	Exercici físic	28
2.3.1	Tipus d'exercici físic en models animals.....	28
2.3.2	Efectes beneficiosos de l'exercici físic sobre les funcions cognitives en el dany cerebral.....	30
2.3.3	Mecanismes d'acció de l'exercici físic.....	33
2.3.4	Influència de les pautes d'exercici físic sobre els seus efectes beneficiosos.....	44
2.4	Memòria de Reconeixement d'Objectes (MRO)	52
3.	EXPERIMENT 1.....	59
3.1	Mètodes	59
3.1.1	Subjectes	60
3.1.2	Intervenció quirúrgica	61
3.1.3	Laberint Elevat en Creu (LEC)	62
3.1.4	Memòria de Reconeixement d'Objectes (MRO)	63
3.1.5	Eutanàsia i perfusió intracardíaca	67
3.1.6	Determinació macroscòpica del volum de la lesió i de diferents estructures	67
3.1.7	Anàlisis estadístiques	68
3.2	Resultats.....	69
3.2.1	Laberint Elevat en Creu (LEC)	69
3.2.2	Memòria de Reconeixement d'Objectes (MRO)	70
3.2.3	Valoració histològica	74
3.3	Discussió.....	76
3.3.1	Dèficits de MRO induïts pel nostre model de TBI	76
3.3.2	Evolució temporal dels dèficits de memòria.....	78
3.3.3	Edat dels animals en el moment de la inducció del TBI i en el moment de les proves conductuals	79

3.3.4	Efectes del TBI sobre la reactivitat emocional i l'activitat locomotora.....	81
3.3.5	Efectes del TBI sobre les mesures macroscòpiques del dany cerebral.....	82
3.4	Conclusions	83
4.	EXPERIMENT 2.....	87
4.1	Mètodes	87
4.1.1	Subjectes	88
4.1.2	Intervenció quirúrgica	88
4.1.3	Exercici en la roda d'activitat	88
4.1.4	Memòria de reconeixement d'objectes (MRO)	90
4.1.5	Histologia.....	90
4.1.6	Anàlisis estadístiques	100
4.2	Resultats.....	101
4.2.1	Estat dels subjectes i evolució del pes	101
4.2.2	Evolució de l'exercici físic: distància, temps i velocitat.....	103
4.2.3	Memòria de Reconeixement d'Objectes.....	107
4.2.4	Avaluació macroscòpica de la lesió	115
4.2.5	Neurogènesi en el gir dentat.....	117
4.2.6	Neuroprotecció: cèl·lules NeuN+ en l'hilus del gir dentat	127
4.2.7	Neuroprotecció: cèl·lules NeuN+ en l'escorça perirhinal	135
4.2.8	Neuroinflamació: cèl·lules iba1+ reactives en l'hipocamp dorsal.....	135
4.2.9	Taula resum dels resultats	144
4.3	Discussió.....	144
4.3.1	Efectes del CCI.....	145
4.3.2	Conducta dels animals en la roda d'activitat	150
4.3.3	Efectes de les diferents pautes d'exercici físic sobre la MRO i sobre les mesures histològiques	150
4.3.4	Relació entre els nivells d'exercici físic i la magnitud dels seus efectes beneficiosos.....	158
5.	Discussió general.....	163
6.	Conclusions	169
7.	Bibliografia	173

Abreviatures

ANOVA	Anàlisi de la variància
BDNF	Factor neurotròfic derivat del cervell (Brain-derived neurotrophic factor)
BHE	Barrera hematoencefàlica
CaMK	proteïna quinasa dependent de Ca ²⁺ /calmodulina
CCI	Impacte cortical controlat (Controlled cortical Impact)
CREB	cyclic AMP response element-binding protein
DCX	Doblecortina
FPI	Dany cerebral per percussió de fluids (Fluid percussion injury)
GH	Hormona del creixement
Iba1	Ionized calcium-adaptor 1
IGF-1	Factor de creixement insulínic 1 (Insulin growth factor-1)
IL	Interleucina
LEC	Laberint elevat en creu
MANOVA	Anàlisi multivariat de la variància
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens (Mitogen-activated protein kinase)
MGV	Mitjana del valor de gris (Mean gray value)
MLG	Model linial general
MRO	Memòria de reconeixement d'objectes
NeuN	Proteïna nuclear neuronal
NGF	Factor de creixement nerviós (Nerve growth factor)
NSC	Cèl·lules mare neurals (Neural stem cells)
PRhc	Escorça perirhinal
TBI	Dany cerebral traumàtic (Traumatic brain injury)
TNFα	Factor de necrosi tumoral alfa
TrkB	Receptor tirosina quinasa B
ROS	Espècies reactives de l'oxigen (Reactive oxygen species)
SNC	Sistema nerviós central
VEGF	Factor de creixement vascular endotelial (Vascular endothelial growth factor)

**PLANTEJAMENT, HIPÒTESI I OBJECTIUS
EXPERIMENTALS**

1. Plantejament, hipòtesi i objectius experimentals

Plantejament

El dany cerebral traumàtic (traumatic brain injury, TBI) és una condició adquirida a conseqüència d'una força mecànica externa que produeix una disrupció en el funcionament normal del cervell (Pervez, Kitagawa, & Chang, 2018). Donada l'alta prevalença que té en la societat arreu del món, i que sovint s'acompanya de seqüeles motores, cognitives i/o emocionals (que poden persistir a llarg termini), constitueix una de les principals causes d'incapacitat severa i crònica. Entre les diferents seqüeles, el dèficit cognitiu (i en concret les alteracions mnèsiques) acostuma a ser el més comú i persistent (Chen & D'Esposito, 2010; Carron, Alwis, & Rajan, 2016; Cristofori & Levin, 2015). Addicionalment, les persones que han patit un TBI presenten una mortalitat més elevada i un major risc de desenvolupar trastorns neurològics, psicopatològics i/o malalties neurodegeneratives (Donat, Scott, Gentleman, & Sastre, 2017). Per aquests motius esdevé un problema de salut pública i és necessari trobar tractaments adequats, doncs a dia d'avui, aquests són escassos, d'efectivitat limitada i majoritàriament se centren a actuar durant la fase aguda (Carron, Alwis, & Rajan, 2016).

El TBI s'inicia amb un dany primari a conseqüència d'una força externa que deforma el teixit cerebral i causa mort cel·lular necròtica a la zona de l'impacte. Aquesta força pot produir un dany focal, difús o, el que és més habitual, una combinació d'ambdós tipus (Corrigan, Mander, Leonard, & Vink, 2016; McAllister, 2011). Seguidament es posa en marxa el dany secundari degut al desequilibri de l'homeòstasi iònica i a la disrupció de la barrera hematoencefàlica (BHE), que desencadena canvis en diferents cascades bioquímiques i cel·lulars. Aquest fet es tradueix en mort cel·lular apoptòtica i neuroinflamació que poden quedar activades durant setmanes, mesos i inclús anys després del traumatisme (Johnson et al., 2013; Kinoshita, 2016; Werner & Engelhard, 2007).

Entre els diferents tractaments que s'investiguen, l'exercici físic podria ser un bon candidat per reduir el dany secundari i les seqüeles del TBI, en especial les cognitives. En primer lloc, l'exercici físic exerceix efectes beneficiosos sobre la salut en general i

les funcions cognitives en persones i animals sans de totes les edats (Archer et al., 2016; Mandolesi et al., 2018). En concret, la millora de les funcions cognitives s'associa a un augment de la neuroplasticitat, doncs l'exercici genera canvis estructurals en el cervell, a partir de l'augment de proteïnes relacionades amb la plasticitat sinàptica i la supervivència cel·lular (Mandolesi et al., 2018; Cobianchi, et al., 2017). Però l'exercici no només s'ha mostrat beneficiós en persones sanes, sinó que també s'ha mostrat capaç de reduir el declivi cognitiu degut a l'envelliment, així com el deteriorament cognitiu lleu, o a múltiples patologies. A més, també s'ha vist que pot reduir el risc de patir malalties neurodegeneratives i trastorns psicopatològics (Baker et al., 2010; Davis et al., 2013; Tarumi & Zhang, 2014; Spielman, Little, & Klegeris, 2016; (Chen, Zhang, & Huang, 2016). Aquest aspecte és rellevant, doncs tal com hem comentat, les persones amb TBI presenten un major risc de patir-les. També s'ha descrit que té efectes antiinflamatoris en diferents trastorns neurològics, malalties neurodegeneratives i en el mateix TBI (Spielman, Little & Klegueris 2016). Un altre aspecte positiu de l'exercici és que millora el rendiment cardiorespiratori associat a un estil de vida sedentari. Val a dir que les persones amb TBI sovint presenten una capacitat aeròbica reduïda en comparació amb persones sedentàries que no han patit un traumatisme (Amonette & Mossberg, 2013; Morris et al., 2016). Addicionalment, un alt rendiment aeròbic s'associa amb un millor rendiment cognitiu en persones amb demència (Hollamby, Davelaar, & Cadar, 2017). Juntament amb tots aquests efectes de l'exercici, que indiquen que podria ser un bon tractament per a reduir les seqüeles cognitives, s'hi afegeix el fet que, a més, es tracta d'una estratègia no farmacològica, econòmica i no invasiva, i per tant, fàcilment a l'abast de tothom a llarg termini (Morris et al., 2016; Alkadhi, 2018; Wogensen, Malá, & Mogensen, 2015).

Alguns estudis han avaluat els efectes de l'exercici com a tractament per a reduir el dèficit cognitiu en pacients amb TBI, amb resultats positius (Chin, et al., 2015; Vanderbeken & Kerckhofs, 2017). Malgrat això, a dia d'avui encara hi ha pocs estudis que permetin avaluar i comparar aquests efectes (Morris et al., 2016). Això es deu principalment a la gran heterogeneïtat clínica que presenta el TBI, tant pel que fa a la diversitat de dèficit funcional, com als diferents perfils de lesions (edat dels pacients, temps transcorregut des del dany, tipus de dany cerebral, etc.) (Morris et al., 2016). A

més, també es necessiten més estudis que avaluin l'efecte de diferents intensitats d'exercici i la durada de la intervenció, així com el moment d'inici post-TBI. Cal destacar que una dificultat afegida és el fet que en molts estudis de TBI en humans manca un grup control (Lal, et al., 2018).

Donada la limitació dels estudis en humans amb TBI, els models preclínics de dany cerebral traumàtic en rosegadors semblen necessaris per a estudiar els mecanismes fisiopatològics, bioquímics i conductuals del TBI, així com per avaluar el potencial terapèutic de l'exercici físic en unes condicions més controlades, tot i les limitacions que suposa tant el fet d'utilitzar un model de lesió que no pot reproduir tot l'espectre observat en la clínica, com el fet d'utilitzar un model animal (O'Connor, Smyth, & Gilchrist, 2011). En estudis que utilitzen aquests models s'ha vist que l'exercici físic millora les funcions cognitives i exerceix efectes neuroprotectors, reduint la neuroinflamació, el volum de la lesió i la mort cel·lular, i a més fomenta la neuroreparació mitjançant l'increment de la neurogènesi, l'angiogènesi i la gliogènesi (Piao et al., 2013; Wogensen, Malá, & Mogensen, 2015; Jacotte-Simancas et al., 2015).

A dia d'avui, no obstant, es requereixen més estudis sobre quines serien la quantitat i intensitat de l'exercici, així com les pautes temporals apropiades, per a optimitzar els seus efectes beneficiosos (Alkadhi, 2018). Respecte a les pautes temporals hi ha varis aspectes a tenir en compte. En primer lloc, el moment d'inici de l'exercici després del dany cerebral, ja que es coneix l'existència d'una finestra terapèutica concreta que varia en funció de la severitat de la lesió (Griesbach, Gómez-Pinilla, & Hovda, 2007), de tal manera que l'inici de l'exercici durant la fase aguda, poc després de la lesió, fins i tot pot tenir efectes perjudicials (Griesbach, et al., 2004; Griesbach, Gómez-Pinilla, & Hovda, 2007). En aquest sentit, alguns estudis han mostrat que l'exercici voluntari d'inici primerenc no només no millora, sinó que fins i tot pot empitjorar, les deficiències cognitives (Crane, Fink, & Smith, 2012), degut probablement a que es perden els seus efectes neuroprotectors, es redueixen els mecanismes compensatoris endògens que es donen durant la fase aguda del TBI, i pot augmentar la neuroinflamació (Piao et al., 2013; Griesbach, Gomez-Pinilla & Hovda, 2004). Tanmateix, hi ha estudis que no troben aquests efectes amb l'inici primerenc. En un

experiment es va observar just el contrari, ja que l'inici primerenc de l'exercici resultava més beneficiós que el demorat. En aquest cas però, es tractava d'exercici forçat (Chen et al., 2013). A més, hi ha estudis que, tot i no comparar diferents moments post-TBI d'inici de l'exercici voluntari, han obtingut resultats positius amb el seu inici immediat a la lesió (Wu, Ying, & Gomez-Pinilla, 2013; Krishna et al., 2017). Cal tenir en compte que el tipus de model de lesió utilitzat i la severitat del dany induït varien en els diferents estudis i aquests factors poden influenciar en la divergència de resultats entre experiments.

Un altre aspecte que hem de tenir en compte en l'estudi dels efectes de l'exercici sobre el dèficit cognitiu és quines conseqüències té la seva interrupció. Tot i que no sembla haver-se estudiat en animals amb dany cerebral, en animals sans s'ha vist que la interrupció de l'exercici disminueix els nivells de molècules associades a la plasticitat sinàptica (Berchtold, et al., 2005; Berchtold, Castello, & Cotman, 2010) i fins i tot pot reduir-les a nivells per sota dels d'animals sedentaris (Radak et al., 2006). També pot exercir un efecte rebot negatiu en la neurogènesi, amb nivells per sota dels animals sense accés a roda d'activitat (Nishijima, et al., 2017). A més, els beneficis a nivell cognitiu no semblen mantenir-se quan l'exercici s'interromp (Hopkins, Nitecki, & Bucci, 2011). Així doncs, l'estudi dels efectes de la interrupció de l'exercici podria ser rellevant, ja que ens donaria dades sobre la necessitat de mantenir la pràctica d'exercici de manera regular i a llarg termini.

Un tercer aspecte important en les pautes temporals d'aplicació de l'exercici és la durada del tractament. El més habitual en els estudis d'exercici voluntari amb rosegadors amb TBI és realitzar intervencions d'entre 1 i 4 setmanes d'exercici (Griesbach, Gomez-Pinilla & Hovda, 2004; Griesbach, Gomez-Pinilla & Hovda, 2007; Crane, Fink & Smith, 2012; Wu, Ying & Gomez-Pinilla, 2013; Krishna et al., 2017; Jacotte-Simancas et al., 2015; Piao et al., 2013), però no sembla haver-hi gaires treballs amb TBI en què s'hagi aplicat un tractament d'exercici de major durada. En un altre model de dany cerebral adquirit (isquèmia), els ratolins que tenien accés a exercici voluntari durant prop de 6 setmanes van mostrar una reversió del dèficit de memòria espacial, així com un increment de la supervivència de noves cèl·lules formades durant l'exercici i d'un factor de transcripció associat a plasticitat sinàptica en el gir dentat (Luo et al., 2007).

Objectiu general

Tenint en compte l'exposat, l'objectiu general del present treball és estudiar els aspectes temporals (inici, durada i interrupció) del tractament amb exercici físic voluntari, sobre els dèficits de memòria induïts per TBI, així com els mecanismes moleculars pels quals les diferents pautes d'exercici tindrien els seus efectes beneficiosos.

En el nostre laboratori, hem constatat que 3 setmanes d'exercici físic voluntari iniciat 4 dies després de la lesió reverteix el dèficit de memòria de reconeixement d'objectes (MRO), en rates amb TBI induït per impacte cortical controlat (controlled cortical impact, CCI), i redueix la pèrdua neuronal en diferents regions cerebrals, alhora que augmenta la neurogènesi en el gir dentat (Jacotte-Simancas et al., 2015). D'acord amb el tipus i severitat de la lesió induïda en aquest treball previ, 4 dies de demora és un període suficient per no interferir amb la resposta compensatòria endògena que té lloc durant la fase aguda del TBI. A més, una intervenció de 3 setmanes d'exercici continuat és també suficient per a observar tant els beneficis neuroprotectors de l'exercici físic (disminució de pèrdua neuronal), com els neuroreparadors (augment del número de neurones noves a l'hipocamp), així com per reduir el dèficit de memòria.

Per tal de poder estudiar els aspectes temporals del tractament d'exercici, havíem d'establir en primer lloc, si els dèficits de memòria observats a les 3 setmanes de la lesió es mantenien a més llarg termini. Amb aquesta finalitat, vam dissenyar un primer experiment per comprovar si el dèficit mnèsic en la MRO observat en el nostre model de lesió es mantenia a les 6 setmanes. Un cop establert que les deficiències cognitives del nostre model eren cròniques, vam portar a terme un segon experiment per estudiar els efectes de diferents pautes temporals d'exercici físic (demorat, interromput o continuat) sobre el dèficit en la MRO, així com els mecanismes d'acció principalment implicats en cadascuna de les pautes.

Hipòtesi

La nostra hipòtesi de treball és que l'exercici físic pot reduir el dèficit cognitiu produït per TBI mitjançant els seus efectes neuroprotectors (principalment, reducció de la mort neuronal i de la resposta neuroinflamatòria) i neuroreparadors (principalment, plasticitat sinàptica i neurogènesi).

Una conseqüència d'aquesta hipòtesi és que l'acció neuroprotectora de l'exercici físic seria especialment eficaç durant el període agut i subagut després de la lesió, coincidint amb el període en què el teixit cerebral és més susceptible a la mort neuronal secundària i la neuroinflamació; en canvi, els efectes plàstics i neuroreparadors es mantindrien durant el curs del tractament amb exercici físic, independentment de quan s'iniciés aquest, però s'esvairien després de la seva interrupció.

D'acord amb aquesta hipòtesi, és d'esperar que l'exercici físic tingui efectes neuroprotectors més marcats quan s'inicia pocs dies després de la lesió, en comparació a quan s'inicia amb molta demora. En canvi, els efectes neuroreparadors de l'exercici físic s'haurien d'observar independentment del temps que transcorre entre la lesió i l'inici del tractament, tot i que s'atenuarien o desapareixerien un cop finalitzat l'exercici. Per tant, el tractament més eficaç hauria de ser l'exercici iniciat poc després de la lesió i mantingut de manera crònica, ja que es beneficiaria tant dels efectes neuroprotectors com dels neuroreparadors.

Objectius de l'Experiment 1

D'acord amb l'objectiu general del treball, i per tal de poder establir diferents pautes temporals de tractament mitjançant exercici físic eficaces per a reduir el dèficit de memòria, primer era necessari determinar si aquest deteriorament cognitiu observat 3 setmanes després de la lesió, es mantenia a més llarg termini.

A més, donat que el TBI pot acompanyar-se d'alteracions emocionals, les quals poden influir en l'execució de tasques de memòria, es va avaluar l'existència de canvis en la reactivitat emocional, la conducta exploratòria i la conducta locomotora en funció del temps post-TBI transcorregut.

Concretament, els objectius específics de l'Experiment 1 van ser comparar l'efecte del TBI als 21 dies i als 42 dies de la lesió, sobre:

- 1) La memòria, mitjançant la tasca de MRO, tant a curt termini (3 hores), com a llarg termini (24 hores)
- 2) La reactivitat emocional, mitjançant el Laberint Elevat en Creu (LEC)
- 3) L'exploració i l'activitat locomotora
- 4) Diverses mesures macroscòpiques de la lesió

Objectius de l'Experiment 2

L'Experiment 2 es va dur a terme per a estudiar l'impacte de tres pautes temporals de tractament mitjançant exercici físic voluntari (roda d'activitat) sobre el dèficit de MRO, i per a avaluar els mecanismes d'acció implicats (neuroprotectors i/o neuroreparadors) en cadascuna d'elles. Amb aquesta finalitat, es van establir les següents pautes de tractament:

- Exercici demorat: 3 setmanes d'exercici físic iniciat 4 setmanes després de la lesió (inici demorat, durant el període crònic de la lesió) i mantingut fins al final de l'experiment.
- Exercici interromput: 3 setmanes d'exercici físic iniciat 4 dies després de la lesió (inici durant el període subagut post-TBI) i interromput 4 setmanes abans d'iniciar l'entrenament en la MRO.
- Exercici continuat: 7 setmanes d'exercici físic, iniciat 4 dies després de la lesió (en el període subagut post-TBI) i mantingut fins al final de l'experiment.

Els objectius específics de l'Experiment 2 van ser:

- 1) Determinar si les tres pautes temporals d'exercici físic redueixen el dèficit de MRO produït pel TBI.
- 2) Estudiar si les tres pautes de tractament tenen efectes neuroprotectors i neuroreparadors, mitjançant l'anàlisi de:

- a. Diferents mesures macroscòpiques de la lesió
 - b. El número de neurones madures (cèl·lules NeuN+) en l'hilus del gir dentat i l'escorça perirhinal
 - c. La neuroinflamació (cèl·lules Iba1+) en l'hipocamp dorsal
 - d. La neurogènesi (cèl·lules DCX+) en la capa granular del gir dentat
- 3) Determinar si la reducció i/o reversió del dèficit de la MRO de les diferents pautes de tractament està més relacionada amb una acció neuroprotectora, una acció neuroreparadora, o ambdues.

MARC TEÒRIC I ANTECEDENTS EXPERIMENTALS

2. Marc teòric i antecedents experimentals

2.1 Dany cerebral traumàtic (TBI)

El dany cerebral traumàtic és una condició adquirida, a conseqüència d'una força mecànica externa, que produeix una deformació del teixit cerebral i genera una alteració en el funcionament del cervell (Pervez et al., 2018). El TBI presenta una gran heterogeneïtat en perfils de lesions, tant en la localització i severitat de la lesió, com en l'edat dels pacients, fet que encara dificulta més el seu estudi, així com el seu maneig clínic (Morris et al., 2016).

Pel que fa a la severitat de la lesió, aquesta es valora en funció de l'escala de coma de Glasgow, que avalua el nivell de consciència del pacient, a partir de la resposta motora, la verbal i el reflex ocular, i que s'administra en les 24 primeres hores després del dany. Una puntuació entre 3-8 es considera un TBI sever, entre 9-13 moderat i 14-15 lleu. En el TBI lleu és usual experimentar símptomes postcommoció. El criteri diagnòstic de símptomes postcommoció requereix la presència de com a mínim 3 dels següents 8 símptomes: cefalea, fatiga, irritabilitat, insomni, problemes de concentració, mareig, dificultats de memòria o intolerància a l'estrès, a les emocions o a l'alcohol (Boake et al., 2005).

El TBI presenta una alta prevalença i pot acompanyar-se de seqüeles cròniques, especialment cognitives. També pot presentar comorbiditat amb altres trastorns neurològics i psicopatològics i desencadena una resposta inflamatòria que s'associa a un major risc de desenvolupar malalties neurodegeneratives (Kokiko-Cochran & Godbout, 2018). Per aquests motius, es considera un problema de salut pública. A més, a dia d'avui no existeix cap tractament capaç de revertir els seus efectes (Carron et al., 2016).

2.1.1 Dades epidemiològiques

Resulta molt difícil saber quina és la prevalença real del TBI, degut a múltiples factors, entre altres perquè una part dels casos (especialment els lleus) no arriben ni tan sols a ser diagnosticats. També perquè en els estudis epidemiològics sovint s'ha fet una cerca de dades incompleta i poc estandaritzada degut a la manca d'una definició clara del

TBI i, en conseqüència, els criteris d'inclusió a vegades són inconsistents (Peeters et al., 2015; Roozenbeek, Maas, & Menon, 2013). S'estima que a Europa el TBI presenta una prevalença anual de 1,5 milions d'admissions hospitalàries i de 57.000 morts (Majdan et al., 2016). El TBI pot donar-se a qualsevol edat, però la població que presenta una prevalença més alta és la infantil i adolescent principalment a causa d'accidents de trànsit, caigudes, activitats esportives i maltractament infantil (Thurman, 2016). En els darrers anys, degut a l'augment en l'esperança de vida, la prevalença del TBI està augmentant també en la població d'edat més avançada, principalment per caigudes (Roozenbeek, Maas, & Menon, 2013). El TBI és més freqüent en la població masculina durant la infantesa, adolescència i adultesa, però a partir dels 65 anys és més usual en les dones (Thurman, 2016; Majdan et al., 2016). En termes generals, les causes més freqüents de TBI són accidents automobilístics, activitats esportives, caigudes i accidents per armes de foc (Carron et al., 2016). Malgrat l'alta prevalença que presenta, la majoria (70-80%) dels TBI són classificats com a lleus (commoció cerebral) (Lozano et al., 2015).

2.1.2 Fisiopatologia del dany cerebral

2.1.2.1 Dany primari i dany secundari

El TBI cursa amb un dany primari iniciat en el mateix moment de la lesió, a conseqüència directa d'una força mecànica externa que produeix la deformació del teixit cerebral, compromentent la integritat estructural de les neurones, les cèl·lules glials i els vasos sanguinis (Corrigan, Mander, Leonard, & Vink, 2016), i continua amb un dany secundari que involucra mecanismes fisiopatològics diferents al dany primari. Les lesions generades en el dany primari poden ser de tipus focal: contusions, hemorràgies (subdural, epidural, intraparenquimal, intraventricular i subaracnoidea), o bé de tipus difús: dany axonal produït per lesions amb acceleració/desacceleració (Gaetz, 2004; Werner & Engelhard, 2007). El perfil més comú és una combinació dels dos tipus de lesió (McAllister, 2011), i s'acompanya de mort cel·lular necròtica (Chiu et al., 2016). A conseqüència de la lesió produïda pel dany primari i la disrupció de la BHE, en qüestió de minuts s'inicia el dany secundari, que desencadena canvis en cascades cel·lulars i bioquímiques que poden perdurar fins a setmanes o mesos (Kinoshita, 2016;

Werner & Engelhard, 2007). Hi ha varis factors que contribueixen al dany secundari i que poden portar a una neurodegeneració progressiva, dels quals en destaquen: l'excitotoxicitat, l'augment de l'estrès oxidatiu, la formació d'edema, la neuroinflamació i la mort cel·lular apoptòtica (Corrigan et al., 2016).

Així mateix, es donen canvis en l'homeòstasi iònica i s'ha proposat que l'estirament de les membranes crea microporus que faciliten el flux iònic. La despolarització consegüent permet l'entrada de Ca^{2+} a partir de canals dependents de voltatge, que dona lloc a l'alliberament indiscriminat de neurotransmissors, sent el glutamat el principal implicat en el procés d'excitotoxicitat (Griesbach & Hovda, 2015; Krishnamurthy & Laskowitz, 2016). Concretament, el glutamat augmenta el Ca^{2+} intracel·lular de les neurones postsinàptiques, mitjançant la sobreactivació dels receptors NMDA, a l'hora que promou l'alliberament de neurotransmissors per part d'aquestes neurones, creant un escenari d'excitotoxicitat que queda retroalimentat, a causa de la propagació a les neurones adjacents (Krishnamurthy & Laskowitz, 2016). Addicionalment, hi ha una disminució de GLT-1 -proteïna transportadora de glutamat en astròcits- en l'àrea lesionada i perilesionada (Rao, Dogan, Bowen, Todd, & Dempsey, 2001), factor que incrementa encara més el glutamat extracel·lular i en líquid cefaloraquídi, i consegüentment, fomenta encara més l'excitotoxicitat (Karve, Taylor, & Crack, 2015). L'augment de Ca^{2+} intracel·lular, al seu torn, incrementa el Ca^{2+} mitocondrial, doncs l'òrganul intenta internalitzar el Ca^{2+} i se satura, fet que comporta una fosforilació oxidativa deficient (Krishnamurthy & Laskowitz, 2016). En aquest context, augmenten els nivells d'espècies reactives d'oxigen (reactive oxygen species, ROS) i es donen alteracions en les vies de senyalització claus per la supervivència cel·lular, i consegüentment, s'incrementa l'activació de caspases, que condueixen a la mort cel·lular apoptòtica (Wang & Qin, 2010). La disfunció mitocondrial resulta en un balanç energètic deficient. Amb la finalitat de restablir el flux iònic adequat, les neurones incrementen l'activitat de bombes iòniques, fent que requereixin més energia i per tant, que augmenti el Ca^{2+} mitocondrial, doncs s'esgoten les fonts energètiques. A part del col·lapse mitocondrial, l'entrada de Ca^{2+} també activa proteases, com la calpaïna, que degrada proteïnes del citoesquelet (espectrina, tau, proteïna associada als microtúbuls 2, etc.) produint desestabilització en l'actina del

citoesquelet i els microtúbuls. La calpaïna també pot activar directament la caspasa 3 i promoure la mort apoptòtica. A més, aquesta proteasa també s'encarrega de la proteòlisi del receptor metabotròpic del glutamat mGluR1. Aquest receptor promou tant la neurotoxicitat, mitjançant l'alliberament de Ca^{2+} des del reticle endoplasmàtic, com la neuroprotecció, a través de l'activació de la via de supervivència fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K-Akt). Amb la proteòlisi, només queda activada la cascada neurotòxica (Krishnamurthy & Laskowitz, 2016). En el dany secundari també es dona mort apoptòtica independent de caspases, per dues vies diferents. Una, a conseqüència dels baixos nivells energètics, mitjançant la proteïna poli ADP ribosa polimerasa; la segona, mitjançant factor inductor d'apoptosi degut al canvi en el potencial de membrana mitocondrial (Krishnamurthy & Laskowitz, 2016) (Figura 1).

Una de les conseqüències de la disrupció de la BHE és la fuga de fluids i proteïnes a l'espai extravascular que promouen la formació de l'edema, amb l'agreujant que es dóna un augment de la pressió intracranial (Price, Wilson, & Grant, 2016). Una altra conseqüència de la disrupció de la BHE és la infiltració de cèl·lules immunes perifèriques des del torrent sanguini, augmentant la resposta immune innata iniciada per les cèl·lules gials i en especial per la micròglia (veure apartat 2.1.2.3). Així doncs, la neuroinflamació és un procés que acompanya al dany secundari i pot esdevenir clau en el seu manteniment, incrementant el dany, però també pot exercir efectes reparadors (Corrigan et al., 2016), com es veurà més endavant.

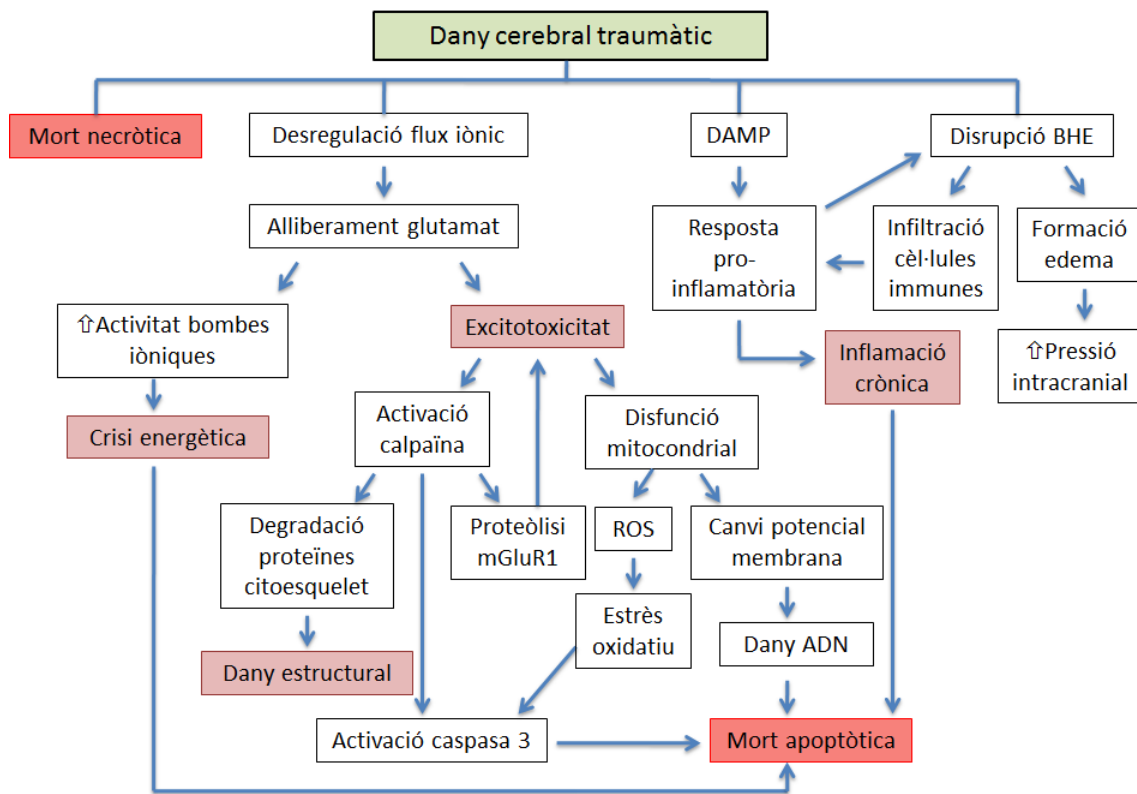


Figura 1: Esquema de la fisiopatologia del TBI. DAMP: patrons moleculars associats al perill; ROS: espècies reactives d'oxigen.

2.1.2.2 Mecanismes de compensació endògena

Durant la primera setmana post-TBI es donen un seguit de processos dinàmics i canvis energètics en el cervell. Les cèl·lules immunes residents del sistema nerviós central (SNC) i les infiltrades a partir de la sang, com els macròfags, responen ràpidament al dany inicial i participen en el procés de reparació (Xu et al., 2017), tot i que sovint, el TBI s'acompanya d'una activació crònica que pot resultar perjudicial (Corps, Roth, & McGavern, 2015). Les cèl·lules glials, en un primer moment, ofereixen un rol neuroprotector, ja que intervien en la fagocitosi de les restes cel·lulars, poden alliberar factors neurotròfics (Jassam, Izzy, Whalen, McGavern, & El Khoury, 2017), així com eliminar el glutamat (Corrigan et al., 2016).

Durant el període de fase aguda del TBI s'ha descrit un augment de l'expressió de gens i proteïnes relacionades amb la plasticitat i la transmissió sinàptica, tals com el factor neurotròfic derivat del cervell (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), el factor de creixement insulínic 1 (insulin growth factor 1, IGF-1), factor de creixement nerviós (nerve growth factor, NGF), sinapsina I, proteïna quinasa activada per mitogens I i II

(mitogen-activated protein kinases I and II, MAPK I i MAPK II), proteïna quinasa II dependent de Ca^{2+} /calmodulina (Ca^{2+} /calmodulin-dependent Kinase II, CAMKII) (Griesbach et al., 2004; Griesbach & Hovda, 2015; Griesbach, Gomez-Pinilla, & Hovda, 2004; Griesbach, Hovda, Molteni, & Gomez-Pinilla, 2002; Madathil & Saatman, 2015). En concret, l'augment de factors neurotròfics és transitori i es creu que es deu a l'excés de neuroexcitació que es dona després del TBI que tindria un rol neuroprotector i neuroreparador durant la fase aguda del dany secundari (Griesbach & Hovda, 2015; Madathil & Saatman, 2015) (veure Figura 2). Les vies de senyalització implicades es veuran en més detall en l'apartat 2.3.3.4. També s'han descrit increments de la proteïna GAP-43 (marcador dels cons de creixement dels axons) (Hyllin, Kerr, & Holden, 2017).

A les 24-48 hores després d'un TBI es promou la proliferació de les cèl·lules mare neurals (neural stem cells, NSC) en la capa subgranular de l'hipocamp adult, indicant una resposta reparadora innata al dany inicial que és responsable de la recuperació espontània. Sovint aquesta resposta reparadora innata no pot compensar la pèrdua cel·lular ni, per tant, evitar l'aparició de dèficits funcionals permanents en els supervivents de dany cerebral, ja que la proliferació de les NSC és transitòria (amb un pic màxim a les 48 hores) i majoritàriament les noves cèl·lules es diferencien en glia. A més, la supervivència de les noves neurones és baixa (Gao & Chen, 2013) i en la seva majoria presenten una localització ectòpica degut a una migració alterada (Ibrahim et al., 2016). Tot i així, s'ha vist que l'administració intraventricular d'un agent antimitòtic durant els 7 dies posteriors al TBI, disminuïa la proliferació en la capa subgranular del gir dentat als 7 dies de la lesió donant lloc a un dèficit de memòria en el laberint aquàtic de Morris (tant en l'adquisició com en la retenció a les 24 h) als 56-60 dies després de la lesió, mentre que les rates lesionades que havien rebut solució vehicle mostraven una recuperació funcional, doncs la seva execució no diferia a la de les sham. En canvi, les rates lesionades que realitzaven el laberint aquàtic de Morris als 21-24 dies després de la lesió mostraven una pitjor execució que les sham, independentment de si havien rebut infusions de l'agent antimitòtic. Aquests resultats suggereixen que la proliferació cel·lular induïda pel TBI en el gir dentat està associada a la recuperació cognitiva espontània després d'un TBI, doncs la seva inhibició impedeix

la reversió del dèficit de memòria que es dona després del TBI (Sun, et al., 2015).

En resum, els canvis esmentats poden donar lloc a una certa compensació endògena espontània mitjançant mecanismes plàstics que inclouen, a part de la neurogènesi mencionada, reorganització cortical de la zona contigua a la lesió, brots axonals, plasticitat dendrítica i angiogènesi (Hylín, Kerr, & Holden, 2017).

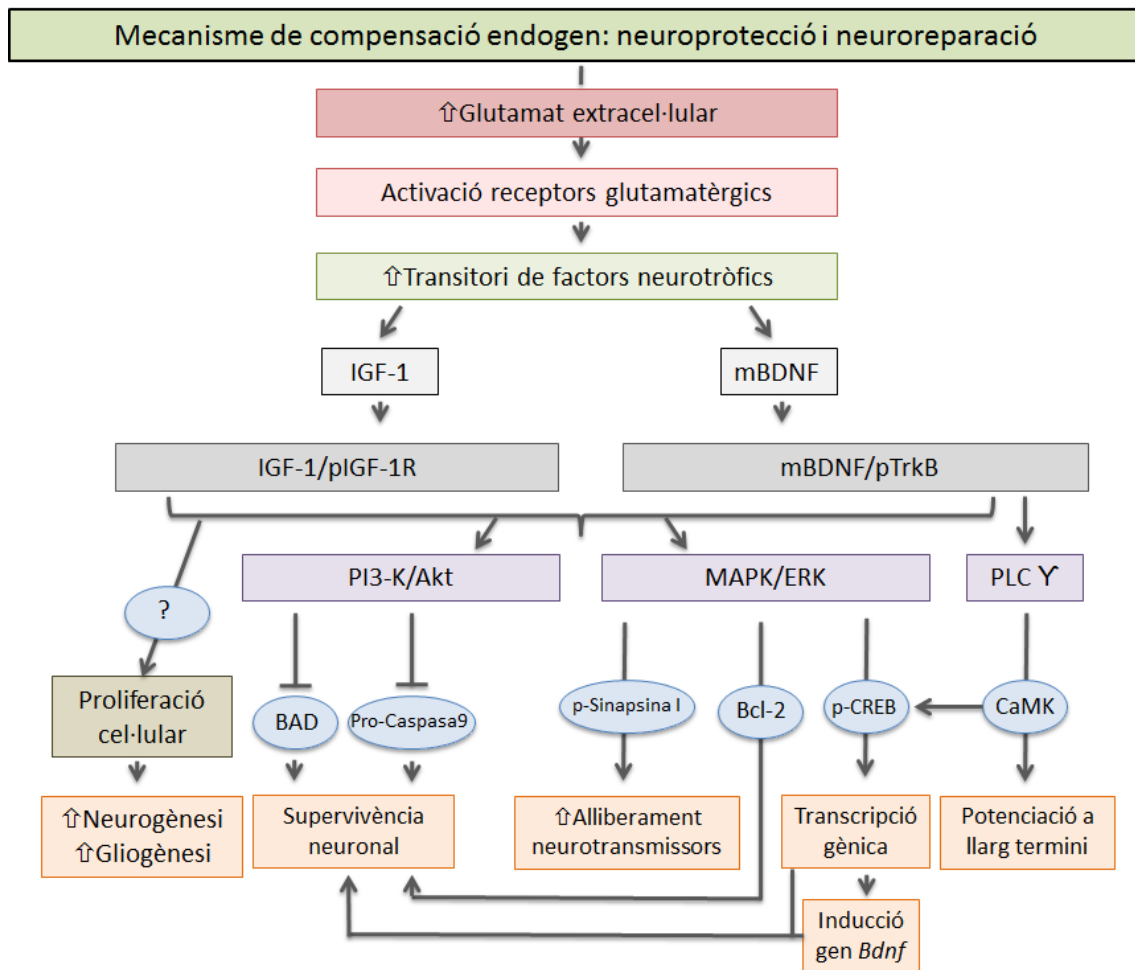


Figura 2: Esquema de les principals vies implicades en el mecanisme compensatori endògen. Bcl-2: proteïna 2 de linfoma de cèl·lules B; BAD: promotor de mort associat a Bcl-2; BDNF: factor neurotròfic derivat del cervell; CamK: proteïna dependent de Ca²⁺/Calmodulina; IGF-1: factor de creixement insulínic 1; p-CREB: cyclic AMP response element-binding protein fosforilat; pTrkB: receptor tirosina quinasa B fosforilat; pIGF-1R: receptor factor de creixement insulínic fosforilat.

2.1.2.3 Paper de la micròglia i els astròcits

Les cèl·lules de micròglia són les cèl·lules immunes residents en el SNC amb capacitats molt diverses, tals com presentació de l'antigen, fagocitosi, reparació del teixit, poda

sinàptica, suport neurotròfic, entre d'altres (Loane & Kumar, 2016). La micròglia pot presentar diferents fenotips i, per tant, diferents funcions, dependent del seu estat d'activació que es caracteritzen per una expressió gènica determinada (Corrigan et al., 2016). S'anomena "en repòs" ("resting") quan presenta una forma ramificada, constantment en moviment mitjançant l'extensió i la retracció dels seus processos, fet que li permet inspeccionar el medi local exterior a partir de la comunicació química amb molècules alliberades principalment per neurones. Donat que està en constant moviment i comprovant el medi, alguns autors prefereixen anomenar-la "vigilant" ("surveying") (Cătălin, et al., 2013).

La neuroinflamació, malgrat no ser el primer esdeveniment després del TBI, intensifica el dany secundari i per això constitueix un procés patològic principal del TBI (Karve, Taylor & Crack 2015; Sajja, Hlavac, & VandeVord, 2016). Les cèl·lules de micròglia són les primeres cèl·lules immunes residents a iniciar la resposta inflamatòria després del dany cerebral (Jassam et al., 2017). Les cèl·lules danyades alliberen patrons moleculars associats al perill (damage-associated molecular pattern molecules, DAMP) com per exemple ATP, que són captats pels receptors tipus Toll (Toll-like receptors, TLR) de les cèl·lules veïnes (Corps et al., 2015) iniciant la resposta immune innata (Jassam et al., 2017), mitjançant l'activació de les vies de senyalització relacionades amb la inflamació en astròcits i micròglia, com el factor nuclear Nuclear-factor kappa B i MAPK (Corrigan et al., 2016). D'aquesta manera, es promou l'alliberament de mediadors proinflamatoris, principalment citocines i quimiocines, que permeten amplificar la resposta inflamatòria activant altres cèl·lules glials (Corrigan et al., 2016). Algunes de les funcions de la glia activada són la fagocitosi de restes de cèl·lules mortes, l'alliberament de mediadors proinflamatoris i de factors de creixement, la formació d'una barrera al voltant de l'àrea lesionada i la modulació de la resposta d'altres tipus cel·lulars (Karve et al., 2015).

La cicatriu glial que es forma al voltant de l'àrea lesionada està formada principalment per astròcits reactius i també per micròglia activada, cèl·lules endotelials, fibroblasts i matriu extracel·lular. Es creu que la cicatriu actua de barrera física per aïllar el teixit danyat i així impedir que les molècules DAMP alliberades per les cèl·lules danyades envaeixin el teixit sa. La cicatriu, però, també té un efecte inhibitori en la regeneració

axonal (Corrigan et al., 2016). Per tant, l'astrogliosi presenta un rol dual ja que, d'una banda, és necessària perquè no s'estengui el dany però, d'altra banda, impedeix la regeneració del teixit danyat (Karve, Taylor & Crack, 2015).

En presència d'un dany cerebral, la micròglia respon a l'ATP extracel·lular mitjançant els receptors purinèrgics metabotròpics P2RY₁₂ que serveixen de receptors quimiotàctics, permetent l'extensió dels processos microglials i la migració cap al teixit danyat (Cătălin et al., 2013). En aquest moment, s'activa i canvia de fenotip, passant d'una morfologia ramificada a amebiode, típica de la fagocitosi, doncs la funció immediata que té és eliminar les restes cel·lulars i moleculars del teixit danyat. La micròglia activada però, pot presentar diferents estats (M1 o M2) (Xu et al., 2017; Donat et al., 2017). Els mediadors proinflamatoris promouen el fenotip clàssicament activat o M1 (Xu et al., 2017). I en resposta, la micròglia M1 allibera més factors proinflamatoris, tals com citocines proinflamatòries, ROS, quimioquines entre d'altres, que activen altres cèl·lules de micròglia i monòcits derivats de la sang que es diferencien en macròfags, amplificant la resposta inflamatòria (Russo & McGavern, 2016). La micròglia que polaritza a M1 no es pot diferenciar dels macròfags infiltrats (Donat et al., 2017). L'activació M1 en un primer moment té un rol neuroprotector si la resposta està ben regulada, doncs és necessària per activar la resposta immune innata i mobilitzar altres cèl·lules. El problema esdevé quan hi ha una sobreactivació, ja sigui perquè es manté crònicament activada o perquè presenta una resposta exagerada; llavors resulta nociva i promou la destrucció del teixit, exacerbant el dany secundari (Loane & Kumar, 2016; Simon et al., 2018). El fenotip M2 presenta diferents variants, cadascuna de les quals ve determinada per diferents tipus de mediadors inflamatoris (Donat et al., 2017). L'estat d'activació alternativa o M2a promou l'alliberament de citocines antiinflamatòries que redueixen els mediadors proinflamatoris, i presenta activitat fagocítica, mentre que l'estat desactivat o M2c participa en processos de reparació de teixit i allibera factors neurotròfics (Simon et al., 2018). Val a dir que les cèl·lules de micròglia no polaritzen en un extrem de l'espectre M1/M2, sinó que presenten fenotips intermedis i segons la ratio M1/M2, afavoreixen la neurodegeneració o la neuroregeneració del teixit (veure Figura 3). Els diferents perfils de micròglia es poden estudiar a partir de marcadors de membrana i de la producció

de citocines (Wang et al., 2013). Com a resposta al dany cerebral, la micròglia expressa un perfil M2 amb un pic màxim als 5 dies, tornant als nivells basals després d'una setmana, mentre que el perfil M1 presenta un pic màxim als 3 dies, però no torna als nivells basals sinó que generalment es manté activat més enllà en el temps (Wang et al., 2013; Turtzo et al., 2014). Tot i així, el patró o perfil fenotípic que presenta depèn del tipus i del grau de severitat de la lesió.

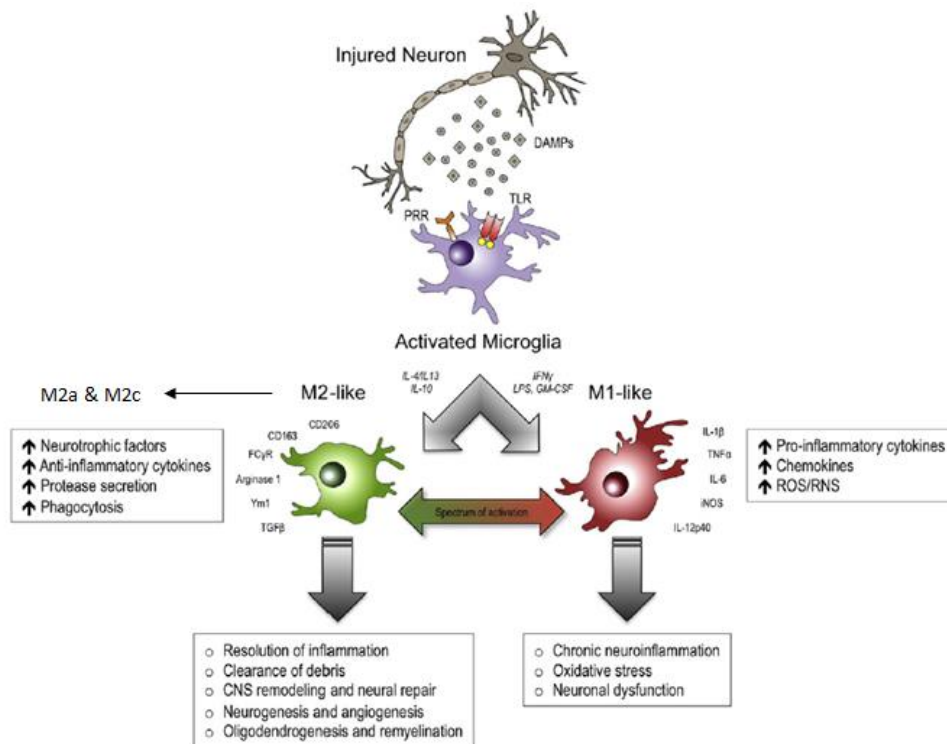


Figura 3: Esquema dels diferents fenotips d'activació de la micròglia (M1/M2) i les principals funcions associades a cadascun d'aquests. Esquema adaptat de Loane i Kumar, 2016.

2.1.3 Conseqüències funcionals del TBI i evolució temporal

El TBI pot generar alteracions a curt i a llarg termini en les funcions cognitives, motores, sensorials i emocionals (Bajwa, Kesavan, & Mohan, 2018). Entre les àrees més vulnerables al TBI es troben el lòbul temporal medial i el còrtex prefrontal. Degut al paper que juga la formació hipocampal en la memòria declarativa, les alteracions mnèsiques són freqüents després d'un TBI (Girgis, et al., 2016; Paterno, Folweiler, & Cohen, 2017). També són freqüents les alteracions de les funcions executives (resolució de problemes i memòria de treball), l'atenció i la velocitat de processament

de la informació (McAllister, 2011), que són funcions que depenen de l'escorça prefrontal.

En l'esfera emocional i conductual, les alteracions amb més prevalença són les relacionades amb el control dels impulsos, l'agressivitat i l'estat d'ànim, com la irritabilitat i en especial la depressió major (Medaglia, 2017). També són habituals els trastorns d'ansietat.

El TBI també és un factor de risc per desencadenar alteracions del son, abús de substàncies (McAllister, 2011) i crisis epilèptiques (Lozano et al., 2015).

La comorbiditat entre diferents àmbits acostuma a ser habitual. En joves amb TBI sever, el fet de presentar pitjors habilitats funcionals durant la fase subaguda (mentre reben rehabilitació) s'ha associat a un major risc de patir problemes psicològics durant la fase crònica (Doser, et al., 2017).

En conjunt, les alteracions que acompanyen al TBI afecten a la vida quotidiana en àmbits com l'ocupació, l'educació i la participació social (Corrigan et al., 2016).

Es poden distingir 3 fases diferents després del TBI: aguda, subaguda i crònica, i cadascuna d'aquestes presenta diferents estats d'evolució dels pacients. Tot i que la durada de cada fase depèn de la severitat de la lesió, en totes elles es donen processos bioquímics associats al dany secundari (Walker et al., 2009). En termes d'intervenció i recuperació, la fase aguda correspon al període que segueix a l'impacte i l'objectiu és establir al pacient, per aquest motiu, coincideix amb el període d'hospitalització. La fase posterior, la fase sub-aguda s'inicia en el moment de l'alta hospitalària. Durant aquest període l'objectiu principal és aconseguir la major recuperació funcional possible. I per últim, la fase crònica fa referència a les conseqüències a llarg termini del TBI (Sans, et al., 2009; Cristofori & Levin, 2015).

Els efectes funcionals del TBI poden ser temporals o crònics (Lozano et al., 2015) i poden variar al llarg del temps, ja sigui per millorar o empitjorar (Wilson et al., 2017), dependent del grau de severitat de la lesió, el tipus de lesió i la localització o l'edat del pacient (Cristofori & Levin, 2015). Tot i que a dia d'avui encara no podem pronosticar amb seguretat quins pacients experimentaran dèficit crònic, un dels millors indicadors

és el període d'amnèsia posttraumàtica. Es considera que aquest període s'ha resolt quan els pacients poden tornar a incorporar nous esdeveniments en la seva memòria de treball. Generalment un període inferior a 2 mesos d'amnèsia posttraumàtica correlaciona amb una baixa probabilitat de discapacitat severa mentre que temps superiors a 3 mesos s'associen a una baixa probabilitat de bona recuperació (Iaccarino, Bhatnagar, & Zafonte, 2015).

Com és esperable, el TBI en persones grans tendeix a tenir una pitjor evolució a llarg termini (Wilson et al., 2017), mentre que els joves amb un grau de severitat lleu són els que presenten una millor recuperació (Medaglia, 2017). Encara que depèn de la severitat de la lesió, la majoria de pacients que han presentat símptomes després del TBI tenen una recuperació total; no obstant, hi ha una proporció de pacients que viuen amb algun grau de disfunció cognitiva permanent (Lozano et al., 2015; Medaglia, 2017).

2.2 TBI en animals

Com hem vist, el TBI presenta una gran heterogeneïtat i complexitat, tant en quant a la fisiopatologia com en la simptomatologia clínica resultant. Els models animals són de gran utilitat per poder entendre millor els mecanismes responsables del dany cerebral i per poder desenvolupar estratègies terapèutiques efectives. Així, els models experimentals de TBI pretenen reproduir les lesions cerebrals observades en la pràctica clínica i fer-les quantificables i replicables en els diferents estudis, tot i que no hi ha cap model que per si sol pugui reproduir tot l'espectre de la clínica del TBI (O'Connor et al., 2011). Tot i així, els models preclínic són essencials per estudiar els aspectes funcionals, bioquímics, moleculars i cel·lulars associats al TBI (Prieto et al., 2009). Per tal de valorar cada model cal tenir en compte els següents aspectes: la força utilitzada per induir la lesió ha de ser quantificable, la lesió ha de ser reproduïble i ha de simular el dany observat en humans, i s'ha de poder mesurar la severitat de la lesió mitjançant proves conductuals, morfològiques, bioquímiques i/o fisiològiques (Prieto et al., 2009).

Per tal d'assegurar que els resultats observats no són deguts a l'anestèsia o a altres variables, com la craniotomia, cal utilitzar animals control o sham, que passin per tot el procés de la intervenció, a excepció de la lesió (Osier & Dixon, 2016; Prieto et al., 2009).

2.2.1 Models experimentals de TBI

Entre els principals models animals de TBI es troben l'impacte cortical controlat, el dany cerebral per percussió de fluids i la caiguda d'un pes.

Impacte cortical controlat (CCI)

El model de l'impacte cortical controlat, o CCI, és un dels més populars i àmpliament utilitzats. Va ser dissenyat per J. W. Lighthall i col·laboradors per induir TBI en fures, a finals dels anys 80, i uns anys més tard va ser adaptat per Dixon i col·laboradors per induir TBI en rates. Avui dia s'utilitza en altres espècies animals, com ratolins, porcs i primats no humans (Osier & Dixon, 2017).

El dispositiu de CCI indueix una lesió a partir d'un impactador sòlid (pistó pneumàtic o electromagnètic) que impulsa una punta que produeix un impacte sobre la duramàter exposada o en alguns casos directament sobre el crani. El dispositiu de l'impactador impulsat pneumàticament requereix d'aire comprimit per ser accionat. En canvi, els dispositius impulsats electromagnèticament no en requereixen (Osier & Dixon, 2017).

Un dels avantatges més notables d'aquest model és que genera un TBI reproducible i comparable en diferents estudis, ja que permet controlar quantitativament diferents paràmetres biomecànics com: la velocitat de l'impacte, la durada d'aquest, la localització de la lesió, així com la seva profunditat. A més a més, va unit a un aparell estereotàxic que permet tenir l'animal fixat i realitzar lesions perpendiculars o amb cert angle respecte a l'encèfal (Osier i Dixon, 2016). Finalment, es considera un bon model per a estudiar els canvis a llarg termini associats al TBI, doncs produeix alteracions cròniques i progressives, com la pèrdua progressiva del teixit i expansió ventricular, així com dèficits cognitius (Osier & Dixon, 2017).

Dany cerebral per percussió de fluids (FPI)

Conjuntament amb el CCI és un dels models animals de TBI més àmpliament utilitzats (O'Connor, et al., 2011). El dany cerebral es produeix per l'impacte d'un fluid sobre la duramàter. En concret, un tub de Plexiglas que conté una solució salina es connecta per un extrem a un cilindre que actua com a transductor i per l'altre, es situa sobre la duramàter, fixant-se al crani mitjançant un tap cimentat. L'alliberament d'un pèndol que impacta sobre el cilindre per l'extrem oposat genera un pols de pressió sobre el fluid que consegüentment causa la deformació de la duramàter exposada. La severitat de la lesió ve determinada per la intensitat del pols de pressió i es pot variar canviant l'altura angular del pèndol (Prieto et al., 2009; Vink, 2017).

Els principals avantatges d'aquest model són que es poden induir diferents graus de severitat de lesió, produeix dany focal però també dany axonal, i genera dèficit en les funcions motores i cognitives. Tot i així, també presenta inconvenients, ja que el dany tissular produït pel pols de pressió no és directament comparable a un impacte mecànic en el teixit i, per tant, al dany observat en la pràctica clínica (O'Connor, et al., 2011).

Caiguda d'un pes

En aquest model s'utilitza la força gravitatòria a partir de la caiguda lliure d'un pes, per a produir un dany focal sobre el crani o la duramàter exposada. La intensitat de la lesió pot variar en funció de l'altura des d'on es deixa caure el pes (Prieto, et al., 2009). Aquest model presenta l'avantatge de ser molt senzill i ràpid de realitzar. Tot i així, no s'utilitza gaire a causa dels inconvenients que presenta. D'una banda, hi ha risc de dany per rebot (Vink, 2017) i d'altra banda, pot donar lloc a una fractura cranial quan el pes es fa caure directament sobre el crani (Prieto, et al., 2009).

2.2.2 Efectes del TBI

En rosegadors, està ben establert que el TBI induït mitjançant diferents models (CCI i FPI), causa alteracions en la memòria espacial en el laberint aquàtic de Morris, com l'increment de la latència per trobar la plataforma i/o menor temps en el quadrant objectiu (Hamm, 1992). En estudis més recents, s'ha pogut observar que aquestes

deficiències s'observen també a llarg termini quan s'avalua als animals als 3 mesos (Titus et al., 2016; Piao et al., 2013) i als 8 mesos (Pöttker et al., 2017) després de la lesió. En versions del laberint aquàtic de Morris que avaluaven la memòria de treball, les rates també seguien mostrant deteriorament cognitiu 4 (Hoskison et al., 2009), i fins i tot 12 mesos després del TBI (Sell, et al., 2017). En altres proves de memòria espacial, com el laberint radial de 8 braços, també s'han observat dèficits en rates quasi 3 mesos després de la lesió (Ko et al., 2018).

El TBI també deteriora la MRO a les 3 setmanes de la lesió, en rates (Jacotte-Simancas et al., 2015), i als 3 mesos, en ratolins (Piao et al., 2013).

Taib et al. (2017) també han trobat una alteració en la flexibilitat cognitiva en una tasca de reversió de l'aprenentatge en el laberint de Barnes, avaluada als 3 mesos de la lesió. Curiosament, aquest dèficit present als 3 mesos després del TBI, no era present durant l'aprenentatge als 15 dies post-TBI ni tampoc en la reversió de l'aprenentatge al cap d'un mes, ni als dos mesos després de la lesió.

Pel que fa a les alteracions motores i vestibulars, els rosegadors lesionats presentaven alteracions de l'equilibri i menys coordinació motora que els sham en el Beam Walking Assay (Sell et al., 2017), i els problemes motors encara es trobaven presents a les dues setmanes de la intervenció (Budinich, et al., 2013) però no persistien als 3 mesos (Sell et al., 2017). En canvi, diverses respostes reflexes que involucren regions sensoriomotors i talàmiques, avaluades mitjançant tests neurològics, es trobaven alterats al cap de pocs dies de la lesió i encara es mantenien als 6 mesos però ja no als 12 mesos, suggerint una recuperació espontània d'aquestes funcions (Sell et al., 2017).

Els estudis amb models animals de TBI han permès entendre millor la fisiopatologia associada al dany cerebral, així com estudiar l'evolució temporal dels dèficits conductuals. Però, a més, permeten investigar possibles tractaments, tant per reduir els processos de mort cel·lular i inflamació, com per a incrementar la neuroreparació del teixit. Aquests estudis són especialment importants ja que a dia d'avui els tractaments són escassos i d'efectivitat limitada i majoritàriament es centren en la fase aguda del TBI (Carron, Alwis & Rajan 2016). Una de les estratègies en investigació que s'ha començat a estudiar com a possible intervenció per al TBI és l'exercici físic, doncs permet reduir el dany secundari mitjançant la neuroplasticitat, ja sigui fomentant la

supervivència cel·lular com incrementant la neurogènesi (Cobianchi et al., 2017; Mandolesi et al., 2018).

2.3 Exercici físic

L'exercici físic es pot definir com una subcategoria de l'activitat física que comporta per una banda, un moviment planificat i estructurat, proporcionat pels músculs esquelètics amb l'objectiu de mantenir o millorar l'estat físic (fitness) i per l'altra, una despesa energètica (Hötting & Röder, 2013).

L'exercici físic redueix el risc de patir malalties coronàries, obesitat, diabetis tipus 2, trastorns psicopatològics com ansietat i depressió, i millora les funcions cognitives (Wogensen et al., 2015; Spielman et al., 2016).

2.3.1 Tipus d'exercici físic en models animals

En models animals s'utilitzen principalment dos paradigmes d'exercici físic: voluntari i forçat. L'exercici voluntari es realitza normalment en rodes d'activitat, mentre que l'exercici forçat es pot realitzar en roda forçada, cinta de córrer o pot consistir en natació forçada. Tots dos paradigmes s'assimilen al patró d'exercici humà en diversos aspectes (Alkadhi, 2018). Tot i així, hi ha certa controvèrsia pel que fa als efectes diferencials que poden tenir cadascun d'ells sobre l'estrès. Si bé alguns estudis mostren que els animals, sans o amb dany cerebral, presenten un augment dels nivells de corticosterona després de ser exposats a exercici forçat (Liu et al., 2009 ; (Ke, et al., 2011; Griesbach, et al., 2012), els resultats d'altres estudis no troben aquest efecte, encara que sí un cert increment de la reactivitat emocional (Leasure & Jones, 2008). També hi ha controvèrsia en quant als beneficis aportats per cada paradigma sobre els nivells de BDNF. Mentre que alguns estudis mostren que tots dos protocols augmenten el BDNF en l'hipocamp (Alomari, et al., 2013), altres només troben augment en els animals exposats a exercici voluntari (Griesbach et al., 2012). Així mateix, s'ha descrit que els animals amb dany cerebral per isquèmia sotmesos a exercici forçat presentaven menys BDNF a l'hipocamp que els animals amb exercici voluntari i fins i tot que els sedentaris (Ke et al., 2011). Tot i que aquestes diferències podrien ser

degudes a l'estrès causat per l'exercici forçat, en alguns casos també podrien ser conseqüència d'un temps d'exposició a l'exercici massa limitat.

Roda d'activitat física voluntària

En el paradigma d'exercici voluntari, els rosegadors tenen accés il·limitat, o limitat a unes hores al dia, a una roda d'exercici físic i, per tant, poden escollir entre estar inactius o en moviment, és a dir, s'exerciten de manera autònoma (Wogensen et al., 2015). Pel que fa al patró d'activitat, està àmpliament descrit que els rosegadors en captivitat mostren activitat espontània i intensiva en la roda. En rates, aquest patró passa per una fase inicial, en què l'activitat va augmentant progressivament. En el cas de les rates mascle Sprague-Dawley s'ha vist que hi ha un pic màxim d'activitat a les 4-5 setmanes que es manté fins les 7-8 setmanes i després decau (Mondon, et al., 1985). Durant el pic màxim les rates amb més activitat presentaven una mitjana de gairebé 13 km al dia. Tot i així, en un estudi s'ha vist que a les 6 setmanes encara pot seguir incrementant la distància en la roda d'activitat (Greenwood et al., 2003).

Els rosegadors segueixen un patró circadià, en el que corren durant la fase fosca i amb el pic màxim entre 1-3 hores després de l'inici de la foscor (Mondon et al., 1985).

Generalment, les variables relatives a la durada, distància i velocitat són enregistrades diàriament. Alguns estudis tenen els animals estabulats individualment, fet que permet conèixer la quantitat d'exercici realitzada per a cada animal, alhora que assegura la disponibilitat de la roda, pel fet de no haver de competir per aquesta. Altres estudis mantenen els animals estabulats en grups. Tot i tenir la limitació de la disponibilitat i de dificultar o impedir el registre de les dades individuals d'exercici, els animals pateixen menys estrès degut a l'aïllament (Murínová, et al., 2017).

Exercici forçat

En l'exercici forçat, els nivells d'activitat (velocitat, distància i temps) són limitats externament, a excepció de la natació forçada on només es pot controlar el temps que l'animal està nedant a l'aigua. En aquest paradigma, els animals generalment estan estabulats en grups per tal d'evitar l'estrès addicional que suposa l'aïllament (Murínová et al., 2017).

Cinta de córrer (Treadmill)

En la cinta de córrer el temps, la velocitat i l'angle d'inclinació o pendent que determinen la intensitat de l'exercici són ajustats per l'experimentador (Abreu et al., 2016). Sovint s'utilitza un xoc elèctric per evitar que l'animal es quedi al final de la cinta sense córrer. Altres estudis utilitzen el contacte amb l'experimentador per evitar l'ús d'estimulació aversiva.

Aquest tipus d'exercici requereix un període d'habitució a la cinta, i la distància i velocitat van augmentant progressivament fins al límit estipulat per l'experimentador. El fet que es pugui ajustar la velocitat permet realitzar pautes d'entrenament de diferents intensitats (Abreu et al., 2016).

Roda forçada

En aquest paradigma, tant la distància com el temps i la velocitat són ajustats per l'experimentador. Igual que el treadmill, permet realitzar pautes d'entrenament de diferents intensitats. Un avantatge que presenta en comparació al treadmill és que no cal estimulació aversiva per tal que l'animal realitzi la pauta d'entrenament estipulada.

2.3.2 Efectes beneficiosos de l'exercici físic sobre les funcions cognitives en el dany cerebral

L'exercici físic exerceix efectes beneficiosos en les funcions cognitives, tals com: l'atenció, la memòria, la velocitat de processament de la informació i les funcions executives en persones i animals sans de totes les edats (Tarumi & Zhang, 2014; Mandolesi et al., 2018; de Sousa et al., 2018); Stimpson, Davison, & Javadi, 2018; Bolz, Heigele, & Bischofberger, 2015; Cassilhas et al., 2012). A més, redueix el declivi cognitiu degut a l'envelliment així com el risc de patir malalties neurodegeneratives (Archer et al., 2016; Duzel, Van Praag, & Sendtner, 2016). Per tant, l'exercici ofereix una estratègia no farmacològica i no invasiva per a prevenir o tractar el deteriorament cognitiu de forma econòmica i aplicable a llarg termini (Alkadhi, 2018; Wogensen et al., 2015; Morris et al., 2016).

2.3.2.1 Estudis en humans

Els efectes neuroprotectors de l'exercici físic també s'han observat després d'un dany cerebral, ja sigui TBI o isquèmia, i de lesions medul·lars (Cobianchi et al., 2017). Per tant, l'exercici pot ser una bona estratègia terapèutica per a promoure la recuperació i la plasticitat, així com per disminuir el risc de patir malalties associades a un estil de vida sedentari que sovint acompanya a les persones que han viscut un TBI (Mossberg, Amonette, & Masel, 2010). Se sap que períodes perllongats d'inactivitat física deterioren la regulació cerebrovascular, i les alteracions en el flux cerebral podrien comportar un declivi en les funcions cognitives (Tan, et al., 2014). En aquest sentit, les persones amb TBI presenten una reducció en el fitness cardiorespiratori (Amonette & Mossberg, 2013) i aquesta reducció en la capacitat aeròbica s'ha associat a una deficiència en l'hormona del creixement (GH) (Mossberg, et al., 2008), que presenta una elevada prevalença en pacients amb TBI (Kreber, Griesbach, & Ashley, 2016).

Tanmateix, però, encara són escassos els estudis que han examinat els possibles beneficis de l'exercici físic en pacients amb TBI. En un d'aquests estudis (Chin et al., 2015) es va observar que una pauta d'exercici vigorós en cinta de córrer (70-80% HRR) durant 12 setmanes, 3 sessions de 30 min per setmana, millorava les funcions executives respecte el nivell basal d'adults joves amb TBI. Aquestes millores s'associaven a un augment del fitness cardiorespiratori (VO_{2peak}). També hi havia un augment del llindar anaeròbic i una disminució de l'experiència de fatiga per part dels participants. Aquestes dades suggereixen que les persones amb dany cerebral adquirit s'adapten a l'exercici de manera similar a la població general (Chin et al., 2015). En un altre estudi (Damiano et al., 2016), adults joves i de mitjana edat amb símptomes crònics a conseqüència d'un TBI, van realitzar entrenament amb bicicleta el·líptica durant 8 setmanes. Aquest entrenament es va associar a una millora de la funció motora (disminució del temps de reacció en el control voluntari i autonòmic de l'equilibri) i en la qualitat del son, respecte els nivells basals. En canvi, no es va trobar cap millora significativa en les funcions cognitives avaluades (atenció, memòria a curt i a llarg termini) ni en les emocionals (ansietat i depressió). Tot i així, en aquest estudi no es van registrar variables fisiològiques que permetessin estimar la intensitat de l'exercici realitzat.

En un altre estudi, nens i adolescents amb TBI lleu, van realitzar dues sessions de 8 min d'exercici immediat en bicicleta a nivell sub-màxim (sense mesures fisiològiques, a partir d'una escala d'esforç autopercebut). La primera sessió es realitzava després de 2 dies sense patir símptomes postcommoció (una setmana després del TBI) i la segona, al cap de 8 dies. Es prenen mesures pre- i postexercici en ambdues sessions. Els resultats van indicar que dues de les funcions cognitives avaluades empitjoraven després de l'exercici i també en la segona sessió respecte la primera (processament d'informació, presa de decisions). La memòria de treball es mantenia igual. L'aprenentatge, tot i que en la primera intervenció millorava després de l'exercici, en la segona empitjorava. Aquest empitjorament a la segona sessió podria estar influït pel fet que els participants havien tornat a reprendre les activitats escolars i, per tant, podien presentar més nivells de fatiga. Tot i així, els resultats també podrien ser atribuïbles, en part, al fet que els autoregistres de símptomes postcommoció utilitzats (CogSport SS) no fossin prou acurats o que el temps de recuperació fos insuficient, ja que les funcions cognitives dels pacients en condicions de demandes ambientals estressants encara estaven compromeses (Manikas, et al., 2017). En un altre estudi realitzat en adolescents que havien patit un TBI lleu i presentaven símptomes postcommoció persistents (12 setmanes després del TBI), l'exercici físic millorava aquesta simptomatologia. En concret, els participants eren sotmesos o bé a un entrenament aeròbic en bicicleta al 80% del nivell capaç d'exacerbar els símptomes o bé a una intervenció d'estiraments del cos sencer, durant 6 setmanes. A la setmana 7, ambdues intervencions milloraven la simptomatologia, tot i que des de la setmana 1 la intervenció d'entrenament aeròbic va resultar ser la més efectiva (Kurowski et al., 2017).

Així doncs, si bé l'exercici sembla millorar significativament els símptomes després d'un TBI lleu, encara no hi ha suficients estudis controlats aleatoritzats que avaluïn diferents aspectes de la pauta del tractament, tals com: moment d'inici respecte a la lesió, durada, intensitat, etc., per tal de conèixer de forma clara els efectes que té l'exercici en aquests pacients (Morris et al., 2016; Lal et al., 2018).

Per tant, conèixer la pauta d'exercici que més beneficis aporta a nivell cognitiu en subjectes amb TBI és un aspecte rellevant per a poder aplicar un tractament eficaç mitjançant exercici físic.

2.3.2.2 Estudis en animals

L'exercici físic voluntari pot revertir el dèficit de memòria en models animals de TBI. Aquests efectes s'han observat en diversos estudis que avaluen les funcions mnèsiques, tant de tipus espacial com no espacial i que utilitzen diferents models de lesió. En concret, ha mostrat ser eficaç per revertir el dèficit de MRO induït pel TBI en rates què han realitzat exercici durant 3 setmanes i l'han iniciat 4 dies després de la lesió (Jacotte-Simancas et al., 2015). En un estudi de Piao et al. (2013) van observar que els ratolins lesionats i sotmesos a 4 setmanes d'exercici iniciat a les 5 setmanes post-TBI milloraven respecte els sedentaris tant en la MRO com en el laberint aquàtic de Morris. Griesbach et al., (2004) també van trobar que en les rates amb accés a roda d'activitat durant 1 setmana, l'exercici iniciat a les 2 setmanes després de la lesió era capaç de millorar el dèficit de memòria espacial en el laberint aquàtic de Morris. També s'ha observat que l'exercici immediat a la lesió revertia el dèficit de memòria en rates, en altres proves de memòria espacial com laberint de Barnes (Krishna et al., 2017).

L'exercici forçat en cinta de córrer iniciat al dia següent del TBI i mantingut durant 2 setmanes també va resultar beneficiós en la millora del dèficit de memòria espacial observat a les 3 setmanes post-TBI en rates, en el laberint aquàtic de Morris, tant en la latència per trobar la plataforma com en el test de retenció (Shen et al., 2013). També s'ha vist que aquest tipus d'exercici revertia el deteriorament de la MRO que es donava després de la lesió quan s'iniciava 2 dies després del TBI i es realitzava durant 2 setmanes (Chen et al., 2013). L'exercici en cinta de córrer iniciat 3 setmanes post-TBI i mantingut durant 8 setmanes també reduïa les alteracions de memòria espacial en rates, en altres tasques com el laberint radial de 8 braços (Ko et al., 2018).

2.3.3 Mecanismes d'acció de l'exercici físic

S'han proposat molts mecanismes per explicar els efectes beneficiosos de l'exercici físic sobre els dèficits cognitius i en general la millora del funcionament cerebral. Entre aquests, l'augment de factors neurotròfics, en especial de BDNF, la reducció de l'estrès oxidatiu, la reducció de la neuroinflamació, la disminució de l'apoptosi i la millora de la

perfusió cerebral i de la integritat de la unió neurovascular. Aquests canvis alteren a nivell molecular i cel·lular vies de senyalització que poden influenciar en la neurogènesi, angiogènesi i sinaptogènesi i que, en conseqüència, poden mediar la millora d'algunes de les deficiències cognitives observades (Alkadhi, 2018; Cobianchi et al., 2017).

2.3.3.1 Fitness cardiovascular i augment del flux cerebral

L'exercici aeròbic regular millora el fitness cardiovascular (subcategoria del fitness cardiorespiratori). Aquesta millora s'associa a un increment del volum del flux cerebral en el gir dentat de l'hipocamp i a una millora de la memòria en humans (Erickson et al., 2011; Stimpson, Davison & Javadi, 2018). Donat que l'exercici augmenta l'angiogènesi en moltes regions cerebrals, inclòs l'hipocamp, aquest sembla ser el pas intermediari entre l'exercici i l'augment del flux cerebral. Així, el fitness aeròbic millora la perfusió cerebral via angiogènesi, afectant positivament a l'execució en tasques cognitives (Stimpson, Davison i Javadi, 2018).

2.3.3.2 Miocines: del múscul a l'encèfal

Encara es coneixen molt poc els factors perifèrics que fan de mediadors entre el múscul i el cervell. El múscul esquelètic actua com un òrgan endocrí, ja que allibera moltes proteïnes anomenades miocines, que poden actuar de manera autocrina, paracrina i endocrina. En concret, els efectes endocrins permeten la comunicació del múscul amb altres teixits i són els que promouen els beneficis de l'exercici en altres parts del cos, entre aquestes, en el cervell (Huh, 2018). Tot i així, altres cèl·lules residents en el teixit muscular, com cèl·lules endotelials, macròfags, fibroblasts i cèl·lules satèl·lit, contribueixen també a la secreció d'aquestes proteïnes. Entre aquestes proteïnes, es troben citocines, factors de creixement i components de la matriu extracel·lular (Hoffmann & Weigert, 2018). Amb l'exercici físic, i en concret amb la contracció del múscul esquelètic, s'allibera interleucina-6 (IL-6) a la circulació sanguínia des del mateix múscul esquelètic, de manera exponencial, sent aquesta miocina la primera citocina en alliberar-se en sang amb l'exercici. La duració de l'exercici és el factor més determinant en la magnitud de la resposta sistèmica de la IL-6 (Bente Klarlund Pedersen, 2017). En humans s'ha observat un augment en l'expressió

d'IL-6 en el múscul esquelètic i un augment d'aquesta citocina en plasma, en comparació amb els nivells basals, després de realitzar una sessió d'exercici. En canvi, no es van trobar diferències ni en els nivells d'expressió ni de proteïna en sang del factor de necrosi tumoral α (TNF α) (Steensberg et al., 2002).

Per una banda, la IL-6 té un rol en el metabolisme de la glucosa i dels lípids. Es creu que aquesta miocina és un sensor de l'estat metabòlic del múscul i promou el consum de glucosa i l'oxidació d'àcids grassos, mitjançant la proteïna quinasa activada per adenosina monofosfat (AMP-activated protein kinase, AMPK), en el mateix múscul. Nivells baixos de glicogen previs a l'exercici augmenten la transcripció d'IL-6 i IL-8 postexercici, mentre que el consum de carbohidrats previ a l'exercici té l'efecte contrari. Per altra banda, la IL-6 té un paper en el sistema immune. Tot i que aquesta citocina es classifica generalment com a proinflamatòria, quan actua com a miocina (alliberada des del múscul) promou els efectes antiinflamatoris de l'exercici (Huh, 2018). Després de l'exercici, hi ha una reducció en els nivells sistèmics de mediadors proinflamatoris, i aquest efecte sembla ser que és mediat per diferents mecanismes. Alguns d'aquests són: l'augment de producció i alliberament de citocines antiinflamatòries, com la IL-10, la IL-1ra en cèl·lules mononuclears sanguínies induïdes per la IL-6, la regulació a la baixa de receptors tipus Toll i la disminució del perfil proinflamatori en monòcits en sang (Hoffmann & Weigert, 2018). En un estudi administraven IL-6 en el torrent sanguini en humans, en una dosi similar al nivell fisiològic trobat en sang després de realitzar exercici. Aquesta administració, va induir un increment en els nivells en plasma de IL-1ra, IL-10 i cortisol (Steensberg et al., 2003). Estudis en animals també han trobat resultats similars. En rates exposades a 7 setmanes en la cinta de córrer, es va trobar una reducció de la citocina proinflamatòria IL-1 β en l'hipocamp en les rates d'exercici, en comparació amb les sedentàries (Chennaoui, Drogou, & Gomez-Merino, 2008). En un altre estudi, les rates de 6-7 setmanes d'edat, s'exposaven a 10 dies a la cinta de córrer a intensitat baixa o alta. Les anàlisis es van realitzar al cap d'una hora de l'última sessió d'exercici i van indicar que el grup d'alta intensitat presentava un augment en l'hipocamp tant de citocines proinflamatòries, com d'antiinflamatòries, TNF α i IL-10, respectivament, respecte el grup sedentari. A més, hi havia augment de BDNF en l'hipocamp en comparació al grup de baixa intensitat i al sedentari (de Almeida et al., 2013). Aquestes dades en conjunt,

posen en evidència el potencial antiinflamatori de l'exercici en la modulació del sistema immune perifèric i central (Pedersen, 2009; Hoffmann & Weigert, 2018). Val a dir que el sistema immune i el SNC tenen comunicació bidireccional, tot i que el SNC es considera immunològicament privilegiat. S'han proposat tres vies diferents de comunicació entre els dos sistemes: la neural, en la que les citocines estimulen fibres nervioses perifèriques, com el nervi vague; l'humoral, en la qual les citocines tenen accés a l'encèfal mitjançant zones on la BHE és més permeable, com els òrgans circumventriculars, o mitjançant transport a partir de les cèl·lules endotelials; i la via cel·lular, en la qual les cèl·lules immunes perifèriques, sobretot monòcits, migren a les meninges, als vasos sanguinis cerebrals i en alguns casos al parènquima cerebral (Miller, Haroon, & Felger, 2017).

Un altre dels factors perifèrics que s'ha proposat per mediar els efectes de l'exercici en el SNC és la miocina catepsina B. En un estudi es va trobar que els ratolins que feien exercici voluntari en roda d'activitat presentaven un increment de catepsina B en plasma als 14 i 30 dies. D'altra banda, els ratolins knockout per catepsina B, tant si feien exercici com si estaven en condició sedentària, mostraven deficiències de memòria espacial en el laberint aquàtic de Morris, nivells de neurogènesi més baixos que els ratolins amb fenotip normal (Wild type) i conducta depressiva en el test de natació forçada. Així mateix, en humans els nivells plasmàtic de catepsina B augmentaven després de 4 mesos en cinta de córrer respecte el grup sedentari, i aquests augments correlacionaven amb un increment del fitness; també es va trobar correlació entre els nivells en plasma de catepsina B i una tasca de memòria hipocamp-dependent, i aquesta correlació era dependent de l'increment del fitness. En aquest estudi també es va comprovar que aquest factor creua la BHE i que l'aplicació de catepsina B incrementa els nivells d'expressió gènica i protèics de BDNF i els nivells de doblecortina (DCX), un marcador de neurona immadura (Moon et al., 2016).

Un altre factor que s'ha proposat és el FNDC5. L'exercici estimula tant l'expressió de la proteïna FNDC5 en el múscul (regulada per $PCG\alpha$), com la seva escissió en irisina. La irisina s'allibera al torrent sanguini i pot creuar la BHE i induir l'expressió de BDNF en neurones hipocampals. Per això s'ha suggerit aquesta via $PCG\alpha$ /FNDC5/BDNF com a possible intermediària dels efectes del múscul sobre l'encèfal (Wrann et al., 2013).

2.3.3.3 Factors neurotròfics i mecanismes de plasticitat

Els efectes neuroprotectors i neuroreparadors de l'exercici estan mediat per la regulació a l'alça de molècules relacionades amb la plasticitat neural. S'entén com neuroprotecció reduir la pèrdua de teixit i la mort cel·lular causada pel dany cerebral. En canvi, neuroreparació està relacionada amb processos de plasticitat i neurogènesi. Per tant, una mateixa molècula pot exercir simultàniament influència sobre aquests dos processos (Åberg, Brywe, & Isgaard, 2006). Entre aquestes molècules hi ha els factors neurotròfics, que són pèptids com el BDNF, el IGF-1, el factor de creixement vascular endotelial (vascular endothelial growth factor 1, VEGF-1) i el NGF (Cotman, Berchtold, & Christie, 2007; Alkadhi, 2017). La formació hipocampal, i en concret el gir dentat, sembla ser l'estructura cerebral que més canvis experimenta a partir de l'entrenament amb exercici físic. Val a dir que l'hipocamp és una regió amb molta plasticitat relacionada amb funcions mnèsiques i emocionals (Cotman & Engesser-Cesar, 2002).

BDNF

En rosegadors exposats a exercici físic s'ha vist increment del BDNF a l'hipocamp. Es creu que el BDNF és la neurotrofina que més promou la plasticitat sinàptica i que té més relació amb els efectes a llarg termini de l'exercici, ja que és la més àmpliament expressada en el cervell (Phillips, et al., 2014).

La seva expressió depèn de la fosforilació del factor de transcripció CREB (cyclic AMP response element-binding protein) (Stimpson, Davison i Javadi, 2018) i s'estimula amb l'activitat neuronal excitatòria glutamatèrgica (Marosi & Mattson, 2014; Foltran & Diaz, 2016). L'entrada de Ca^{2+} a través dels receptors NMDA i els canals controlats per voltatge, activa la CaMK i la MAPK, les quals al seu torn activen CREB, relacionat amb la memòria. Finalment, aquest activa la transcripció gènica del BDNF (Marosi & Mattson, 2014). I, a la inversa, el factor de transcripció CREB també s'activa a partir del mateix BDNF i d'altres factors neurotròfics quan s'uneixen amb els respectius receptors amb activitat tirosina quinasa, com els receptors de la família TrK, o en el cas de l'IGF-1, a partir del receptor factor insulínic tipus 1. Conseqüentment, activen diferents vies de senyalització intracel·lulars que tenen com a diana molecular el factor de transcripció CREB (Minichiello, 2009).

El BDNF es relaciona amb la supervivència i diferenciació neuronal, i la plasticitat sinàptica (inducció i manteniment de l'última fase de la potenciació a llarg termini) (Cotman et al., 2007; Phillips et al., 2014; Baek, 2016), pot prevenir l'apoptosi (Marosi & Mattson, 2014), i també s'ha associat a la neurogènesi (Liu & Nusslock, 2018). El cervell és la major font de síntesi de BDNF i l'hipocamp és la regió cerebral que més expressió de BDNF presenta (Phillips et al., 2014; Foltran & Diaz, 2016).

El BDNF se sintetitza com a precursor (pre-proneurotrofina) i passa a la forma immadura (pro-BDNF). El pro-BDNF pot tenir 3 destins diferents: escissió intracel·lular dins la vesícula i alliberament de BDNF madur (m-BDNF), secreció com a pro-BDNF i escissió extracel·lular mitjançant plasmina o metaloproteases de la matriu, o secreció com a pro-BDNF sense més modificacions (Cobianchi et al., 2017; Foltran & Diaz, 2016). Per tant, en el cervell coexisteixen els dos tipus de BDNF, (pro-BDNF i m-BDNF). La forma immadura té més afinitat pel receptor P75^{NTR} i la madura pel receptor tirosina quinasa B (tyrosine receptor kinase B, TrkB) (Cobianchi et al., 2017). L'exercici físic augmenta ambdues formes de neurotrofines i també l'activitat de l'enzim activador del plasminogen (tPA), involucrat en la conversió de plasminogen en plasmina (Ding, Ying, & Gómez-Pinilla, 2011). Així, l'exercici físic, indirectament, promou més el m-BDNF.

Els efectes neuroprotectors i neuroplàstics del BDNF són mediats pel receptor TrkB (Kreber & Griesbach, 2016) que es troba àmpliament expressat en les neurones hipocampals. La unió del BDNF en el receptor provoca la seva dimerització i la subseqüent autofosforilació, que resulta en el reclutament de molècules adaptadores que s'hi ancoren i permeten l'activació de tres vies de senyalització intracel·lulars principals, tals com: MAPK/ERK, PI3K/Akt i PLCY. En termes generals, aquestes vies s'associen a supervivència cel·lular, diferenciació neuronal i plasticitat sinàptica. A més, la MAPK facilita la fosforilació tant de sinapsina 1 (proteïna relacionada amb la transmissió sinàptica) com de CREB. L'activació de CREB induïx la transcripció del gen *bdnf*. Per tant, la unió del BDNF amb el TrkB desencadena la seva pròpia síntesi (Kowiański et al., 2018) (Figura 2). El bloqueig de l'expressió de BDNF impedeix els efectes facilitadors de l'exercici sobre l'adquisició i retenció de tasques espacials (Vaynman, Ying, & Gomez-Pinilla, 2004). En canvi, la forma immadura (pro-BDNF) unint-

se al receptor $P75^{NTR}$, està involucrada en processos pro-apoptòtics, mitjançant l'activació de la via Jun N-terminal Kinasa. Després d'un dany cerebral, $P75^{NTR}$ s'expressa en moltes poblacions neuronals, específicament en cèl·lules apoptòtiques. L'equilibri pro-BDNF i m-BDNF és decisiu en condicions fisiològiques i patològiques (Ding, Ying & Gomez-Pinilla, 2011; Liu i Nusslock, 2018). Tot i així, existeixen formes truncades del TrkB que promouen la diferenciació de les NSC en glia, alhora que inhibeixen la neurogènesi i que es troben presents en la cicatriu glial després d'un dany cerebral (Foltran i Diaz, 2016).

Després d'una única sessió d'exercici s'ha vist augment en els nivells perifèrics de BDNF en humans sans, tant si l'exercici és aeròbic com anaeròbic (Babaei, et al., 2014), i aquest augment és proporcional a la durada. Tot i així, l'increment és transitori (Dinoff, et al., 2017). El nivell basal de BDNF en plasma en atletes retirats de mitjana edat que segueixen fent exercici regular era més baix que en sedentaris, i es va trobar una correlació inversa entre el BDNF basal i el fitness aeròbic (VO_{2max}). Això suggereix que l'exercici crònic genera una adaptació o regulació del BDNF, o una millor recaptació del BDNF per part de mecanismes centrals (Babaei et al., 2014). L'expressió de BDNF a l'hipocamp també augmenta en rosegadors pocs dies després de l'inici d'exercici físic (Molteni, Ying, & Gómez-Pinilla, 2002) i aquest increment es manté durant un temps després de la seva finalització (Berchtold et al., 2005). A llarg termini es pot veure un augment de BDNF i una regulació a l'alça de l'expressió de TrkB en l'hipocamp, tant si l'exercici és voluntari com forçat (Liu et al., 2009). A més, aquest increment és progressiu amb els dies d'exposició a la roda d'activitat (Adlard, et al., 2004; Berchtold et al., 2005). Tot i així, el mecanisme exacte mitjançant el qual l'activitat física té aquests beneficis no és clar.

Altres factors neurotròfics

A part del BDNF, altres factors neurotròfics com l'IGF-1 són essencials per mediar els efectes beneficiosos de l'exercici físic. L'IGF-1 s'expressa en molts teixits, inclòs el múscul, tot i que a l'encèfal es troba limitat a poques regions. En adolescents humans s'ha trobat que un entrenament de 8 setmanes d'exercici aeròbic augmentava els nivells perifèrics de BDNF i IGF-1 (Jeon & Ha, 2017). Un estudi realitzat amb

rosegadors, va trobar que l'exercici augmentava els mecanismes de recaptació centrals de l'IGF-1 present en el torrent sanguini, fet que estimulava l'expressió de BDNF en les neurones específiques que l'acumulaven (Carro, et al., 2000). A més, el bloqueig dels mecanismes de recaptació central d'IGF-1 inhibia la neurogènesi induïda per l'exercici físic en l'hipocamp (Trejo, Carro, & Torres-Aleman, 2001). El bloqueig del receptor d'IGF-1 impedia l'increment de BDNF induït per l'exercici i anul·lava l'efecte de l'exercici en la retenció de tasques hipocamp-dependents (Ding, et al., 2006). Al seu torn, el bloqueig de BDNF impedia l'increment d'IGF-1 a l'hipocamp i deteriorava la facilitació cognitiva promoguda per l'exercici (Gomez-Pinilla, Vaynman, & Ying, 2008). Per tant, aquestes dues neurotrofines sembla que estan interrelacionades i interactuen per mediar els efectes neuroprotectors i neuroreparadors de l'exercici físic (Baek, 2016). La unió d'IGF-1 amb el receptor IGF-1 activa les vies MAPK/ERK i PI3/Akt, entre d'altres, involucrades, com s'ha comentat en la plasticitat i la supervivència cel·lular, i també en la proliferació cel·lular (Figura 2) (Åberg et al., 2006; Nieto-Estévez, Defterali, & Vicario-Abejón, 2016). No obstant, a avui dia, es desconeix el mecanisme exacte pel qual aquests factors neurotròfics activen la proliferació de les NSC (Nieto-Estévez, Defterali, & Vicario-Abejón, 2016)

Un altre factor neurotròfic, el VEGF és necessari per induir angiogènesi, ja que augmenta l'activitat mitòtica de les cèl·lules endotelials. D'altra banda, el seu bloqueig també disminueix la neurogènesi. Per tant, sembla que el BDNF, l'IGF-1 i el VEGF treballen conjuntament en la mediació dels efectes de l'exercici físic en la neurogènesi (Baek, 2016).

2.3.3.4 Neurogènesi

En el cervell adult dels mamífers es coneixen dos nínxols neurogènics: la zona subventricular, associada a processos olfactoris, i la zona subgranular, associada a memòria i aprenentatge, així com a l'estat d'ànim (Bonaguidi, Ming, & Song, 2009).

La zona subgranular correspon a una fina capa localitzada entre l'hilus i les neurones granulars del gir dentat. Aquesta proveeix un medi únic per a les NSC, doncs permet tant l'autorenovació d'aquesta població, mitjançant una proliferació simètrica, com la generació de cèl·lules progenitores, a partir d'una proliferació asimètrica (Overall, et

al., 2016). Conseqüentment, les cèl·lules progenitores esdevindran o bé cèl·lules granulars generades durant l'edat adulta o bé astròcits. A part de les NSC, en aquest nínxol també hi ha altres tipus cel·lulars que tenen la funció de donar suport a la neurogènesi i a la densa xarxa vascular que està estretament lligada a aquestes cèl·lules (Gonçalves, Schafer & Gage, 2016).

Fins que no arriben a l'etapa de cèl·lules granulars adultes, integrades en el circuit hipocampal, succeeixen molts estadis de desenvolupament intermedis. En primer lloc, les NSC presenten una morfologia radial (cèl·lules tipus 1). Aquestes es poden trobar en un estat quiescent durant llargs períodes, estat mantingut per un corrent tònic GABAèrgic no sinàptic, proporcionat per les interneurons que expressen parvalbúmina. Quan les NSC s'activen i entren en divisió cel·lular, donen lloc a l'estadi de proliferació i generació de cèl·lules progenitores intermèdies (cèl·lules tipus 2) que podran tenir un destí neurogènic (cèl·lules tipus 2b) o gliogènic (cèl·lules tipus 2a). Les cèl·lules progenitores intermèdies, a diferència de les NSC, tenen estadis de proliferació limitats. Els inputs sinàptics GABAèrgics sobre les cèl·lules progenitores intermèdies donen lloc a una diferenciació neurogènica (cèl·lules tipus 2b), i aquestes cèl·lules, al proliferar, es diferencien en neuroblasts (cèl·lules tipus 3), posteriorment en neurones immadures i finalment en cèl·lules granulars madures (Plümpe et al., 2006; Gonçalves, Schafer i Gage, 2016; Catavero, Bao, & Song, 2018). Diferents molècules, a través de diferents vies de senyalització, modulen la proliferació de les NSC i el creixement dendrític de les noves neurones immadures. A partir de la segona setmana, les noves neurones formen sinapsis amb interneurons locals; en aquest moment el GABA despolaritza les noves cèl·lules, en comptes d'hiperpolaritzar, fomentant la supervivència d'aquestes. Les neurones granulars immadures tenen propietats electrofisiològiques diferents a les neurones granulars madures. En concret, tenen més facilitat per a la potenciació a llarg termini (Farmer et al., 2004) a causa de potencials de més amplitud i d'un llindar d'activació més baix. Conseqüentment, fan que el circuit neural sigui més sensible als estímuls, contribuint a la millora de les funcions hipocamp-dependents (Ma et al., 2017).

L'exercici físic genera un augment en el nombre de cèl·lules que proliferen en diferents poblacions cel·lulars, començant per les NSC i degut a la proliferació asimètrica, al seu

torn, també incrementa la proliferació de cèl·lules tipus 2. Tot i així, el mecanisme cel·lular mitjançant el qual l'exercici físic genera un augment en la proliferació encara no es coneix. S'han proposat diferents possibilitats que explicarien aquest efecte: augmentant el número de cicles de divisió, incrementant la supervivència de les cèl·lules que proliferen o induïnt les NSC quiescents a iniciar el cicle de divisió cel·lular (Overall et al., 2016).

En models animals, la facilitació de la neurogènesi hipocampal és un dels efectes més reproduïbles de l'exercici físic, doncs moltes investigacions aporten dades a favor que l'exercici augmenta la proliferació i la supervivència de les noves neurones formades en el gir dentat adult. L'augment de noves neurones en l'hipocamp s'ha relacionat amb la millora de l'aprenentatge i la memòria (Cotman et al., 2007), i en concret, de la memòria espacial (Ma et al., 2017), i dels processos de separació de patrons que, de fet, semblen requerir neurogènesi (Ryan & Nolan, 2016; Vivar & van Praag, 2017). En canvi, el bloqueig de la neurogènesi en el gir dentat adult provoca dèficits cognitius en tasques de memòria espacial i de reconeixement d'objectes. L'efecte de l'exercici físic sobre la neurogènesi es limita únicament a l'hipocamp, ja que no té efectes sobre el bulb olfatori (Brown et al., 2003). Addicionalment, l'exercici canvia la morfologia del gir dentat, mitjançant l'increment en longitud, densitat i complexitat de les espines dendrítiques de les cèl·lules granulars dels gir dentat (Liu & Nusslock, 2018). També augmenta l'angiogènesi i, per tant, millora el flux sanguini cerebral, donant suport així a la neurogènesi (Kreber & Griesbach, 2016).

2.3.3.5 Acció antiinflamatòria

La neuroinflamació és un procés que es dona durant la fase aguda del TBI, però també pot esdevenir crònica (Chiu et al., 2016) i és un dels principals components del dany secundari. A llarg termini està associat a malalties neurodegeneratives (Loane & Kumar, 2016; Karve et al., 2015; Kokiko-Cochran & Godbout, 2018).

En humans s'ha vist que la micròglia pot mantenir-se activada anys després del TBI (Johnson et al., 2013). Aquesta activació crònica també s'ha descrit en nombrosos estudis en models animals. La neuroinflamació promou processos de

neurodegeneració, expandint la cavitat de la lesió, la pèrdua de neurones i de mielina a llarg termini, entre 2 mesos i un any després del TBI (Piao et al., 2013; Acosta et al., 2013; Glushakova, Johnson, & Hayes, 2014; Loane, et al., 2014). També s'ha trobat que la neuroinflamació crònica, i en concret els mediadors proinflamatoris associats a la micròglia clàssicament activada o M1, té un efecte negatiu sobre la neurogènesi hipocampal (Ryan & Nolan, 2016).

L'exercici físic pot exercir efectes antiinflamatoris, essent aquest un dels mecanismes pels quals l'exercici compensaria la reducció de la neurogènesi i milloraria el funcionament cognitiu en animals amb inflamació crònica relacionada amb l'envelliment, malalties neurodegeneratives, TBI, etc (Ryan & Nolan, 2016). Així, tal com ja s'ha mencionat prèviament (apartat 2.3.3.1), l'exercici físic agut i regular en humans i animals sans redueix els nivells de mediadors proinflamatoris perifèrics i augmenta els nivells de mediadors antiinflamatoris (Spielman et al., 2016). És d'esperar que aquest efecte antiinflamatori també tingui lloc en el TBI, i alguns treballs experimentals així ho corroboren. Per exemple, Piao et al. (2013) van trobar que, en ratolins, l'exercici voluntari iniciat 5 setmanes després d'un TBI reduïa la resposta inflamatòria en l'hipocamp (disminuint els nivells de citocines proinflamatòries IL-1 β i dels marcadors de M1 (galectina-3 i C1qB) i incrementant la citocina antiinflamatòria IL-10. També augmentava el número de noves neurones formades durant l'exercici físic i reduïa la cavitat de la lesió. Aquests canvis anaven acompanyats d'una millora en l'execució en el laberint aquàtic de Morris i la MRO (Piao et al., 2013). En un altre treball, els ratolins amb lesió sedentaris presentaven un augment progressiu de la micròglia dels 9 als 16 dies (no es va mirar més enllà en el temps), i l'exercici iniciat als dos dies de la lesió reduïa tant la mort neuronal en el còrtex i l'hipocamp com la micròglia reactiva (Chen et al., 2013).

El TBI s'associa amb una regulació a l'alça de la neurogènesi hipocampal durant la fase aguda, mitjançant un increment en la proliferació de les NSC (Wang, et al., 2016) però les noves neurones immadures generalment no sobreviuen, degut en gran part a la neuroinflamació (Ryan & Nolan, 2016). Per això, l'exercici sembla una bona estratègia per promoure la neurogènesi després del TBI (Jacotte-Simancas; 2015; Piao et al., 2013).

2.3.4 Influència de les pautes d'exercici físic sobre els seus efectes beneficiosos

Encara que en general l'exercici físic s'associa a efectes neuroprotectors i neuroreparadors, també és cert que aquests efectes varien en funció de diferents variables com el tipus, la intensitat, la durada i les pautes temporals de realització de l'exercici (Alkadhi, 2017).

2.3.4.1 Pautes temporals

Interrupció de l'exercici físic

Diversos estudis en rosegadors sans han mostrat que la interrupció de l'exercici pot suposar la pèrdua dels seus efectes beneficiosos i, fins i tot, pot exercir un efecte rebot negatiu (Radak et al., 2006; Nishijima et al., 2013; Nishijima et al., 2017), encara que això depèn del temps transcorregut des del moment de la interrupció. Per exemple, després d'una interrupció curta d'una setmana, tant els nivells de BDNF en l'hipocamp com l'adquisició (però no la retenció) d'un aprenentatge en un laberint radial aquàtic, seguien sent més elevats en ratolins que havien fet exercici que en animals sedentaris, mentre que els nivells de BDNF hipocampal anaven disminuint progressivament, fins que a partir de les 2 setmanes d'interrupció ja no diferien dels del grup sedentari (Berchtold et al., 2005; Berchtold et al., 2010). Així mateix, Kim, et al. (2013) van observar que l'execució en un laberint radial era pitjor en ratolins que havien deixat l'exercici en natació forçada quatre setmanes abans; aquests animals ja no mostraven cap increment de BDNF. També en rates els efectes beneficiosos de l'exercici físic sobre la MRO s'esvaïen després de 2 setmanes d'interrompre l'exercici (Hopkins, Nitecki & Bucci, 2011). Contràriament a aquests resultats, rates que portaven 6 setmanes d'interrupció seguien mostrant nivells més alts de neurogènesi que les sedentàries, tot i que aquest increment era inferior al de les rates que només portaven 1 i 3 setmanes d'interrupció. Ara bé, l'augment de noves neurones només es mantenia en animals que havien estat entrenats en una tasca hipocamp-dependent, en comparació als que realitzaven una tasca no hipocamp-dependent (Motta-Teixeira, et al., 2016). En canvi, en altres experiments en què el període d'interrupció era de 8 setmanes, fins i tot s'observava un efecte rebot negatiu, amb nivells de BDNF i NGF

(Radak et al., 2006) i de neurogènesi (Nishijima et al., 2013) més baixos que en els animals sedentaris. La interrupció de l'exercici físic no va tenir cap efecte sobre altres beneficis com la reducció en el nivell de radicals lliures (Radak et al., 2006).

Moment d'inici respecte a la lesió

El moment concret en què s'inicia l'exercici físic després de la inducció de dany cerebral podria ser un paràmetre molt rellevant, en el sentit que sembla haver-hi una finestra temporal terapèutica concreta. Diferents estudis realitzats en el grup de Grace S. Griesbach mostren que un inici prematur després de la lesió podria interferir en la resposta de compensació endògena, i que el moment d'aquest inici sembla dependre del grau de severitat de la lesió. En concret, l'exercici produeix un increment en la demanda metabòlica en un moment en què el cervell està energèticament compromès. Aquests estudis es centren en un model de FPI en rata i accés il·limitat a la roda d'activitat. En un primer estudi, les rates tenien accés a la roda durant 6 dies, amb inici a diferents temps: agut (dia 0 post-TBI) i demorat (dia 14 post-TBI). Al final de l'experiment les rates passaven per un entrenament en laberint aquàtic de Morris. El grup demorat presentava un augment de BDNF, respecte el grup sedentari en els dos hemisferis. En canvi, l'exercici agut disminuïa la plasticitat en comparació al grup sedentari, amb reduccions de BDNF a l'hemisferi contralateral i de p-sinapsina I a l'ipsilateral. Pel que fa a la memòria, les rates d'inici agut necessitaven més temps per trobar la plataforma que les sedentàries, mentre que el grup demorat no diferia dels subjectes sham (Griesbach, et al., 2004). En aquest sentit, en un altre estudi es va trobar que el grup d'inici immediatament després de la lesió presentava nivells inferiors de p-CREB, CAMKII, MAPKI i MAPKII respecte al sedentari, la qual cosa suggereix que l'exercici iniciat prematurament interfereix en l'augment agut que es dona d'aquests marcadors després d'un dany cerebral (Griesbach, et al., 2004). En un darrer estudi, on produïen dues severitats de lesió (lleu i moderada) amb tres temps diferents d'inici postlesió (dia 0, dia 14 i dia 30), les rates amb lesió lleu que iniciaven l'exercici al dia 0 presentaven nivells de BDNF equiparables als de les sedentàries. En canvi, si iniciaven l'exercici al dia 14, el BDNF augmentava respecte a les sedentàries. D'altra banda, en les rates amb una lesió de severitat moderada els increments de

BDNF només s'observaven quan iniciaven l'exercici al dia 30. És a dir, com més severa era la lesió, més demora es requeria per tal que l'exercici exercís efectes beneficiosos (Griesbach et al., 2007). Un altre estudi que dona suport a l'evidència d'aquesta finestra terapèutica en l'exercici voluntari va mostrar que els ratolins que iniciaven l'exercici al cap d'una setmana del CCI tenien una cavitat de lesió més gran, menys neurogènesi, més micròglia activada i marcadors proinflamatoris, major disminució de gens associats a plasticitat (IGF-1, BDNF i CREB), pitjor execució en memòria espacial en el laberint aquàtic de Morris i en una tasca de MRO que els ratolins amb lesió que iniciaven l'exercici al cap de 5 setmanes del CCI (Piao et al., 2013). En un altre experiment, les rates que feien 8 setmanes d'exercici en cinta de córrer començant amb una demora de 3 setmanes post-TBI, mostraven una millora en una tasca de memòria espacial en el laberint radial de 8 braços, en comparació als animals amb lesió en condició sedentària. Val a dir que en aquest estudi, les rates amb TBI sedentàries presentaven una regulació a l'alça de l'expressió de BDNF a l'hipocamp 11 setmanes després de la lesió, i en conseqüència també mostraven un augment de l'expressió de TrkB i de la ratio p-CREB/CREB. L'exercici va ser eficaç per regular l'expressió de BDNF i de p-CREB/CREB al nivell de rates sham, amb o sense exercici, alhora que va reduir el número de cèl·lules caspasa 3 positives (Ko et al., 2018).

Contràriament, en un altre estudi es van obtenir resultats oposats. Precisament els ratolins que iniciaven l'exercici als 9 dies de la lesió, en un model d'impacte sobre el crani, no mostraven record de l'objecte familiar en la MRO. En canvi, en els ratolins que iniciaven l'exercici en cinta de córrer als dos dies, sí es revertia el dèficit de memòria (Chen et al., 2013). També en altres treballs en què els animals inicien l'exercici voluntari el mateix dia de la lesió, el tractament ha resultat capaç de revertir el dèficit de memòria espacial (Wu, Ying, Gomez-Pinilla; Krishna et al., 2017).

S'han trobat resultats similars amb models preclínics d'isquèmia en rates. Així, l'exercici forçat iniciat el mateix dia de la lesió donava lloc a nivells més elevats de mort cel·lular apoptòtica, d'activitat NOX, d'espècies reactives d'oxigen, de lactat cerebral i de transportadors de glucosa, i tenien una cavitat de lesió més gran, així com nivells inferiors d'ATP que les rates sedentàries. En canvi, quan l'exercici s'iniciava als 3 dies,

disminuïa el lactat i el transportador de glucosa Glut-3 i la mort apoptòtica (Li, Geng, et al., 2017a; Li, et al., 2017b; Shen et al., 2016). Cal dir però, que en altres estudis no s'han trobat aquests efectes.

2.3.4.2 Intensitat, quantitat i durada de l'exercici

Els efectes beneficiosos de l'exercici sobre les funcions cognitives semblen ajustar-se a una corba en forma d'U invertida, suggerint que intensitats molt baixes o massa elevades poden no ser beneficioses (Alkadhi, 2017). Ara bé, la quantitat, intensitat i durada d'exercici òptims per donar lloc a efectes beneficiosos sobre el teixit neural i la cognició podrien ser diferents en animals i persones sans que en subjectes amb dany cerebral. Se sap, per exemple, que després d'un TBI el rendiment aeròbic disminueix degut a canvis en les respostes fisiològiques a l'esforç físic. Per això és habitual que les persones amb TBI tinguin limitacions cardiovasculars i pulmonars que es posen de manifest en activitats de resistència. Degut al baix fitness respiratori, la fatiga incrementa (Mossberg et al., 2010).

D'altra banda, el terme intensitat requereix una clarificació conceptual, doncs cal diferenciar-lo del concepte quantitat d'exercici. Les variables utilitzades per a mesurar-la depenen de mesures fisiològiques com, per exemple, el consum màxim d'oxigen (VO_{2peak}) o el llindar de lactat (S_{LT}), i permeten determinar la transició d'un rendiment aeròbic a un d'anaeròbic. En concret, el llindar de lactat s'estableix a partir del moment en què el lactat s'acumula en la sang, ja que a partir d'una determinada velocitat, el cos ja no pot convertir el lactat en energia, és a dir, el metabolisme aeròbic és insuficient. En aquest context, es deteriora la funció muscular donat que disminueix la contracció i conseqüentment es genera fatiga. En resum, aquests paràmetres ens permeten conèixer el rendiment o fitness aeròbic, i predir l'increment de resistència que es dona quan l'entrenament té un augment progressiu de velocitat (Abreu et al., 2016). En canvi, la quantitat d'exercici fa referència al temps diari invertit a fer exercici físic i no precisa de mesures fisiològiques, ja que no depèn de la intensitat o de l'increment de velocitat.

En models animals d'exercici físic no és habitual utilitzar els paràmetres usats en humans en relació al rendiment aeròbic (VO_{2peak}), en part, degut a l'alt cost que suposen. I pel que fa al lliandar de lactat, perquè es considera una tècnica invasiva, doncs requereix treure mostres de sang repetidament durant el test d'increment de velocitat. Alguns estudis utilitzen la resposta de fatiga per considerar que l'exercici és d'alta intensitat, com per exemple, quan l'animal ja no respon a l'estimulació elèctrica en la cinta de córrer (Sun et al., 2017). Per raons òbvies, aquesta mesura no és adequada per valorar la intensitat de l'exercici voluntari.

Val a dir que no només intensitats elevades en termes de velocitat podrien ser excessives per obtenir beneficis de l'exercici físic, sinó també el temps acumulat per dia.

Estudis en persones i animals sans

En humans s'ha comprovat que a curt termini, una pauta d'intensitat alta d'exercici pot ser tan o més beneficiosa que una pauta moderada per millorar la funció cognitiva. Un estudi realitzat amb homes joves posà en evidència que les dues pautes d'exercici agut (moderada i alta) milloraven les funcions executives de manera immediata, però la pauta d'alta intensitat les potenciava durant més temps que la pauta moderada, ja que amb aquesta última es retornava als nivells previs a l'exercici en els següents 30 min (Tsukamoto et al., 2016). En un altre estudi, realitzat amb participants d'edat avançada que feien exercici aeròbic durant 26 setmanes, distribuïts en 3 nivells d'exercici (75 min/setmana, 150 min/setmana i 225 min/setmana) es va veure que la millora cardiorespiratòria era dosi-dependent, i aquesta variable mediava la relació dosi-resposta entre la durada de l'exercici i la millora en el processament visuoespacial. És a dir, quant més temps d'exercici feien a la setmana, millor rendiment cardiovascular tenien i millor processament visuoespacial mostraven els participants. En canvi, l'atenció simple millorava en tots els grups d'exercici, independentment de la quantitat setmanal. Les altres variables cognitives analitzades com la memòria verbal i el raonament milloraven en tots els grups, inclòs el sedentari, indicant que hi havia un efecte d'aprenentatge o pràctica (Vidoni et al., 2015).

En el nostre laboratori hem constatat que l'exposició a llarg termini a la roda d'activitat amb accés il·limitat en rates sanes, pot comportar l'increment progressiu en la distància diària recorreguda i, per tant, donar lloc a un alt nivell d'exercici total que podria no tenir els efectes beneficiosos esmentats. Així, rates amb alts nivells d'exercici no mostraven record de l'objecte familiar en la MRO, mentre que rates amb nivells més baixos d'exercici sí en mostraven (García-Capdevila, et al., 2009). Altres investigadors han vist que una pauta d'alta intensitat en cinta de córrer (mesurada a partir dels nivells de lactat en sang) no és tan beneficiosa com una pauta moderada, encara que no suposi un nivell d'estrès més elevat. En concret, els ratolins que seguien una pauta d'intensitat alta tenien uns nivells de neurotrofines (BDNF, VEGF i IGF-1) i una execució en una tasca de discriminació espacial, equiparables a la dels ratolins sedentaris. En canvi, els ratolins que seguien una pauta moderada sí que presentaven majors nivells de neurotrofines i una millor execució en la tasca. En relació a la neurogènesi, la pauta moderada promovia la proliferació, supervivència, diferenciació i migració, mentre que la pauta intensa, només contribuïa a la diferenciació i la migració (So et al., 2017). Encara més, una pauta d'alta intensitat d'exercici en cinta de córrer (fins que els animals es fatigaven i no responien a l'estimulació elèctrica) suprimia la inducció i el manteniment de la LTP en l'hipocamp i deteriorava la memòria espacial en el test d'evitació activa en un laberint en Y. Sembla ser que la fatiga i una resposta elevada d'estrès augmentarien els nivells hormonals i de citocines que activen la micròglia i els astròcits. Al seu torn, les cèl·lules glials augmentarien encara més els factors proinflamatoris i es donaria una regulació a l'alça de la fosforilació de diverses MAPK (JNK/p38/ERK) en l'hipocamp, sent aquestes quinases clau per a la supervivència cel·lular i probablement involucrades en la resposta d'inflamació i deteriorament de la plasticitat sinàptica (Sun et al., 2017). Un estudi que també aplicava dues pautes d'exercici: moderada (per sota el llindar de lactat) i alta (per sobre el llindar de lactat) en cinta de córrer, també va obtenir resultats en la mateixa línia. En concret, les dues pautes promovien la proliferació, tot i que només en la pauta moderada hi havia una major supervivència i maduració, en comparació als animals sedentaris. Aquestes diferències s'associaven negativament als nivells de corticosterona. Els animals d'alta intensitat presentaven nivells més alts de corticosterona que els animals del grup control i el grup moderat. És a dir, la neurogènesi es veia parcialment inhibida pels

nivells d'estrès en el grup d'alta intensitat (Inoue et al., 2015).

Donat que l'accés il·limitat a la roda d'activitat pot generar un augment del temps diari d'exercici en rosegadors, cal tenir en compte el període de temps amb accés a la roda o durada d'exercici que tenen els animals. En aquest sentit, Nguemeni et al., (2018) van comparar els efectes de diferents pautes temporals d'accés a una roda d'activitat, que diferien tant en número de dies (14 o 30) com en número d'hores d'accés diari (accés il·limitat o accés limitat a 3 períodes de temps diaris). Les rates que corrien durant 14 dies amb accés diari poc limitat presentaven nivells més alts de neurogènesi en el gir dentat (degut a un augment de cèl·lules BrdU+) que les d'accés limitat a poques hores. En canvi, les rates que corrien durant 30 dies i tenien accés a roda més hores al dia presentaven nivells de supervivència cel·lular tan baixos com el grup sedentari, mentre que els grups amb accés limitat a poques hores al dia, tenien nivells més alts que els altres grups. Val a dir que l'efecte de l'exercici es restringia a un augment de la supervivència però en canvi, no incrementava la diferenciació d'aquestes noves cèl·lules en neurones (Nguemeni et al., 2018). En un altre estudi també es va trobar que les rates espontàniament hipertenses amb accés il·limitat a roda voluntària a llarg termini (24 dies) presentaven menys proliferació en la zona subgranular que les rates sedentàries. En canvi, les rates que corrien a curt termini (9 dies) presentaven més proliferació i més pCREB que les rates d'exercici a llarg termini i les sedentàries. Aquest efecte semblava estar mediat per una activació crònica de l'eix HPA, ja que les rates que corrien a llarg termini tenien glàndules suprarenals més grans i més corticosterona en plasma que les rates que corrien a curt termini i les sedentàries. Ara bé, els efectes negatius d'una exposició prolongada a l'exercici sobre la proliferació i la resposta d'estrès es podien prevenir si es limitava l'accés a la roda a 6 km al dia (distància que corria el grup a curt termini). Tot i així, les rates amb accés limitat no presentaven un nivell major de proliferació que les sedentàries (Naylor, Persson, Eriksson, Jonsdottir, & Thorlin, 2005). Tanmateix, Campbell, et al., (2009) van trobar que la hiperactivació de l'eix HPA que s'observava dues setmanes després de l'inici de l'exercici havia retornat als nivells dels animals sedentaris després de 56 dies. Pel que fa al BDNF, en un altre estudi es va trobar que les rates que tenien accés limitat a dies alterns a la roda d'activitat presentaven un augment gradual més lent de

BDNF a l'hipocamp, en comparació a les rates que tenien accés diari il·limitat (Berchtold et al., 2005).

Els efectes descrits en relació a la durada de l'exercici físic voluntari podrien estar mediat per la quantitat i intensitat diària d'exercici. De fet, en estudis d'exercici voluntari en roda d'activitat sovint resulta molt difícil separar els possibles efectes de la quantitat d'exercici diari dels de la durada del mateix. El motiu d'això és que els rosegadors amb accés il·limitat i a llarg termini a rodes d'activitat tendeixen a augmentar progressivament la distància diària recorreguda fins assolir nivells que podrien deixar de ser els òptims. Per tant, els efectes no tan beneficiosos o fins i tot perjudicials de temps prolongats d'exercici voluntari podrien ser atribuïbles a un augment de la quantitat d'exercici diari (i no a un augment dels dies d'exercici).

Estudis en persones i animals amb dany cerebral

En models animals de TBI també s'ha vist que una intensitat moderada-alta en cinta de córrer no revertia el dèficit de memòria espacial, mentre que una pauta lleu-moderada sí que millorava l'aprenentatge i augmentava els nivells de neurotrofines respecte el grup sedentari (Shen et al., 2013).

L'efecte de la intensitat de l'exercici en animals amb dany cerebral adquirit s'ha estudiat més en models d'isquèmia. Per exemple, Pin-Barre i col.laboradors (2017) van trobar que les rates lesionades que presentaven més reversió de dèficit motor eren les que passaven per la condició d'intensitat més alta d'exercici, en comparació a una d'intensitat moderada (Pin-Barre, et al., 2017). Addicionalment, el grup d'alta intensitat tenia menys micròglia ameboide, menys citocines pro- i antiinflamatòries, tant en la regió que envolta a la lesió, com en l'hemisferi contralateral, en comparació al grup moderat, encara que no es van trobar diferències en el percentatge de teixit perdut. Tanmateix, hi ha certa controvèrsia en la intensitat més adequada en models cerebrals d'isquèmia. Així, en un altre experiment, les rates que entrenaven amb una intensitat baixa (8m/min) presentaven una millora del dèficit de memòria espacial en el laberint aquàtic de Morris, i a més, presentaven nivells més alts de BDNF i de proteïnes sinàptiques (sinapsina i PSD-95) en l'hipocamp, comparat amb les

sedentàries. En canvi, en el grup d'alta intensitat (20m/min), aquesta pauta no només no permetia una millora en el dèficit de memòria produït per la lesió, sinó que presentava nivells més elevats de corticosterona en sang que els sedentaris (Shih, Yang, & Wang, 2013). Resultats similars es van obtenir en un altre estudi, en el que es va veure que les rates que entrenaven a baixa intensitat, presentaven reversió dels dèficits de MRO i de memòria de memòria espacial, mentre que les que entrenaven a alta intensitat, no (Shimada et al., 2013).

2.4 Memòria de Reconeixement d'Objectes (MRO)

La memòria declarativa es defineix com la memòria conscient de fets i esdeveniments que pot ser dividida en memòria episòdica i memòria semàntica (Winters, Saksida, & Bussey, 2008). Una de les maneres més utilitzades per estudiar la memòria episòdica és mitjançant la memòria de reconeixement (Squire, Wixted, & Clark, 2007). Aquesta és la capacitat de saber si un esdeveniment o estímul ha sigut experimentat prèviament. Segons la teoria de processos duals (Wixted, Mickes, & Squire, 2010), aquest tipus de memòria es basaria en dos components: la familiaritat de l'esdeveniment/estímul (la consciència d'haver presenciat l'estímul sense accés a la informació contextual sobre aquest) i el record o evocació (informació contextual espacial o temporal relativa a aquest) (Balderas, Rodriguez-Ortiz, & Bermudez-Rattoni, 2015).

En animals, el record episòdic fa referència a la recuperació de la informació respecte a "on" va tenir lloc l'esdeveniment, "què" va succeir i "quan" es va donar aquest (Clayton, Salwiczek, & Dickinson, 2007). Mitjançant diferents variants de la tasca de MRO, s'ha vist que els rosegadors poden codificar aquests components de la memòria episòdica quan s'avaluen separatament (Jurado-Berbel, et al., 2010). A aquesta habilitat se l'anomena memòria de tipus episòdic ja que en animals no és possible saber si va acompanyada d'un record conscient (Clayton et al., 2007). La MRO és una de les tasques més utilitzades per mesurar la memòria de reconeixement en rosegadors. La MRO avalua la capacitat de saber si un objecte s'ha presenciat prèviament i, per tant, permet diferenciar entre "nou" i "vell". Aquesta tasca es basa

en l'exploració diferencial de dos (o més) objectes, un d'ells no presentat prèviament, ja que els rosegadors presenten una tendència espontània per explorar els estímuls novedosos (Kealy & Commins, 2011). Amb aquesta finalitat, es realitza una primera sessió d'adquisició (adquisició de la familiaritat de l'objecte), mitjançant la presentació de dos (o més) objectes, seguit d'una fase de demora i posteriorment un test (o més) de retenció, on almenys un dels objectes presentats és nou (Warburton & Brown, 2015).

L'entrenament en MRO pot presentar moltes variants. Hi ha estudis que inclouen una sessió de neofòbia (o habituació a la presència d'objectes novedosos) i altres que no. Pel que fa la fase d'adquisició, es pot fer amb dos objectes idèntics o dos diferents. També el temps de demora entre la fase d'adquisició i la de retenció pot variar molt entre experiments modificant així el gradient mnèsic. I es pot fer un únic test o més d'un. Addicionalment, es pot canviar la localització de l'objecte familiar, fet que incrementa la càrrega espacial de la tasca, introduir un component de recència (memòria temporal), etc. Tot i així, les sessions d'habitució prèvies a la sessió d'adquisició són necessàries per tal que es doni exploració dels objectes i per tant, per la formació de la memòria (Tanimizu, Kono, & Kida, 2017).

Bases neurals

Les estructures que formen el lòbul temporal medial dels mamífers (hipocamp i escorces perirhinal (PRhc), entorhinal i parahipocampal -postrhinal en rata-) són les principals en mediar els processos de memòria declarativa (Winters et al., 2008).

Tot i que hi ha controvèrsies en relació al paper que hi juguen en la MRO aquestes estructures cerebrals, en general està acceptat que una d'elles seria la PRhc. Aquesta estructura, sembla que té un rol dual, doncs participa tant en processos de memòria de reconeixement com en processos de percepció. Lesions a la PRhc afecten a la MRO i a la discriminació visual (Bartko, et al., 2007; Winters et al., 2008; Miranda & Bekinschtein, 2018).

En rosegadors, les neurones de la PRhc alteren la freqüència de potencials d'acció davant un objecte, formant un "camp d'objecte", i aquesta taxa és major quan l'objecte és nou i va disminuint a mesura que aquest es presenta repetidament (Miranda & Bekinschtein, 2018). Per tant, la PRhc sembla important per a la detecció

de la novetat i per a la representació dels objectes, sent aquest un pas necessari per a la MRO. Pel que fa a les funcions mnèsiques, desconexions temporals de la PRhc mitjançant infusions de lidocaïna abans de la fase d'entrenament impedeixen l'adquisició de la MRO, independentment de la demora entre fases, suggerint que la lesió està impedit la codificació de la representació perceptual de l'objecte. Quan la lidocaïna s'administra just abans de la fase retenció també deteriora la MRO independentment del temps de demora, fet que indica que la PRhc també està involucrada en el record, a part del seu rol en la codificació i en la representació perceptual (Winters et al., 2008). Conseqüentment, es considera que té un paper essencial en la MRO (Kealy & Commins, 2011). Un altre estudi va mostrar que la PRhc era crítica per a la consolidació de la MRO quan els objectes eren similars i per tant, quan es generaven memòries solapades, però no quan eren diferents. En concret, tant si es bloquejava l'expressió de BDNF com de la síntesi proteica en la PRhc deterioraven la MRO a les 24 h, però no a les 3 h, i només quan els objectes eren similars (Miranda et al., 2017).

La PRhc és una escorça d'associació que estableix múltiples connexions recíproques amb diferents regions de l'escorça temporal medial, inclosa la formació hipocampal, de l'escorça prefrontal medial i d'escorces sensorials, entre d'altres; també té comunicació bidireccional amb estructures subcorticals com el tàlem i l'amígdala (Kealy & Commins, 2011). Pel que fa a la implicació de l'hipocamp en la MRO hi ha certa controvèrsia, doncs alguns estudis l'avalen i altres no (Warburton & Brown, 2015). Estudis mitjançant gens d'expressió immediata (immediate early genes, IEG) i electrofisiologia mostren que tot l'hipocamp presenta un cert nivell d'activitat en la MRO, però se suggereix que aquesta estructura estaria més implicada en altres aspectes com l'ordre temporal o la disposició espacial dels objectes que en la familiaritat (Kealy & Commins, 2011). D'aquesta manera, petites diferències en l'administració de la tasca semblen donar lloc a una major o menor implicació de la formació hipocampal (Warburton & Brown, 2015). Per tant, sembla ser que hi ha certa dissociació de funcions entre diferents estructures del lòbul temporal en la MRO. En general, es considera que la PRhc seria clau per la familiaritat, mentre que l'hipocamp ho seria pel record, és a dir, per la informació contextual (Cohen & Stackman, 2015).

Les interaccions de l'hipocamp amb la PRhc permeten l'aprenentatge associatiu entre objecte i lloc. D'altra banda, el còrtex prefrontal medial sembla que també està involucrat en l'associació objecte-lloc i integrant la informació contextual espacial que rep d'altres regions (Barker, et al., 2007). Per tant, l'hipocamp, l'escorça prefrontal medial i la PRhc formen part d'un sistema neural en el què es dona associació entre els ítems i el context (Vann & Albasser, 2011).

Pel que fa a la discriminació tàctil dels objectes, sembla que hi participen altres estructures com el còrtex parietal posterior (Vann & Albasser, 2011).

EXPERIMENT 1

3. EXPERIMENT 1

Aquest experiment ha donat lloc a la següent publicació:

Amorós-Aguilar, L.; Portell-Cortés, I.; Costa-Miserachs, D.; Torras-Garcia, M.; Coll-Andreu, M. (2015). Traumatic brain injury in late adolescent rats: Effects on adult memory and anxiety. *Behavioral Neuroscience*, 129(2): 149-159.

<http://psycnet.apa.org/doi/10.1037/bne0000046>

D'acord amb els resultats obtinguts en un experiment previ (Jacotte-Simancas et al., 2015), els quals ens mostraven que el nostre model de lesió induïa un dèficit en la MRO a les 3 setmanes, l'Experiment 1 es va dissenyar per comprovar que aquests efectes se seguien mantenint a més llarg termini.

Els objectius específics de l'Experiment 1 van ser comparar l'efecte del TBI als 21 dies i als 42 dies de la lesió, sobre:

- 1) La memòria, mitjançant la tasca de MRO, tant a curt termini (3 hores), com a llarg termini (24 hores)
- 2) La reactivitat emocional, mitjançant el Laberint Elevat en Creu (LEC)
- 3) L'exploració i l'activitat locomotora
- 4) Diverses mesures macroscòpiques de la lesió

3.1 Mètodes

Ètica i benestar animal

El procediment experimental dut a terme en aquesta investigació s'ha realitzat seguint la normativa vigent de la Unió Europea referent a les disposicions legals, de reglament i administratives respecte la protecció dels animals utilitzats en l'experimentació i altres finalitats científiques (2010/63/UE, de 22 de setembre de 2010), i d'acord amb el decret de l'Estat Espanyol (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrer de 2013) que regula

els aspectes ètics i de cura i control dels animals per a l'experimentació. L'experiment ha estat aprovat per la Comissió d'Ètica en experimentació animal i humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona i pel departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (DARP) de la Generalitat de Catalunya (nº d'ordre 5036).

3.1.1 Subjectes

En aquesta investigació es van utilitzar un total de 52 rates albinas mascle, de la soca Sprague-Dawley subministrades per Prolabor. En el moment que arribaven al nostre laboratori, les rates, de 6 setmanes d'edat, romanien durant set dies en quarantena amb la finalitat d'assegurar que no presentaven cap problema de salut. Passada la quarantena els animals, de 7 setmanes d'edat, eren establats en gàbies individuals en condicions de temperatura i humitat controlades i amb un cicle de llum foscor de 12 hores (inici llum: 8 h). En tot moment tenien accés a aigua i menjar ad libitum. En el moment de l'establació en gàbies individuals, els animals van ser distribuïts de manera aleatòria en els quatre grups experimentals següents: Lesió-21, Lesió-42, Sham-21 i Sham-42. Els animals dels grups Lesió-21 i Sham-21 iniciaven l'entrenament en una tasca de MRO 21 dies després de la intervenció quirúrgica, mentre que en els animals dels grups Lesió-42 i Sham-42 aquestes proves s'iniciaven 42 dies després de la cirurgia (veure cronograma en la Figura 4).

Per tal d'habituar els animals a les manipulacions posteriors, abans de la intervenció quirúrgica aquests eren sotmesos a 2 sessions de handling, en dies consecutius, de cinc min cadascuna. El pes mitjà dels subjectes el primer dia de handling era de 265.36 g ($s=29.70$), i la seva edat era de 8 setmanes.

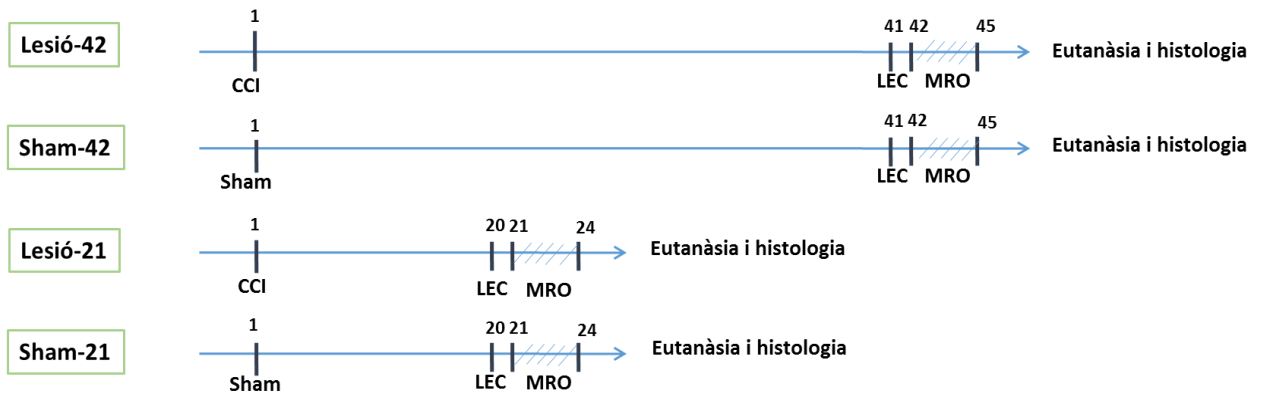


Figura 4: Cronograma de l'Experiment 1. CCI=Controlled Cortical Impact; LEC=Laberint Elevat en Creu; MRO=Memòria de Reconeixement d'Objectes.

3.1.2 Intervenció quirúrgica

Al sisè dia de la separació, es va procedir a la intervenció quirúrgica, per realitzar la lesió cerebral traumàtica, mitjançant el model d'impacte cortical controlat (CCI).

Els animals eren introduïts en una caixa de metacrilat (20x13x13) per procedir a la inducció de l'anestèsia amb isoflurà al 5% barrejat amb oxigen (flux de 2 l/min), durant 6 min. Transcorregut el temps de la inducció, les rates es fixaven a l'aparell d'estereotàxia (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA), i es mantenia l'anestèsia durant tota la intervenció, mitjançant una màscara al musell (dosi de manteniment: isoflurà al 2%, flux d'oxigen de 1 l/min). Seguidament, es comprovava el reflex interdigital i si no presentava resposta, es procedia a rasurar el cap de l'animal i es realitzava una incisió sagital a la pell. Un cop exposat el crani, es netejava amb sèrum fisiològic, per a poder visualitzar bé les sutures. A continuació, es realitzava una craniotomia de 5 mm de diàmetre, sobre el lòbul parietal dret, deixant intacta la duramàter (coordenades: 4,5 mm posterior a Bregma; -3 mm lateral des de la línia mitja). Seguidament, es procedia a la lesió cerebral traumàtica, mitjançant el dispositiu de CCI (Pittsburgh Precision Instruments, Inc, USA, veure Figura 5). El braç del dispositiu pneumàtic retràctil estava fixat amb una inclinació de 15° respecte l'eix vertical i en el seu extrem se situava una barra cilíndrica de base aplanada i de 3 mm de diàmetre. Es col·locava la punta de la barra sobre la duramàter, en el centre de la craniotomia, i s'accionava el botó per tal que la barra es retragués. Es procedia a baixar manualment 2 mm la posició de la barra i s'accionava el botó del dispositiu pneumàtic per tal que la punta impactés sobre la duramàter a una velocitat de 6 m/s i a una

profunditat de 2 mm, durant 150 msec. Un transductor (Macrosensors, Pensauken, N.J) connectat al dispositiu, mesurava la velocitat i la duració de l'impacte, per tal d'assegurar que aquests paràmetres es mantinguessin constants durant totes les intervencions. L'ús d'aquests paràmetres s'ha associat a la inducció de lesions de severitat moderada (Dixon et al., 1999).

Després de la lesió la zona de l'impacte es netejava amb sèrum i se suturava. Finalment, s'administrava una injecció subcutània de 0.2 ml de buprenorfina (Buprex, Schering-Plough, SA) per tal de controlar el dolor postoperatori. Els animals dels grups sham passaven per totes les fases de la intervenció (anestèsia, incisió, craniotomia i sutura), a excepció de l'impacte mitjançant el dispositiu pneumàtic. Durant tota la intervenció es mantenia la temperatura corporal dels animals mitjançant una manta elèctrica. Un cop finalitzada la intervenció s'introduïen a les seves gàbies i es retornaven a l'estabulari, per a la posterior recuperació. Durant els 5 dies posteriors a la intervenció cada dia es pesaven els animals i es controlava la ingesta de menjar i aigua, la conducta dels animals, així com la cicatrització de la ferida per detectar la possible existència de malestar.

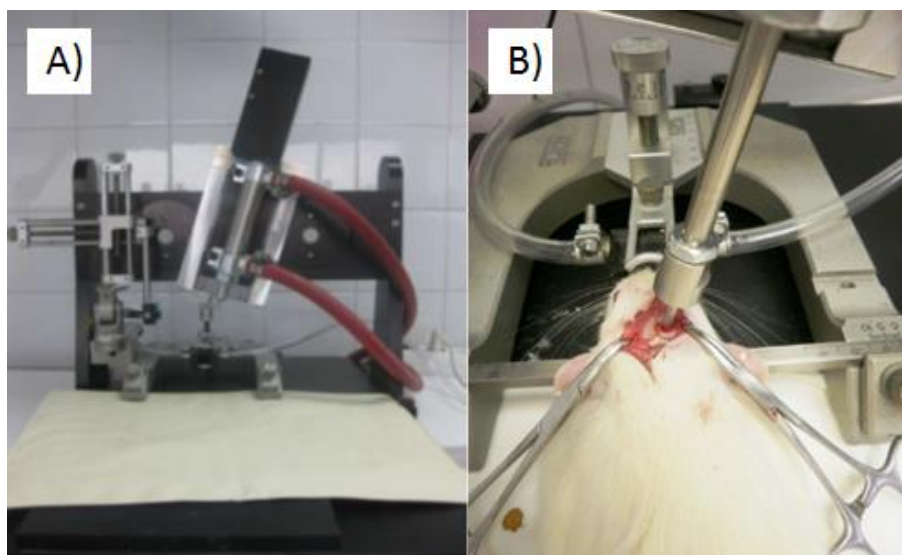


Figura 5: (A) Dispositiu d'impacte cortical controlat; (B) animal fixat en l'aparell d'estereotàxia i amb el dispositiu del CCI preparat per a realitzar l'impacte.

3.1.3 Laberint Elevat en Creu (LEC)

El laberint elevat en creu (LEC; Cibertec S.A., Madrid) constava de quatre braços, de 10 cm d'ample per 49 cm de llarg, organitzats en forma de creu. Els braços estaven elevats

61.5 cm del terra. Dos dels braços (braços tancats) estaven envoltats per parets de 40 cm d'alçada. Els altres dos braços (braços oberts) no tenien parets, però sí una petita vora d'1 cm d'alçada com a guia tàctil per evitar caigudes. El laberint estava il·luminat per una bombeta de 20 W que donava lloc a un nivell lluminós de 61 luxs en el terra de la plataforma central, i de 27 luxs en el terra dels braços tancats. Els animals eren sotmesos a una única sessió de LEC, de 5 min de durada. La sessió es realitzava 20 o 41 dies (segons el grup) després de la intervenció quirúrgica. A l'inici del test, l'animal era col·locat a la plataforma central, amb el cap en direcció a un dels braços oberts. Un sistema automatitzat (Test 4B, Cibertec S.A., Madrid), format per deu parells de cèl·lules fotoelèctriques localitzades estratègicament en diverses zones de l'aparell, permetia el registre de l'exploració de l'animal a les diferents zones del laberint. El programa registrava les següents mesures: temps en els braços oberts, temps en els braços tancats i a la plataforma central, número d'entrades als braços oberts i als braços tancats; número de vegades que l'animal es col·locava a l'extrem distal d'un braç obert, i número d'entrades totals als braços. També es registraven el número d'aixecades ("rearings") i els episodis d'autoneteja ("groomings") a les diferents zones del laberint, així com el número de defecacions i miccions. Com a principal índex d'ansietat es calculava la ratio entre el temps en braços oberts i el temps total en braços (ratio temps), així com la ratio entre el número d'entrades a braços oberts i el número total d'entrades (ratio entrades). Durant la sessió un ventilador proporcionava un soroll blanc constant, per tal d'emascarar altres possibles sons. Una cortina blanca separava el laberint de l'experimentador, per tal d'impedir que l'animal pogués veure'l. El laberint es netejava abans i després de treballar amb cada un dels animals utilitzant una solució d'aigua destil·lada i alcohol al 70% amb la finalitat d'evitar senyals olfactives.

3.1.4 Memòria de Reconeixement d'Objectes (MRO)

La tasca de MRO consistia en tres sessions d'habitució a la caixa d'entrenament, una de neofòbia, una d'adquisició i dues de retenció, i s'iniciava 21 o 42 (segons el grup) dies després de la cirurgia. Aquesta tasca es basa en la tendència espontània dels rosegadors per explorar més els estímuls nous que els familiars (Clark, Zola i Squire, 2000). L'aparell de MRO era una caixa quadrada oberta per dalt (65,5 x 65,5, altura 35

cm), de conglomerat folrat de melamina de color marró fosc. L'aparell estava situat a l'interior d'una caixa d'aïllament (157 x 71,5 x 71,5 cm) amb un llum fluorescent en el sostre que proporcionava 30 luxs d'il·luminació. Un extractor permetia la renovació de l'aire i al mateix temps proporcionava un soroll blanc constant. Totes les sessions de MRO eren enregistrades per una càmera de vídeo situada al centre del sostre de la caixa d'aïllament.

Durant l'entrenament es van utilitzar quatre tipus d'objectes: un per a la neofòbia (construcció de peces de Lego) i els altres tres (construcció de peces de Lego, una llauna i un penjador) per a les proves d'adquisició i retenció (veure Figura 6). Aquests últims eren d'una mida similar. Es van fer proves pilot prèvies per descartar la possible existència de preferència espontània per algun d'aquests tres objectes per part de les rates.

Durant totes les sessions, els animals eren situats sempre en la mateixa localització espacial dins la caixa experimental, amb el musell dirigit cap a la porta de la caixa d'aïllament.

Tant la caixa experimental com els objectes es netejaven abans de començar cada sessió amb una solució d'aigua destil·lada i alcohol al 70%, per tal d'evitar possibles claus olfactivas.

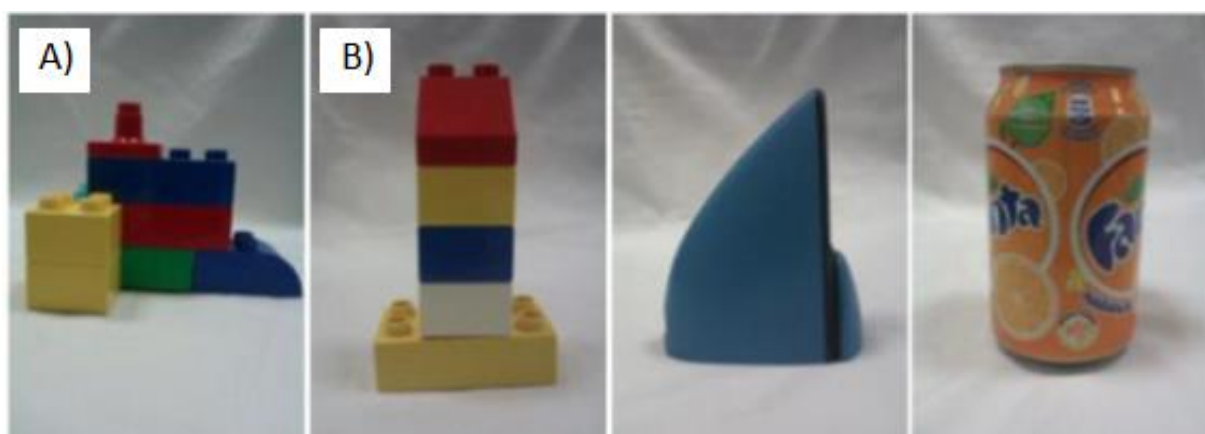


Figura 6: Set d'objectes utilitzats en la MRO. (A): objecte neofòbia, (B) tres tipus d'objectes utilitzats en l'adquisició i la retenció 1 i 2.

Habitució

Les rates passaven per tres sessions d'habitució a la caixa experimental, de 12 min de duració cadascuna. Dues es realitzaven durant el primer dia d'entrenament en MRO

(dia 21 o 42 post-TBI) i separades 90 min entre elles, i la tercera, durant el segon dia d'entrenament. L'animal se situava a la caixa experimental només amb la llum i el soroll blanc de fons i s'enregistraven les defecacions i miccions com a mesures d'ansietat, així com les entrades en els quadrants interiors i exteriors i la distància total recorreguda com a mesures de l'activitat locomotora.

Test de neofòbia

Al segon dia d'entrenament en MRO (dia 22 o 43 post-TBI) i al cap de 90 min de la tercera sessió d'habitació, es realitzava la sessió de neofòbia amb la finalitat de detectar la possible reactivitat emocional generada per la presència d'un objecte nou. Les rates se situaven durant 10 min a la caixa experimental, amb l'objecte de neofòbia situat al mig del sòl de la caixa i fixat amb una cinta adhesiva per evitar que l'animal el pogués moure. Durant aquesta sessió es mesuraven la latència de la primera exploració, el temps d'exploració de l'objecte i la distància total recorreguda.

Adquisició de l'aprenentatge

Al tercer dia de l'entrenament en MRO (dia 23 o 44 post-TBI) es realitzava la prova d'adquisició. Amb aquesta finalitat se situaven dos objectes idèntics a les cantonades posteriors de la caixa experimental, concretament a una distància de 10 cm de les parets, fixats al sòl amb cinta adhesiva. Els animals tenien 15 min per explorar lliurement els objectes idèntics i es mesurava el temps d'exploració de cadascun, la latència de la primera exploració i la distància total recorreguda. Es considerava conducta exploratòria de l'objecte quan l'animal tenia el cap dirigit a l'objecte i amb el musell a una distància màxima de 2 cm d'aquest.

Donat que és necessari que els animals explorin els objectes en aquest tipus de tasca, es va establir un criteri mínim de 10 s d'exploració dels dos objectes, per considerar que havien estat explorats un període de temps suficient, tal com indiquen estudis metodològics amb aquest tipus de tasca (Akkerman et al., 2012).

Retenció 1 (3 hores)

Passades 3 h de l'adquisició, els animals eren introduïts de nou a la caixa experimental durant 5 min. Aquesta contenia dos objectes situats en les mateixes localitzacions que en la sessió d'adquisició, dels quals un era el mateix que s'havia utilitzat en la sessió d'adquisició (objecte familiar) i l'altre era nou (objecte nou). Es va mesurar el temps d'exploració de cada objecte, i es va establir un criteri mínim de 2 s d'exploració total dels objectes per tal d'incloure les dades en les anàlisis estadístiques.

Retenció 2 (24 hores)

Al cap de 24 h de l'adquisició i al quart dia d'entrenament (dia 24 o 45 post-TBI), es tornava a fer un test de 5 min. En aquesta ocasió, es tornaven a presentar dos objectes, situats en les mateixes localitzacions que en les sessions anteriors, amb la diferència que es presentava l'objecte familiar ubicat en el costat oposat a on es trobava en la retenció 1, i l'objecte nou era un que l'animal no havia vist mai. Es va mesurar el temps d'exploració de cada objecte, i es va establir un criteri mínim d'exploració total dels objectes de 2 segons.

Per tal de determinar si l'animal presentava record de l'objecte familiar es calculava un índex de discriminació (ID) per a cada una de les sessions de retenció, segons la fórmula següent:

$$ID = \left(\frac{\text{Temps exploració objecte nou} - \text{Temps exploració objecte familiar}}{\text{Temps exploració objecte nou} + \text{Temps exploració objecte familiar}} \right) \times 100$$

Aquest índex no està contaminat per possibles diferències en el temps d'exploració total (Akkerman et al., 2012). Valors similars a zero indiquen temps d'exploració similars per als dos objectes i, per tant, una manca de record de l'objecte familiar. En canvi, valors positius i estadísticament diferents de zero, s'interpreten com que hi ha record de l'objecte familiar.

En aquesta tasca, es van utilitzar tres parells d'objectes idèntics i cada grup va passar per totes les combinacions possibles. En tots els grups d'animals es va contrabalancejar el tipus d'objecte que es presentaven a les sessions d'adquisició i retenció, amb la finalitat de contrarestar la possible preferència per algun objecte que poguessin tenir

alguns animals. També es va contrabalacejar la posició de l'objecte nou i familiar, per tal de contrarestar la possible preferència per una determinada localització. Les diferents fases de la MRO es mostren en la Figura 7.

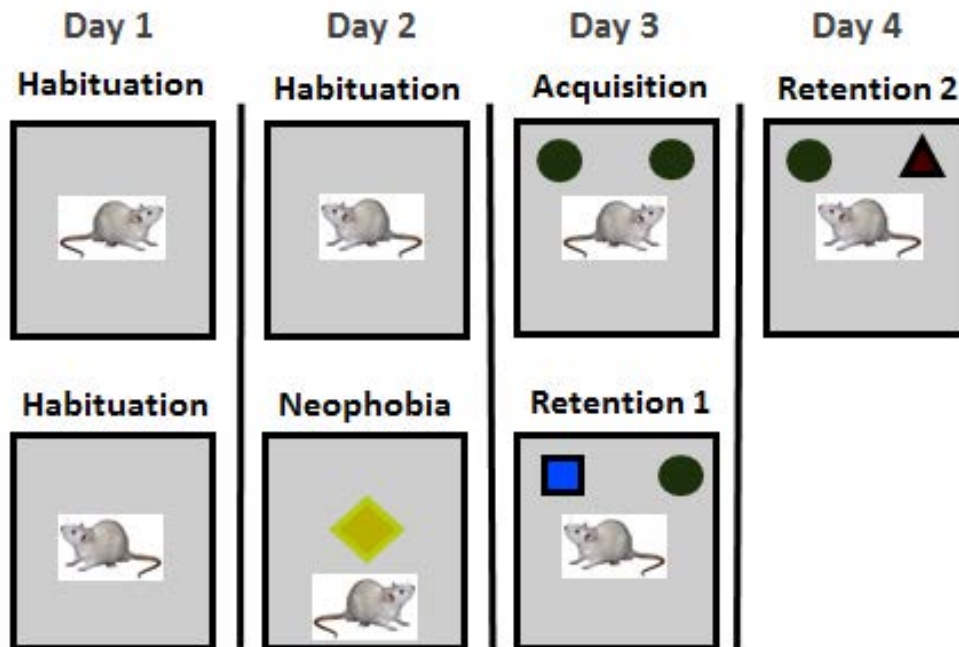


Figura 7: Representació de les diferents fases de la MRO i la disposició dels objectes en cada fase de la MRO.

3.1.5 Eutanàsia i perfusió intracardíaca

72 h després de la retenció 2, els animals eren sacrificats amb una sobredosi de pentobarbital sòdic (Dolethal, 200 mg/kg; Vetoquinol S.A; Madrid-Espana) i es procedia a la perfusió intracardíaca amb paraformaldehid (PFA, Sigma Aldrich, Madrid) al 4% dissolt en tampó fosfat (PB pH 7.4; 0.1M). Es va utilitzar una bomba de perfusió a 30 r.p.m. amb un caudal aproximat de 70 ml/min (J.P Selecta, S.A Barcelona). Es van extraure els cervells i es van deixar en una solució de PFA al 4% a 4°C durant 3 h, per a la postfixació del teixit. Posteriorment es van fer tres rentats amb tampó fosfat (PB pH 7.4; 0.1M) i es van deixar en una solució crioprotectora de sacarosa al 30% en tampó fosfat durant 72 h a 4°C. Transcorregut aquest temps, eren conservats a -80°C fins el moment de realitzar les seccions coronals.

3.1.6 Determinació macroscòpica del volum de la lesió i de diferents estructures

Els cervells eren seccionats a un gruix de 40 µm mitjançant un criòstat (Shandon

Cryotome FSE, Thermo Electron Corporation). Es recollien una de cada cinc seccions equidistants al llarg de tota l'extensió anteroposterior de la cavitat de lesió. Els talls es muntaven en porta-objectes i es conservaven a -20 °C per a la posterior tinció amb violeta de cresil.

Els talls es van incubar en una solució de violeta de cresil al 0.5% i posteriorment, es van deshidratar en alcohol de 70%, 95% i 100% consecutivament, i es van muntar sobre cobreobjectes utilitzant com a medi de muntatge DPX (Sigma Aldrich, Madrid).

Les seccions cerebrals tenyides eren digitalitzades mitjançant un escàner (HP scanjet G4050). Posteriorment, amb el software d'anàlisi d'imatge de mostres biològiques Fiji (Schindelin et al., 2012), es dibuixava el contorn de la cavitat de la lesió, així com de la formació hipocampal, el ventricle lateral i l'hemisferi ipsilateral (dret) i contralateral (esquerre). Per tal d'estimar el volum, es va aplicar el mètode de Cavalieri. Es va multiplicar l'àrea de la lesió o de la regió d'interès pel gruix de cada tall (0.04 mm) i pel número de seccions fins la següent secció analitzada (5 seccions), i després es van sumar tots els volums parcials obtinguts en el càlcul anterior.

Finalment, i per tal de tenir mesures més acurades de la magnitud del dany cerebral macroscòpic, no contaminades pel número de seccions analitzades en cada cas, es van calcular les següents ratios interhemisfèriques: ratio hipocamp (relació, en percentatge, entre el volum de l'hipocamp ipsilateral i de l'hipocamp de l'hemisferi contralateral); ratio ventricle (relació, en percentatge, entre el volum del ventricle lateral de l'hemisferi ipsilateral i el de l'hemisferi contralateral). Valors estadísticament superiors a 100 indiquen que el volum de l'estructura és més gran a l'hemisferi ipsilateral a la lesió, mentre que valors estadísticament inferiors a 100 indiquen que el volum de l'estructura és més petit a l'hemisferi ipsilateral.

3.1.7 Anàlisi estadístiques

Les dades van ser analitzades mitjançant el paquet estadístic R 2.15.0 (R Development Core Team, 2011) i amb l'ajut de la interfície gràfica d'usuari Deducer (Fellows, 2012).

Les variables conductuals van ser analitzades mitjançant el model lineal general (MLG) seguint un disseny factorial 2x2: intervenció (2 categories: lesió i sham) i temps (temps transcorregut des de la intervenció i l'inici de l'entrenament en MRO; 2 categories: 21 i 42 dies). Per a les anàlisis de la distància recorreguda en els tests d'habitació es va fer

servir també el MLG, amb el mateix disseny, però afegint la variable intrasubjecte (sessió). En cas necessari s'aplicaven contrastos polinomials per determinar l'evolució de les variables al llarg de les sessions.

Per comparar les dades referents a l'estudi macroscòpic del teixit cerebral entre els dos grups d'animals amb TBI es van utilitzar proves t de Student per a mostres independents.

També es van portar a terme proves t de Student per a una mostra per tal de determinar, dintre de cada un dels grups experimentals, si els índexs de discriminació i diverses mesures macroscòpiques del teixit cerebral eren estadísticament diferents al valor de referència (0 per a l'índex de discriminació, i 100 per a les ratios interhemisfèriques).

3.2 Resultats

Tres subjectes van morir durant la intervenció quirúrgica. La mostra final va estar formada per un total de 49 subjectes (Lesió-21: 10; Sham-21: 12; Lesió-42: 14 i Sham-42: 13). Tots els grups van mostrar un increment de pes similar i no es van trobar diferències entre grups en les diferents fases experimentals.

3.2.1 Laberint Elevat en Creu (LEC)

Les anàlisis realitzades mitjançant el MLG van detectar que el factor temps era significatiu per a la variable entrades a braços oberts [$F_{(1,45)}=5.26$; $p=0.026$] i per a la ratio d'entrades als braços oberts [$F_{(1,45)}=4.62$; $p=0.037$] mentre que ni el factor intervenció, ni la interacció entre tots dos eren significatius. En concret, els grups de 42 dies feien un nombre significativament superior d'entrades als braços oberts i tenien una ratio d'entrades més alta que els grups de 21 dies, independentment de si els animals tenien lesió o eren sham. El MLG també indicà que el factor intervenció era significatiu per al temps en plataforma central [$F_{(1,45)}=6.92$; $p=0.011$]. Concretament, els animals amb lesió passaven menys temps en aquesta localització que els sham. No es va trobar cap altre efecte significatiu dels factors principals o de la interacció entre ells per a cap de les altres mesures del LEC (veure Taula 1).

Variable LEC	Lesió-21	Sham-21	Lesió-42	Sham-42	Significació estadística
Entrades oberts	2.1 (0.8)	2.3 (1.7)	4.1 (4.0)	4.6 (4.4)	Grups 42d > Grups 21d (p=0.026)
Ratio entrades	14.2 (6.8)	14.7 (9.4)	19.8 (16.2)	29.8 (26.0)	Grups 42d > Grups 21d (p=0.037)
Temps oberts	20.2 (18.4)	19.8 (22.3)	46.2 (55.2)	34.7 (55.8)	NS
Ratio temps	10.1 (8.1)	10.7 (12.4)	22.4 (27.3)	17.8 (26.0)	NS
Entrades tancats	13.1 (3.3)	12.9 (2.6)	12.6 (3.8)	10.5 (5.6)	NS
Temps tancats	179.4 (37.1)	173.6 (33.3)	164.6 (63.3)	148.4 (60.9)	NS
Temps plataforma central	91.3 (26.4)	106.5 (18.1)	89.14 (24.2)	116.92 (42.3)	Lesió < Sham (p=0.011)
Defecacions	0	0.3 (0.5)	0.7 (1.2)	1 (1.6)	NS
Miccions	0.3 (0.5)	0.7 (0.9)	0.6 (0.6)	0.8 (0.5)	NS
Final en oberts	0.3 (0.7)	0.5 (0.8)	1.6 (2.9)	0.5 (0.7)	NS
Rearing	8.3 (3.0)	9.4 (4.1)	8.7 (4.0)	9.3 (4.3)	NS
Grooming	1.8 (1.3)	1.8 (1.5)	1.0 (0.9)	1.5 (1.5)	NS

Taula 1: mitjana (en negreta) i desviació estàndard (entre parèntesi) de les variables mesurades en el Laberint Elevat en Creu (LEC) per a cada grup experimental. La significació estadística està indicada en l'última columna. Grups 42d > Grups 21d indica un efecte significatiu del factor principal temps. En concret, els valors agrupats de les mitjanes lesió-42 i sham-42 eren més alts que els valors agrupats de les mitjanes de lesió-21 i sham-21. Lesió < Sham indica un efecte principal del factor Intervenció, els valors agrupats de les mitjanes dels dos grups lesió eren més baixos que els valors agrupats dels dos grups sham.

3.2.2 Memòria de Reconeixement d'Objectes (MRO)

Cinc subjectes van ser eliminats de les anàlisis de la MRO per no arribar al criteri d'exploració mínima durant el test. Així, doncs, la mostra final d'aquestes anàlisis estava formada per 44 subjectes (Lesió-21: 9; Sham-21: 12; Lesió-42: 12 i Sham-42: 11).

3.2.2.1 Habitució

Es va trobar un efecte principal de la sessió en el total de distància recorreguda [$F_{(2,90)}=47.07$; $p<0.001$], mentre que ni el factor intervenció, ni el factor temps, així com

tampoc les interaccions entre els factors principals, eren significatius. Els contrastos polinomials indicaren que l'evolució de la distància recorreguda s'ajustava a una funció quadràtica ($t=4.39$; $p<0.001$), amb una disminució marcada entre la primera i la segona sessions d'habitació.

3.2.2.2 Neofòbia

No es va trobar cap efecte principal, ni interacció entre factors per a cap de les variables mesurades en aquesta prova (latència de la primera exploració, distància total recorreguda i exploració de l'objecte).

3.2.2.3 Adquisició

No es va trobar cap efecte principal, ni interacció entre factors, per a cap de les variables mesurades (latència de la primera exploració, distància recorreguda i temps d'exploració total dels objectes).

3.2.2.4 Retenció 1 (3 hores)

El MLG indicà una tendència a la significació del factor intervenció en el temps d'exploració total dels objectes. En concret, els grups lesionats tendien a explorar menys que els grups sham ($p=0.099$) (veure Figura 8).

Retention Test 1 (3 hours)

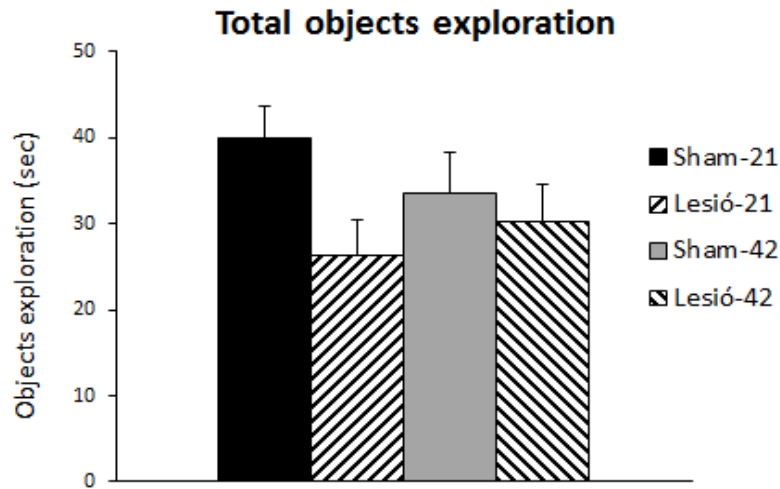


Figura 8: Exploració total dels objectes durant el test de retenció 1. Cada valor representa la mitjana \pm SEM.

La prova t de Student per a una mostra indicà que l'índex de discriminació era estadísticament superior a 0 en tots els grups: Lesió-21 [$t_{(8)}= 4.28$; $p=0.001$], Sham-21 [$t_{(11)}= 6.11$; $p<0.001$], Lesió 42 [$t_{(11)}= 5.90$; $p<0.001$] i Sham-42 [$t_{(10)}= 5.12$; $p<0.001$]. Per tant, tots els grups van mostrar un bon record de l'objecte familiar (veure Figura 9).

En relació a la mateixa variable, el MLG indicà que cap dels factors principals, ni la seva interacció eren significatius. Per tant, l'índex de discriminació a la retenció 1 no mostrava diferències significatives entre la condició TBI i la condició sham, ni tampoc en funció dels dies transcorreguts des de la intervenció quirúrgica. Així, doncs, tots els grups recordaven l'objecte familiar i els seus índex de discriminació eren similars.

Retention Test 1 (3 hours)

Discrimination Index

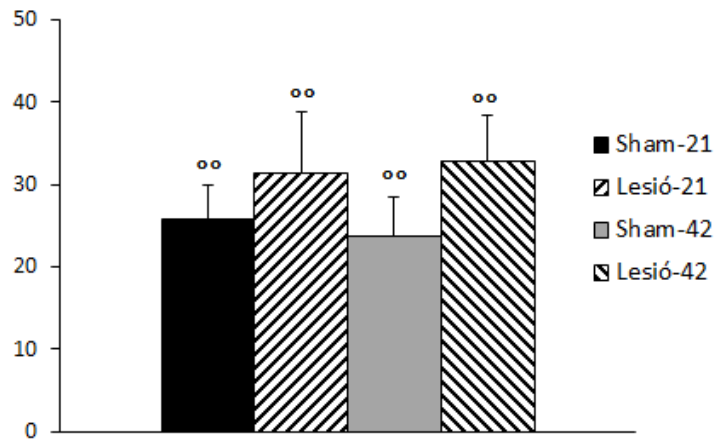


Figura 9: Índex de discriminació en el test de retenció 1. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. °Diferències respecte 0 en la prova t de Student per una mostra: °°(p<0.01).

3.2.2.5 Retenció 2 (24 hores)

Pel que fa a l'exploració total dels objectes, les anàlisis estadístiques indicaren que els grups amb lesió tendien a explorar menys que els sham, tot i que aquesta diferència no assolía la significació (p=0.061). Aquests resultats es mostren a la Figura 10.

Retention Test 2 (24 hours)

Total objects exploration

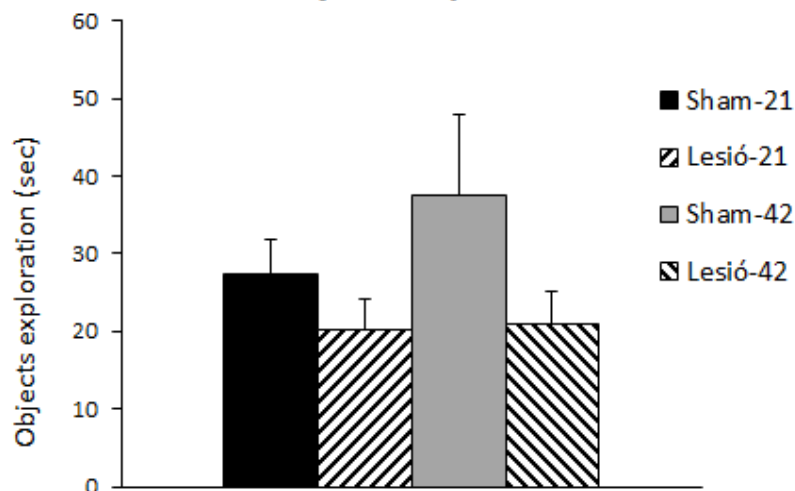


Figura 10: Exploració total dels objectes durant el test de retenció 2. Cada valor representa la mitjana \pm SEM.

La prova t de Student per a una mostra indicà que l'índex de discriminació era estadísticament superior a 0 en els dos grups sham: Sham-21 [$t_{(11)}= 8.61$; $p<0.001$] i Sham-42 [$t_{(10)}= 4.25$; $p<0.001$], mentre que no diferia significativament de 0 en cap dels dos grups lesió. Per tant, els dos grups sham van mostrar un bon record de l'objecte familiar, mentre que els grups lesió no mostraven record d'aquest.

El MLG indicà un efecte principal significatiu del factor Intervenció en l'índex de discriminació [$F_{(1,40)}=8.94$; $p=0.004$], mentre que ni el factor temps, ni la interacció entre els dos factors eren significatius. En concret, els grups TBI presentaven un índex de discriminació significativament inferior als grups sham (veure Figura 11).

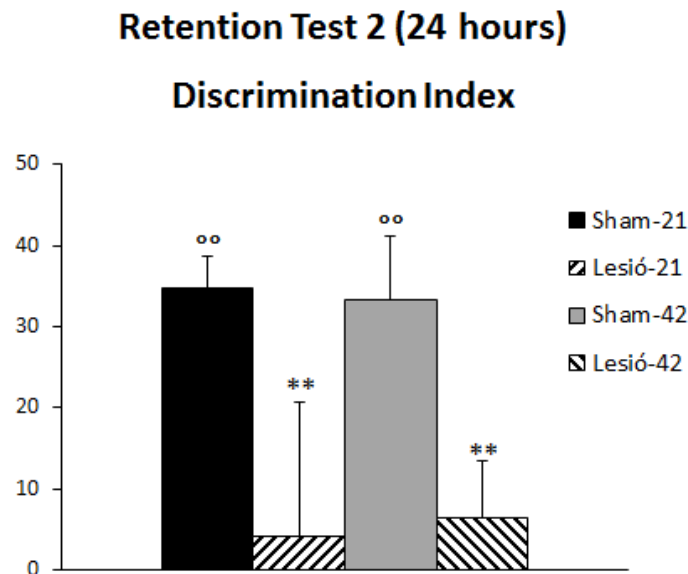


Figura 11: Índex de discriminació en el test de retenció 1. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. °°Diferències respecte 0 en la prova t de Student per a una mostra: °($p<0.01$). MLG: **Diferències respecte intervenció sham **($p<0.01$).

3.2.3 Valoració histològica

Es va analitzar si les ratios interhemisfèriques del volum de teixit de la formació hipocampal i del ventricle lateral eren significativament diferents al valor de referència (100%) mitjançant proves t de Student per a una mostra. En la Figura 12 es mostra una secció coronal representativa d'un subjecte lesionat on es pot veure la cavitat de la

lesió.

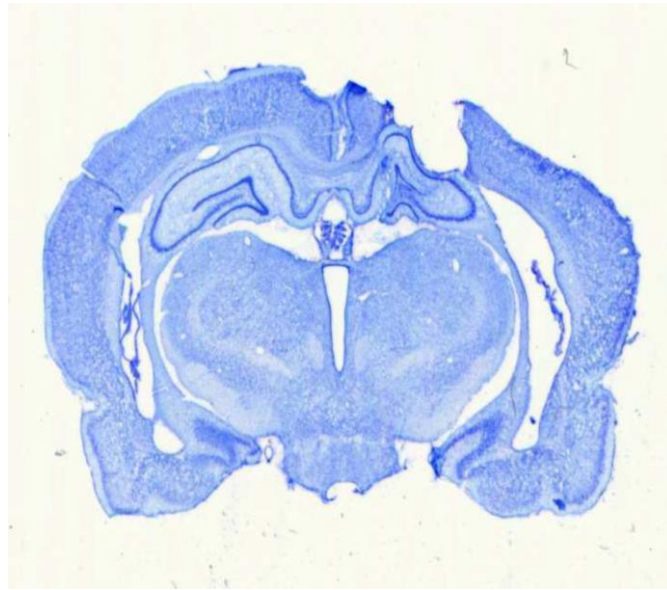


Figura 12: Microfotografia d'una secció de cervell tenyida amb violeta de cresil d'un animal representatiu de la condició TBI.

Aquestes anàlisis indicaren que en el grup Lesió-21 tant la ratio de l'hipocamp [$t_{(9)}=-3.64$; $p=0.002$], com la ratio del ventricle [$t_{(9)}=3.41$; $p=0.004$] eren significativament diferents a 100. De la mateixa manera, en el grup Lesió-42, tant la ratio de l'hipocamp [$t_{(13)}=-7.26$; $p<0.001$], com la ratio del ventricle [$t_{(13)}=2.97$; $p=0.005$] també diferien significativament de 100. És a dir, en els dos grups de lesió tant la formació hipocampal com el ventricle lateral de l'hemisferi ipsilateral tenien un volum significativament diferent al de l'hemisferi contralateral a la lesió, menor en el cas de la formació hipocampal i major en el cas del ventricle lateral.

La prova t de Student per a mostres independents indicà que no hi havia diferències entre els dos grups TBI ni en les ratio de l'hipocamp i del ventricle, ni en el volum de la cavitat de la lesió. Aquests resultats es representen en la Figura 13.

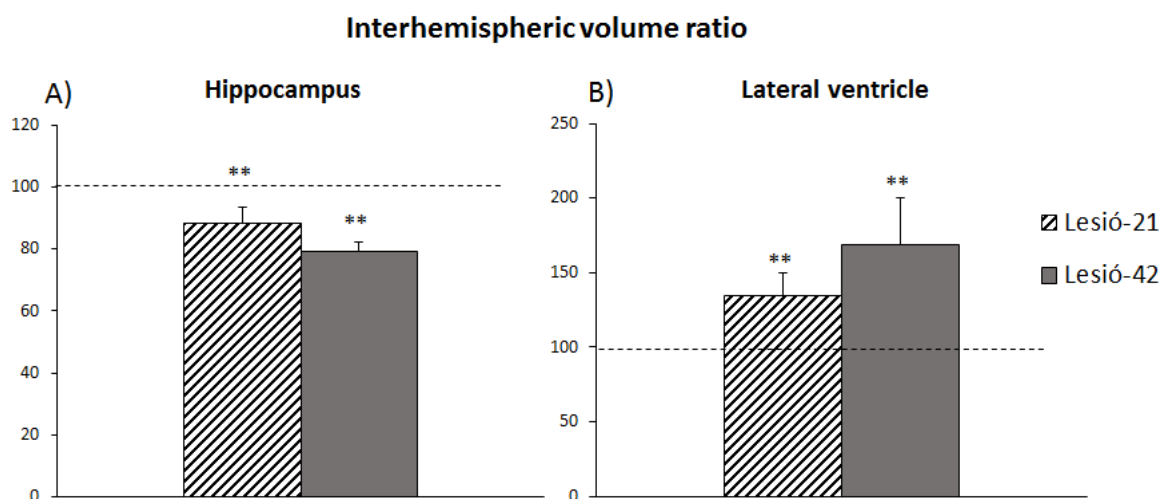


Figura 13: Ratio interhemisfèrica: A) del volum de l'hipocamp; B) del volum dels ventricles laterals. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. Diferències respecte 100 en la prova t de Student per una mostra: **($p < 0.01$).

3.3 Discussió

3.3.1 Dèficits de MRO induïts pel nostre model de TBI

Els resultats d'aquest experiment indiquen que en el test de retenció a 24 h els animals amb TBI no presentaven indicis de record de l'objecte familiar i el seu índex de discriminació era significativament inferior al dels animals amb cirurgia sham. Aquests dèficits s'observaven tant quan l'entrenament tenia lloc tres setmanes després de la lesió, com a les sis setmanes. Els dèficits observats a les tres setmanes concorden amb resultats previs del nostre laboratori (Jacotte-Simancas et al., 2015; Lorón-Sánchez, et al., 2016), mentre que els dèficits observats a les sis setmanes (tres setmanes més tard que a l'experiment anterior) indiquen que l'efecte del CCI sobre el nostre model de MRO es manté a llarg termini. De fet, s'estima que durant l'inici de la vida adulta tres setmanes en la vida d'una rata serien equivalents aproximadament a dos anys de vida en una persona jove (Sengupta, 2013).

En contraposició, en el present treball no s'han observat dèficits de la MRO mesurada en el test realitzat 3 h després de la sessió d'adquisició, a diferència del que sí s'havia observat amb anterioritat (Jacotte-Simancas et al., 2015; Lorón-Sánchez et al., 2016). Aquestes discrepàncies entre experiments podrien ser degudes a petites diferències en l'aplicació de la lesió, o a les manipulacions concretes de cada disseny experimental.

Tot indica que el record a les 3 h és menys vulnerable al nostre model de TBI, i la seva afectació pot dependre de petites variacions en la localització i extensió de la lesió. En canvi la retenció a les 24 h s'ha vist sistemàticament afectada en tots els treballs previs, la qual cosa indica que l'execució en aquesta prova és enormement vulnerable al model de TBI utilitzat.

El fet que els animals lesionats presentin diferent execució en els dos tests de retenció pot ser conseqüència que els requeriments associats a cada test siguin diferents, tant pel que fa a la demanda cognitiva, com al substrat neural subjacent de cada test. Molts estudis han mostrat que la PRhc té un paper clau en aquesta tasca (Barker, 2007; Brown, et al., 2012; Winters, Saksida, & Bussey, 2008), i aquesta regió interactua amb l'hipocamp i amb altres estructures de dins i fora el lòbul temporal medial (Warburton & Brown, 2015). En concret la PRhc s'ha relacionat amb el reconeixement que un objecte és familiar (Keally & Commins, 2011). Però, tot i que no es coneix la funció exacta de l'hipocamp en aquest circuit, hi ha aspectes que indiquen una major implicació d'aquesta regió en el segon test de retenció. En primer lloc, perquè la traça de memòria s'ha de mantenir durant més temps en el segon que en el primer test de retenció, i hi ha dades que indiquen que la participació de l'hipocamp en la MRO també sembla ser més important quan els temps de retenció són llargs (Hammond, Tull, & Stackman, 2004; Clark, Zola, & Squire, 2000). Però, al nostre entendre, la característica fonamental que diferencia els dos tests és que en el test de retenció a 24 h sempre es canvia la posició de l'objecte familiar respecte al test 1. Això augmenta el component espacial del segon test i s'ha vist que les tasques que tenen un important component espacial comporten una major participació de la formació hipocampal (Clark & Martin, 2005; Warburton & Brown, 2015). En un estudi previ del nostre laboratori, en el qual es va utilitzar la mateixa metodologia de MRO que l'emprada en aquest experiment, es va trobar una correlació positiva entre l'índex de discriminació a les 24 h (però no a les 3 h) i el número de neurones immadures en el gir dentat (Jacotte-Simancas et al., 2015). En aquest sentit, el dèficit sever de la MRO observat en el test de retenció 2 sembla estar relacionat, en gran mesura, amb la greu afectació de l'hipocamp produïda pel nostre model de CCI. Tot i així, el deteriorament d'altres estructures a part de l'hipocamp, com àrees corticals, tàlem i estriat (Zhao, et al., 2012), una disminució del número de neurones madures en la PRhc (Jacotte-Simancas,

et al., 2015), així com una àmplia varietat de processos fisiopatològics i neuroquímics (processos inflamatoris, estrès oxidatiu, dany axonal, desmielinització, alteracions dels sistemes de neurotransmissors i de les funcions neuroendocrines, etc) (Biegon et al., 2004; Budde, et al., 2011; Zhang, et al., 2014) poden haver contribuït al dèficit en la MRO observat en el present treball.

Altres treballs han descrit una reducció de la conducta exploratoria dels animals amb TBI, tant en la infantesa com en l'edat adulta (Ajao et al., 2012; Wagner, et al., 2007; Paterno, Metheny, & Cohen, 2018; Zhang et al., 2014). En el nostre experiment hem observat una certa disminució de la conducta exploratòria dels animals, però aquesta disminució no arribava a ser significativa. En tot cas, els dèficits de MRO no semblen atribuïbles a diferències entre grups en el nivell d'exploració dels objectes. Així, si bé els animals lesionats tendien a explorar menys que les rates sham durant els tests de retenció, aquestes diferències no s'observaren a la sessió d'adquisició. Cal tenir present, a més, que a les anàlisis estadístiques només es van incloure aquells animals que mostraren un nivell d'exploració que, segons estudis paramètrics de la MRO (Akkerman et al., 2012), era suficient per poder donar lloc a un bon record de l'objecte familiar. I, el que és més important, la mesura específica de MRO utilitzada (índex de discriminació) permet minimitzar la possible influència, sobre la memòria, de les diferències en el nivell d'exploració total dels objectes (Akkerman et al., 2012). A més, les rates amb TBI van presentar un percentatge d'exploració de l'objecte nou (respecte al temps total d'exploració de tots dos objectes) similar als animals sham en el primer test de retenció.

3.3.2 Evolució temporal dels dèficits de memòria

Molts estudis han analitzat l'evolució temporal del dèficit de memòria després d'un TBI en rosegadors joves mitjançant l'avaluació de les funcions mnèsiques en diferents moments post-TBI.

Un estudi que utilitzava el model de CCI en rates lesionades als 17 dies d'edat no va trobar dèficit de memòria quan els animals eren avaluats als 30 i 60 dies post-TBI (Ajao et al., 2012), però un estudi més a llarg termini va trobar dèficit de memòria espacial als 3 i 5 mesos post-TBI que semblava recuperar-se als 6 mesos (Kamper et al., 2013).

Amb models de TBI difús en rates als 17 dies d'edat es va trobar dèficit persistent de memòria al llarg de 3 mesos després de la lesió (Adelson, et al., 2013). En un altre treball, el TBI de tipus difús en rates de la mateixa edat va induir dèficit en l'adquisició d'una tasca espacial quan els animals eren avaluats pocs dies després de la lesió i també 3 setmanes més tard, però la memòria de la mateixa només es trobava afectada a les 3 setmanes (Huh, Widing, & Raghupathi, 2008). Per tant, encara que generalment es troba dèficit persistent de memòria en rosegadors immadurs, també hi ha alguns casos que el deteriorament apareix amb més demora, o altres en què es dona atenuació de la severitat del dèficit després d'un llarg període de temps.

Pel que fa als rosegadors lesionats durant l'adolescència (com en el nostre treball), la majoria d'estudis han avaluat la memòria en un sol moment post-TBI (Appelberg, Hovda, & Prins, 2009; Jacotte-Simancas et al., 2015; Mannix et al., 2014; (Mehan & Strauss, 2012; (Prins, et al., 2010). Un estudi recent va examinar l'evolució a llarg termini d'una tasca d'evitació passiva en rates sotmeses a CCI a les 4 setmanes d'edat, que correspondria a la infantesa tardana/començament de l'adolescència. El deteriorament de la memòria es va mantenir en tots els moments avaluats, des dels 7 dies fins les 12 setmanes post-TBI (Park et al., 2014). Els resultats obtinguts en el nostre treball indiquen que el CCI també causa dèficit persistent en la memòria en rates en l'adolescència tardana, doncs el deteriorament de la MRO a les 24h es trobava present 3 setmanes després de la lesió i es mantenia sense canvis a les 6 setmanes post-TBI, quan els animals ja eren adults.

3.3.3 Edat dels animals en el moment de la inducció del TBI i en el moment de les proves conductuals

Els animals tenien una edat de 7 setmanes en el moment de la cirurgia. Tot i que no hi ha una definició clara disponible de l'adolescència en rates, per les rates mascle, aquesta edat sembla correspondre a l'adolescència tardana (McCormick & Mathews, 2010; Schneider, 2013).

Durant l'adolescència es donen múltiples fenòmens del neurodesenvolupament, tals com poda sinàptica en moltes regions cerebrals i canvis en l'activitat de molts sistemes de neurotransmissors (Schneider, 2013). Alguns d'aquests processos estan relacionats amb un estatus neuroendocrí específic associat a aquest període de la vida, com un

increment substancial d'esteroides gonadals i de GH, així com amb una reactivitat diferencial de l'eix hipotalàmic-hipofisari-adrenal i una major vulnerabilitat a l'estrès, en comparació a altres edats (Masel & Urban, 2015; McCormick & Mathews, 2010; Schneider, 2013). A més del seu rol en el desenvolupament, les hormones gonadals i la GH, també participen en una varietat de processos emocionals i cognitius (Masel & Urban, 2015; McCormick & Mathews, 2010; Sisk & Zehr, 2005). Al seu torn, és habitual que es doni una alteració de la funció neuroendocrina en el TBI en humans, tant en l'edat adulta com en la infantesa i l'adolescència (Masel & Urban, 2015). En animals també s'ha observat una disrupció de la resposta a l'estrès després d'una lesió per FPI lleu (Griesbach, et al., 2011), i alteracions a llarg termini de l'eix adrenal, d'hormones gonadals i de GH en el model de CCI (Kasturi & Stein, 2009; Taylor et al., 2008; Zhang et al., 2014). Se sap que l'augment de corticosterona associat a l'estrès té efectes disruptors sobre la MRO en rates mascle, mentre que tant els estrògens com la testosterona exerceixen efectes moduladors positius en aquesta tasca (Luine, 2015). La GH intervé en una àmplia varietat de funcions cognitives i no-cognitives, i durant l'adolescència aquesta hormona i el seu mediador IGF-1 regulen l'expressió de molts gens relacionats amb funcions cerebrals (Yan et al., 2011). Zhang et al. (2014) van trobar que les rates mascles lesionades amb CCI presentaven nivells més baixos d'exploració total dels objectes en una tasca de MRO. Curiosament, l'exploració d'objectes augmentava mitjançant una teràpia de substitució de GH, però només en les rates que eren deficientes per aquesta hormona (les quals constituïen un 54.3% de tots els animals lesionats). Zang et al., (2014) no van trobar dèficit de MRO segurament degut a que el temps de demora entre l'adquisició i la retenció era relativament curt (1 h). Per tant, la deficiència de GH pot contribuir a l'alteració del nivell d'exploració dels objectes durant l'entrenament en MRO, però no és la seva única causa. Donat que en el present treball no s'han realitzat mesures endocrines, no podem descartar deficiència de GH en algun dels animals, ni que aquestes possibles deficiències hagin pogut reduir la conducta exploratòria (tot i que en conjunt aquesta reducció no era significativa).

3.3.4 Efectes del TBI sobre la reactivitat emocional i l'activitat locomotora

El nostre model de TBI no va induir *per se* cap alteració en la reactivitat emocional dels animals, ni als 21 ni als 42 dies de la lesió, en les variables del LEC que es relacionen més directament amb la reactivitat emocional (ratio temps i entrades braços oberts). L'única diferència entre els subjectes sham i els lesionats és que aquests últims passaven menys temps en la plataforma central, contràriament al que s'havia reportat en un altre estudi amb rates femelles preadolescents poc temps després de ser sotmeses a TBI lleu mitjançant el mètode de weight drop (Mychasiuk, Farran, & Esser, 2014). Tot i així, el significat d'aquesta variable no és clara; en tot cas s'ha suggerit que seria una mesura associada a la presa de decisions i a l'avaluació del risc, és a dir, a la valoració de si resulta segur o no entrar en els braços oberts (Casarrubea et al., 2013; Cruz, Frei, & Graeff, 1994). Si fos així, el TBI focal amb contusió podria donar lloc a una menor capacitat per valorar el risc davant de situacions noves i potencialment amenaçadores, sense cap canvi significatiu en les conductes relacionades amb l'ansietat.

Hi ha resultats controvertits en la literatura respecte al TBI i la reactivitat emocional. Per exemple, en un treball es va trobar que la reactivitat emocional, mesurada també en un LEC estava disminuïda en els ratolins de 15 setmanes d'edat als 21 dies post-TBI, en comparació als ratolins sham, i aquesta resposta era independent de la severitat de la lesió (Washington et al., 2012). En altres treballs s'ha descrit just a la inversa, ja que el CCI augmentava la conducta associada a ansietat en el laberint elevat en zero, als 60 dies post-TBI, en rates lesionades als 17 dies d'edat. En canvi, aquest mateix model no va trobar canvis en la reactivitat emocional quan es mirava a més llarg termini (Ajao et al., 2012). Això sembla indicar que l'efecte que produeix el TBI en la reactivitat emocional pot variar en funció del temps que transcorre entre la lesió i el test.

Mentre que en aquest treball no s'ha observat cap efecte del TBI sobre la reactivitat emocional, sí que s'ha trobat un efecte del temps transcorregut. Així, les dades mostren que les rates que realitzaven el LEC als 42 dies post-cirurgia (quan tenien 13 setmanes d'edat) presentaven una reducció de la conducta ansiosa respecte a les rates que realitzaven el LEC als 21 dies (quan tenien 10 setmanes). El fet que no hi hagi interacció entre el tipus de cirurgia i el temps transcorregut ens fa pensar que l'efecte és atribuïble a l'edat, de manera concordant amb la disminució de la reactivitat

emocional observada per altres investigadors entre l'adolescència i l'adulthood primerenca (Lynn i Brown, 2010). Les diferències en la reactivitat emocional en funció de l'edat podrien estar relacionades amb les variacions en l'estatus hormonal i amb la major vulnerabilitat a l'estrès dels animals més joves (Masel & Urban, 2015; McCormick & Mathews, 2010; Schneider, 2013). Com hem dit abans, donat que en el present treball no s'han mesurat els nivells hormonals, no podem confirmar ni descartar aquesta possibilitat. Addicionalment, o alternativament, les diferències entre els dos moments avaluats podrien ser conseqüència no de diferències en l'edat sinó en el temps en què els animals van romandre pràcticament sense manipulacions (a part de les habituals per a la seva cura).

El temps transcorregut des de la cirurgia també va afectar a l'activitat locomotora en el test de neofòbia, en el qual els animals sham avaluats a les 3 setmanes presentaven un nivell més alt de locomoció que els avaluats a les 6 setmanes. Aquest efecte, però, no es donà en els animals TBI. El diferent nivell d'activitat locomotora resulta concordant amb els resultats d'un treball de Saul i col·laboradors (Saul et al., 2012) que indicaren que el nivell de locomoció de rates que eren introduïdes per primer cop en una gàbia amb objectes nous (un test similar al de neofòbia) era superior als 72 que als 117 dies d'edat. És a dir, l'edat pot influir en l'activitat locomotora en determinades circumstàncies, però aquest efecte podria no donar-se en animals amb TBI.

3.3.5 Efectes del TBI sobre les mesures macroscòpiques del dany cerebral

A nivell histològic, aquest model de TBI va produir una cavitat de lesió a nivell del lòbul parietal, que s'extenia aproximadament 3.5 mm en sentit anteroposterior, pèrdua de volum en l'hipocamp dorsal ipsilateral respecte al contralateral, així com una expansió del ventricle lateral de l'hemisferi de la lesió, tal com ja s'havia vist en un treball previ al nostre laboratori (Jacotte-Simancas et al., 2015). No es van trobar diferències entre els dos grups de lesió en les variables analitzades; és a dir, el dany en el teixit cerebral produït per la lesió era similar en els dos períodes de temps estudiats. Així, doncs, la similitud en les dades macroscòpiques de dany cerebral era paral·lela a la similitud en els dèficits de MRO trobats. Això no descarta, però, que pogués haver-hi diferències, entre els dos temps mesurats, en altres mesures relacionades amb el dany cerebral, o en períodes de seguiment més prolongats, tal com s'ha trobat en altres treballs

(Bouilleret et al., 2009; Bramlett & Dietrich, 2002; Chen, Pickard, & Harris, 2003; Immonen et al., 2009; Liu et al., 2010; Pierce, et al., 1998; Turtzo et al., 2012).
(Bouilleret et al., 2009; Bramlett & Dietrich, 2002; S. Chen et al., 2003; Immonen et al., 2009; Y. R. Liu et al., 2010; Pierce et al., 1998; L. C. Turtzo et al., 2012)

3.4 Conclusions

En conclusió, el deteriorament de la MRO induït pel TBI als 21 dies de la lesió, es manté als 42 dies. Això ha permès estudiar l'efecte de l'exercici físic sobre la MRO en períodes de temps superiors als estudiats fins ara en el nostre laboratori.

D'altra banda, hem pogut descartar que el deteriorament de la MRO induït pel CCI sigui atribuïble a canvis en la reactivitat emocional, en el nivell d'exploració global dels objectes, o en l'activitat locomotora.

EXPERIMENT 2

4. EXPERIMENT 2

Els resultats obtinguts en l'Experiment 1, que indicaven que el deteriorament cognitiu observat a les 3 setmanes es segueix mantenint a més llarg termini (Amorós-Aguilar et al., 2015), van permetre estudiar, en l'Experiment 2, els efectes de diferents pautes temporals de tractament amb exercici físic.

Concretament, els objectius específics de l'Experiment 2 van ser:

1. Avaluar l'efecte de tres pautes temporals d'exercici físic (demorat, continuat i interromput) sobre el dèficit de MRO, tant a curt termini (3 hores) com a llarg termini (24 hores), produït pel TBI.
2. Estudiar l'efecte de les tres pautes de tractament sobre:
 - a. Mesures macroscòpiques de la lesió
 - b. El número de neurones madures (cèl·lules NeuN+) en l'hilus del gir dentat i l'escorça perirhinal
 - c. La neuroinflamació (cèl·lules Iba1+) en l'hipocamp dorsal
 - d. La neurogènesi (cèl·lules DCX+) en la capa granular del gir dentat
3. Determinar si la reducció i/o reversió del dèficit de la MRO de les diferents pautes de tractament estava més relacionada amb una acció neuroprotectora, una acció neuroreparadora, o ambdues.

4.1 Mètodes

Ètica i benestar animal

El procediment experimental dut a terme en aquesta investigació s'ha realitzat seguint la normativa vigent de la Unió Europea referent a les disposicions legals, de reglament i administratives respecte la protecció dels animals utilitzats en l'experimentació i altres finalitats científiques (2010/63/UE, de 22 de setembre de 2010), i d'acord amb el decret de l'Estat Espanyol (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrer de 2013) que regula els aspectes ètics i de cura i control dels animals per a l'experimentació. L'experiment ha estat aprovat per la Comissió d'Ètica en experimentació animal i humana (CEEAH)

de la Universitat Autònoma de Barcelona i pel departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (DARP) de la Generalitat de Catalunya (nº d'ordre 5036).

4.1.1 Subjectes

En aquest treball s'han utilitzat un total de 77 rates albines mascle, de la soca Sprague-Dawley, subministrades per Prolabor, amb una edat de 6 setmanes en el moment d'arribada al laboratori. Els animals van estar una setmana en quarantena per assegurar que no tenien cap problema de salut. Passada la quarantena, a les 7 setmanes d'edat, les rates s'estabulaven individualment en caixes, i s'assignaven a l'atzar a una de les cinc condicions experimentals següents: intervenció sham mantingut en condició sedentària (grup Sham), lesió mantingut en condició sedentària (grup L-sed), i lesió amb accés a exercici físic durant diferents períodes: grup amb exercici demorat (L-sed-exe), grup amb exercici interromput (grups L-exe-sed) i grup amb exercici continuat (L-exe-exe).

Al segon i tercer dia de la separació, les rates es manipulaven 5 min al dia, per tal que s'habituessin a la manipulació experimental i a l'experimentador. El pes mig dels animals a l'inici de l'experiment (primer dia de manipulació) era de 229.75 g (s=10.75).

4.1.2 Intervenció quirúrgica

Al sisè dia de la separació es va procedir a la intervenció quirúrgica, per realitzar la lesió cerebral traumàtica, mitjançant el model d'impacte cortical controlat (Pittsburgh Precision Instruments, Inc, USA).

El procediment era idèntic al descrit en l'Experiment 1 (veure apartat 3.1.2).

4.1.3 Exercici en la roda d'activitat

Durant els períodes de tractament amb exercici físic, els animals es van estabular individualment en gàbies homologades de plàstic transparent de 48 x 26 x 20 cm, acoblades a una roda d'activitat de 37 cm de diàmetre (Rat Wheel, ENV-042, Med Associates, Inc. USA). Les rates tenien accés il·limitat a les rodes durant el període d'exercici, i aquest era de tipus voluntari. La durada del període d'exercici físic diferia en funció del grup: els subjectes dels grups L-exe-sed i L-exe-exe iniciaven l'exercici 4 dies

després de la intervenció quirúrgica, i tenien accés a la roda durant 3 (grup L-exe-sed) o 7 setmanes (grup L-exe-exe). D'altra banda, els animals del grup L-sed-exe iniciaven l'exercici 4 setmanes després de la cirurgia i tenien accés a la roda fins al final de l'experiment (un total de 3 setmanes) (veure Figura 15). El període d'exercici de 3 setmanes s'ajusta al temps d'exercici amb què en un experiment previ hem observat reducció del dèficit de memòria quan aquest tractament s'inicia 4 dies després del TBI i la MRO s'avalua 24 dies després de la lesió (Jacotte-Simancas et al 2015). Les gàbies utilitzades en els grups Sham i L-sed, així com per als altres grups durant les fases sedentàries, eren homologades, de plàstic transparent i de mida similar a les altres (52 x 28 x 18 cm; veure Figura 14).



Figura 14: Detall de les gàbies d'estabulació en la condició sedentària i en la condició d'exercici.

Durant tot l'experiment, es va limitar el menjar a què tenien accés els animals a 6 pellets diaris (una quantitat de menjar per sobre de la necessària per mantenir un pes adequat per a la seva edat), ja que en el nostre laboratori hem constatat que l'accés il·limitat a menjar propicia un excés d'ingesta i tendència a l'obesitat, especialment en els animals sedentaris. L'aigua es va administrar *ad libitum* i es van controlar les condicions de temperatura (20 - 24 °C) i humitat (40 - 70%). També es va mantenir artificialment el cicle de 12 hores llum-fosc, llum de 8 a 20 h i fosc de 20 a 8 h.

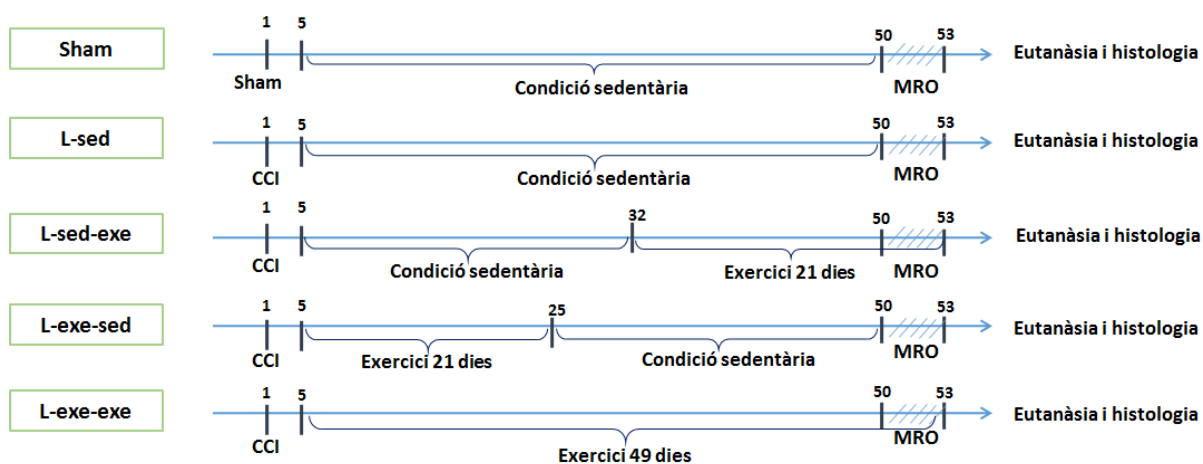


Figura 15: Cronograma de l'Experiment 2. CCI=Controlled Cortical Impact; MRO=Memòria de Reconeixement d'Objectes.

4.1.4 Memòria de reconeixement d'objectes (MRO)

L'entrenament en la MRO es va realitzar entre els dies 50 i 53 posteriors a la intervenció. El procediment utilitzat, així com les variables enregistrades i els criteris d'exploració mínima, van ser idèntics als descrits en l'Experiment 1 (veure apartat 3.1.4).

Les sessions d'habitució van tenir lloc durant els dies 50 (sessió 1 i 2) i 51 (sessió 3) postcirurgia, el test de neofòbia durant el dia 51; la prova d'adquisició i la primera prova de retenció durant el dia 52, i la segona prova de retenció durant el dia 53 postcirurgia.

El cronograma de les diferents fases experimentals de cada grup es pot veure a la Figura 15.

4.1.5 Histologia

4.1.5.1 Eutanàsia i perfusió intracardíaca

Un dia després de la retenció 2, els animals eren sacrificats amb una sobredosi de pentobarbital sòdic (Dolethal, 200 mg/kg; Vetoquinol S.A; Madrid-Espana) i es procedia a la perfusió intracardíaca amb PFA al 4% (Sigma Aldrich, Madrid). Es va utilitzar una bomba de perfusió a 30 r.p.m. amb un caudal aproximat de 70 ml/min (J.P Selecta, S.A Barcelona). Es van extraure els cervells i es van deixar en una solució de PFA al 4% a 4°C durant 3 h, per a la post-fixació del teixit. Posteriorment es van fer tres rentats amb tampó fosfat (PBS pH 7.4, 0.1M) i es van deixar en una solució crioprotectora de

sacarosa 30% i tampó fosfat durant 72 h a 4°C. Transcorregut aquest temps, es va procedir a la congelació dels encèfals, mitjançant isopentà (metilbutà, Sigma Aldrich) i a la seva conservació a -80°C fins el moment de realitzar les seccions coronals. Aquestes es feien a un gruix de 40 µm, amb un criòstat (Shandon Cryotome FSE, Thermo Electron Corporation). Per tal d'identificar l'hemisferi, abans del seccionament es realitzava un senyal a l'hemisferi contralateral a la lesió. Es recollien totes les seccions compreses aproximadament entre les coordenades anteroposteriors -0.72 i -5.52 mm respecte Bregma (Paxinos & Watson, 2007). Nou de cada 10 seccions es col·locaven en plaques de pous en condició free-floating i es mantenien a -20 °C en una solució anticongelant fins al moment de les proves immunohistoquímiques. Cada un dels pous contenia una sèrie de seccions equidistants. La desena secció de cada sèrie es muntava en un porta-objectes per a la posterior tinció amb violeta de cresil.

4.1.5.2 Tinció amb violeta de cresil

Per a la tinció amb violeta de cresil i l'obtenció de les imatges, es va seguir el mateix procediment de tinció descrit en l'Experiment 1, però amb la diferència que es recollia cada 10 seccions equidistants, en comptes de cada 5. Les mesures volumètriques realitzades van ser: determinació de la coordenada d'inici de la lesió, la profunditat màxima de cavitat de la lesió i la ratio hipocampal (calculada tal com s'ha explicat a l'Experiment 1).

4.1.5.3 Immunohistoquímica de DCX, NeuN i Iba1

Per determinar el nivell de neurogènesi en la capa subgranular del gir dentat de l'hipocamp, es va realitzar el processament immunohistoquímic de doblecortina (DCX), i la posterior quantificació de cèl·lules DCX+. La DCX és una fosfoproteïna associada a microtúbuls que marca neurones immadures i que s'expressa a partir de les 2-3 setmanes després del naixement de la cèl·lula, i deixa d'expressar-se quan esdevé una neurona madura (Gonçalves et al., 2016).

També es va realitzar la immunohistoquímica per a la quantificació de cèl·lules NeuN+ a l'hilus del gir dentat, i a la PRhc, una regió allunyada de la cavitat de la lesió però que juga un paper clau en la MRO (Warburton & Brown, 2015). La proteïna nuclear neuronal (neuronal nuclear protein, NeuN) és un marcador específic per neurones que

es localitza al nucli i al citoplasma perinuclear de la majoria de les neurones madures del SNC (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015).

Per estudiar la resposta inflamatòria es va realitzar el processament immunohistoquímic per a l'anticòs Iba1, i es va quantificar la intensitat de marcatge i l'àrea ocupada per cèl·lules de micròglia en l'hipocamp dorsal. Iba1 (ionized calcium-binding adaptor 1) és una proteïna específica de macròfags i micròglia i la seva expressió augmenta quan la micròglia està activada (Imai, et al., 1996; Ito, et al., 2001). Per a la immunohistoquímica es van seleccionar 7 subjectes per grup, és a dir, un total de 35 subjectes. Per a la selecció de la mostra, en primer lloc, es van excloure els animals que tenien el teixit en males condicions en les altres proves immunohistoquímiques. De la mostra restant, es van excloure els subjectes que presentaven valors estadísticament atípics per a les variables profunditat màxima de la cavitat de lesió i ratio hipocamp, obtingudes en la valoració macroscòpica del teixit de les seccions tenyides amb violeta de cresil. Finalment, de la mostra restant, es van seleccionar a l'atzar 7 subjectes per grup.

En cada subjecte i per a cada marcador utilitzat es va realitzar un mostreig aleatori i sistemàtic de les seccions coronals (elecció aleatòria de la sèrie de seccions coronals utilitzada). Els procediments immunohistoquímics de DCX i de NeuN es van portar a terme mitjançant el mètode de l'estreptavidina-biotina i el revelat amb DAB i níquel. Les seccions estaven en constant agitació a 80 r.p.m. durant tot el procediment. Es van incubar amb una solució de H₂O₂ al 0.3% (Panreac) diluïda en TBS (Tris HCl 50 mmol/L, pH 7.6) per fer reaccionar la peroxidasa endògena del propi teixit. Seguidament, es feien successius rentats amb les solucions tampó i es procedia a la preincubació amb 10% de New Calf Serum (NCS), per al bloqueig d'unions inespecífiques. Posteriorment, es realitzava la incubació amb l'anticòs primari, ja sigui Rabbit polyclonal anti-DCX (18723, Abcam, 1:4000); o bé, Mouse anti-NeuN (MAB377, Chemicon, Millipore, 1:1000), diluït en una solució de TBS-T i NCS al 5%, durant una hora a temperatura ambient i durant tota la nit a 4°C. Al dia següent, es tornaven a fer rentats successius en les diferents solucions tampó i s'incubava amb l'anticòs secundari biotinitat, diluït en TBS-T i NCS al 5% a temperatura ambient durant 1 h (per la immunohistoquímica de DCX: Goat anti-rabbit IgG, Biotin Conjugate, A16114, Thermo Fisher Scientific, 1:500;

per la immunohistoquímica de NeuN: Goat anti-mouse IgG (H+L), Biotin Conjugate, A16082, Thermo Fisher Scientific, 1:1000). Després de rentats successius, el teixit s'incubava amb una solució amb estreptavidina unida a peroxidasa del rave i diluïda en TBS-T (1:3600, SA-HRP conjugate, NEL 750001EA, Perkin Elmer) que s'uneix a la biotina de l'anticòs secundari i permet revelar la DAB. Després dels rentats successius, es procedia al revelat mitjançant un kit de DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate, SK-4200, Vector) i es deixava actuar durant 5 min aproximadament. En cada placa hi havia almenys un pou per cada grup experimental. A més, hi havia un pou que era control de l'anticòs secundari (tenia anticòs secundari, però no primari), que també servia de referència pel temps del revelat. Per últim, es feien els rentats successius amb les solucions tampó i les seccions eren muntades en portaobjectes i es procedia a la deshidratació mitjançant alcohols (50%, 70%, 95%, 100%) i finalment HistoClear. Per acabar, es cobria el teixit amb medi de muntatge (Histomount mounting media, National Diagnostics).

El procediment de la immunohistoquímica d'Iba1 es va realitzar amb algunes variacions respecte el de NeuN i DCX. Les seccions, que estaven en constant agitació a 80 r.p.m., es van incubar en una solució de H_2O_2 al 0.15% (Panreac) diluïda en aigua destil·lada i metanol al 70% (Panreac) per fer reaccionar la peroxidasa endògena del propi teixit. Seguidament, es feien successius rentats amb les solucions tampó i es procedia a la pre-incubació amb 10% de Fetal Bovine Serum (FBS) i 0.3% de Bovine Serum Albumin (BSA) diluït en TBS-T (Tris HCl 50 mmol/L, pH 7.6 + 1% Tritó), per al bloqueig d'unions inespecífiques. Posteriorment, es realitzava la incubació amb l'anticòs primari (1:800 Rabbit polyclonal anti-Iba1, GTX100042, Genetex) diluït en la mateixa solució bloqueig, durant tota la nit a 4°C. Al dia següent, després d'una hora a temperatura ambient, es tornaven a fer rentats successius en les diferents solucions tampó i s'incubava amb l'anticòs secundari biotinitat que havia estat diluït en glicerol prèviament a la congelació, i aquest es diluïa en la solució bloqueig, a temperatura ambient durant 1 hora (Goat anti-rabbit IgG, Biotin Conjugate, A1664, Thermo Fisher Scientific, 1:250, equivalent a 1:500 sense diluir en glicerol). La resta de procediment es realitzava igual que en els altres procediments immunohistoquímics descrit.

4.1.5.4 Quantificació de les cèl·lules DCX+

La quantificació per a les cèl·lules DCX+ es va realitzar en la capa granular del gir dentat de l'hipocamp, tant de l'hemisferi ipsilateral a la lesió, com del contralateral. Es van seguir els principis d'estereologia i per tant, es va fer un mostreig aleatori i sistemàtic de les zones a quantificar (dissectors) dins una mateixa secció. La coordenada anteroposterior de la primera secció es trobava aproximadament a -2.40 mm respecte Bregma (Paxinos & Watson, 2007). Es va aplicar la tècnica del dissector físic, i es va treballar amb imatges obtingudes amb un microscopi de platina motoritzada (Eclipse TE2000-e), amb el software Metamorph i amb un objectiu de 40x a camp clar. Un cop adquirides, les imatges eren processades amb Image J (Schindelin et al., 2012) per generar un mosaic de la regió d'interès, i quantificades a partir d'aquests. Posteriorment, es mesurava l'àrea de la regió d'interès i sobre aquesta s'aplicava una quadrícula amb l'Image J. L'àrea continguda en un quadre de la quadrícula era el dissector. Aquest contenia dos costats d'inclusió i dos costats d'exclusió, per evitar quantificar dues vegades la mateixa cèl·lula. La quantificació es feia manualment, utilitzant l'Image J i també es comptava el número de dissectors quantificats. Finalment, s'aplicava la fórmula del dissector físic, per tal d'obtenir l'estimació del total de cèl·lules en cada gir dentat (N_V) (veure Figura 16) i a partir d'aquesta, s'obtenia una estimació de la densitat ($N_V/\text{àrea}$) i una estimació del número de cèl·lules per secció ($N_V/\text{seccions}$). També es va calcular la mitjana de l'àrea mesurada. Val a dir que no es treballava amb volum (ja que la quantificació no es feia directament al microscopi, sinó a partir dels mosaics digitalitzats), sinó a partir d'àrees i per tant, la densitat contemplava una àrea i no el volum d'una regió.

Tant l'estimació del número de cèl·lules DCX+ com la seva densitat es van analitzar per separat per a cada hemisferi i pel conjunt dels dos hemisferis.

$$N_V = \sum Q^- / (\sum S_{dis} \cdot h)$$

Figura 16: Fórmula dissector físic. (N_V): Estimació del total de cèl·lules; ($\sum Q^-$): sumatori de cèl·lules quantificades; ($\sum S_{dis}$): número de dissectors quantificats x àrea dissector; (h): altura dissector (s'ha considerat 1, doncs no es treballa amb volum, sinó amb les àrees).

Es va tenir en compte tota la capa granular com a àrea de referència. En total es van quantificar entre 5 i 7 seccions per subjecte. En el mosaic, es va aplicar una quadrícula

amb una àrea per dissector de $8303 \mu\text{m}^2$ i es van quantificar un de cada dos dissectors (veure Figura 17).

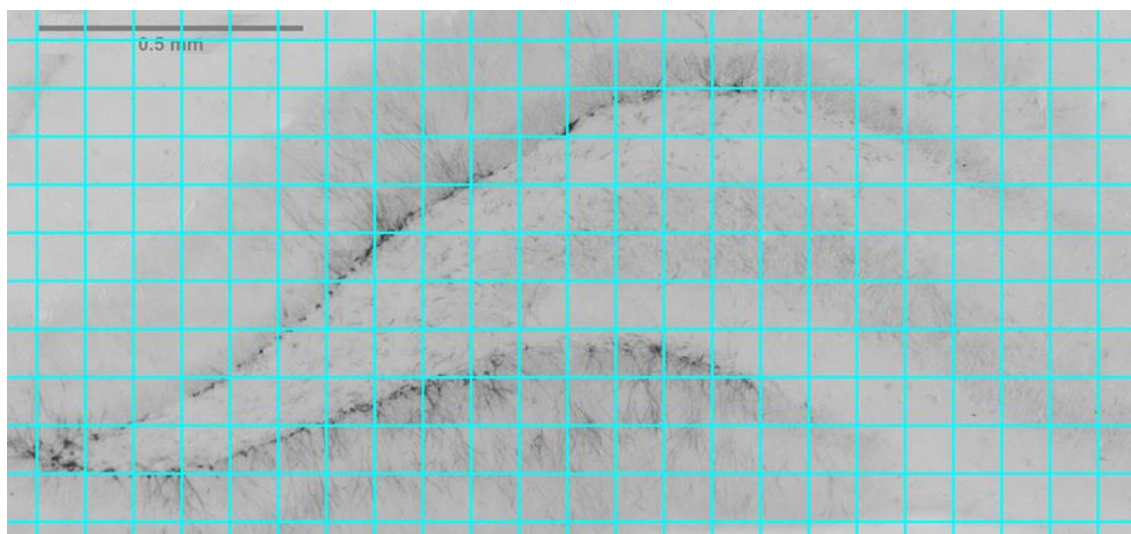


Figura 17: Exemple d'una mosaic de cèl·lules DCX+ en el gir dentat amb la quadrícula de dissectors.

4.1.5.5 Quantificació de les cèl·lules NeuN+

La quantificació de les cèl·lules NeuN+ es va realitzar a la PRhc i l'hilus del gir dentat, tant de l'hemisferi ipsilateral a la lesió, com del contralateral. Les mostres de NeuN en ambdues regions es van obtenir amb el mateix equip (microscopi, software i processament d'imatges) que l'emprat en les mostres de DCX, però en aquest cas l'objectiu era de 20x. En total es van quantificar 3 seccions per a cada subjecte, tant de PRhc, com d'hilus, és a dir, una de cada 20 seccions. La coordenada anteroposterior de la primera secció de l'hilus es trobava, en promig, a -2.40 mm respecte a Bregma; en el cas de la PRhc, la primera secció corresponia aproximadament a -3.00 mm respecte Bregma (Paxinos & Watson, 2007).

En la PRhc, el procediment de quantificació era el mateix que per a la DCX, i es va calcular el número de cèl·lules estimades en la PRhc de cada hemisferi i en el conjunt dels dos (N_V), la densitat de cèl·lules NeuN+ ($N_V/\text{àrea}$) i la mitjana de l'àrea mesurada. En aquest cas, la quadrícula era de $1245.5 \mu\text{m}^2$ (àrea del dissector) i es van quantificar 1 de cada 25 dissectors. En la Figura 18 es mostra un exemple de mosaic amb l'àrea de la PRhc seleccionada.

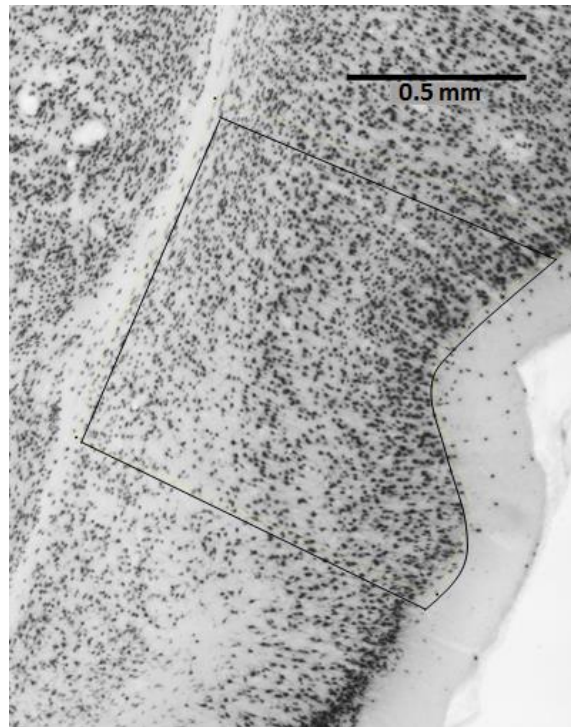


Figura 18: Mosaic de la PRhc amb marcatge NeuN i l'àrea de quantificació seleccionada.

Donat que l'hilus és una regió de poca densitat cel·lular, en comptes de fer una estimació del número total de cèl·lules a partir de les quantificades en dissectors específics, es va mesurar l'àrea d'aquesta regió i es van quantificar totes les cèl·lules NeuN+ contingudes dins d'ella. En la Figura 19 es mostra un exemple de l'àrea quantificada en l'hilus.

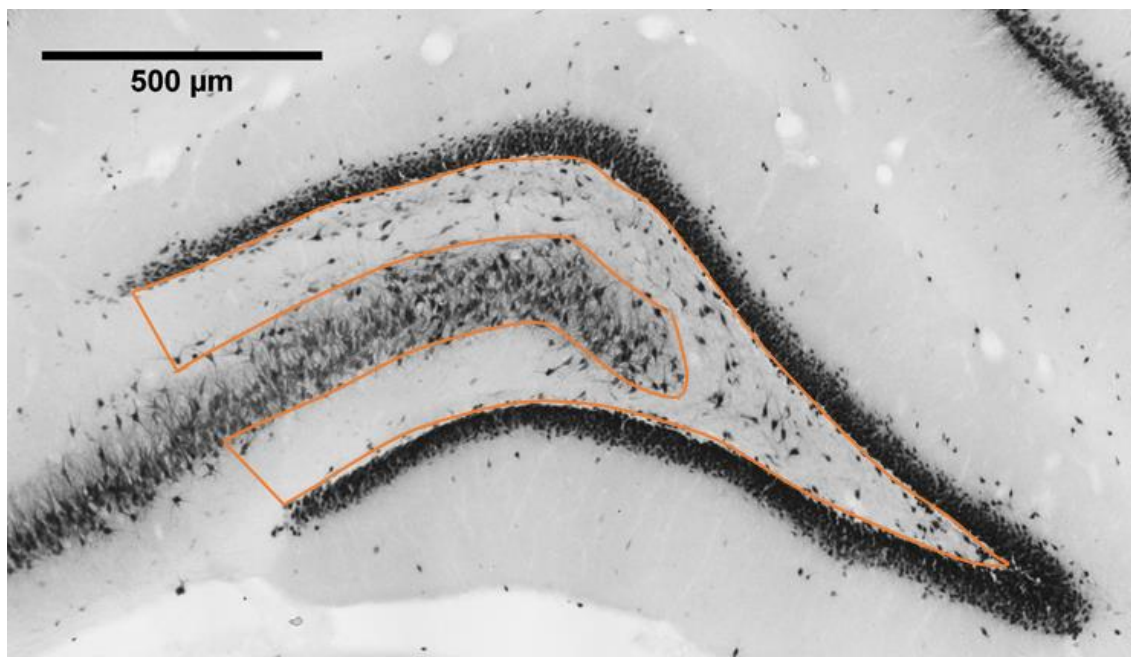


Figura 19: Mosaic de l'hilus amb marcatge NeuN i l'àrea de quantificació seleccionada.

4.1.5.6 Quantificació d'Iba1

Finalment, la quantificació del marcatge d'Iba1 es va realitzar en seccions de l'hipocamp dorsal tant en l'hemisferi ipsilateral com en el contralateral. La primera secció es trobava, en promig, aproximadament a la coordenada anteroposterior -2.40 mm respecte a bregma (Paxinos & Watson, 2007).

En aquest cas, el procediment de quantificació va ser distint, i a més es va realitzar en primer lloc una valoració qualitativa, seguida per l'anàlisi quantitativa. En l'anàlisi quantitativa no es comptava el número de cèl·lules Iba1+, sinó l'àrea ocupada pel marcadore Iba1 i la intensitat del marcatge.

Anàlisi qualitativa

Es van classificar entre 6 i 8 seccions per a cada subjecte en una escala gradual analògica compresa entre – i +++++, a partir de la visualització amb un microscopi (Nikon Eclipse 80i) tant a magnificació a 4x com a 20x (veure Taula 2). La classificació es va fer a cegues, sense saber de quin grup experimental eren les seccions. Segons els criteris utilitzats, una secció es considerava – quan la majoria de cèl·lules Iba1+ presentaven una morfologia ramificada “resting”. Les seccions valorades com a +++ corresponien a les que tenien un focus, definit com un agregat dens de cèl·lules Iba1+ activades, o més d'un pre-focus (definit com a agregats de cèl·lules Iba1 majoritàriament activades, però menys densos que els focus) (veure Figura 20).

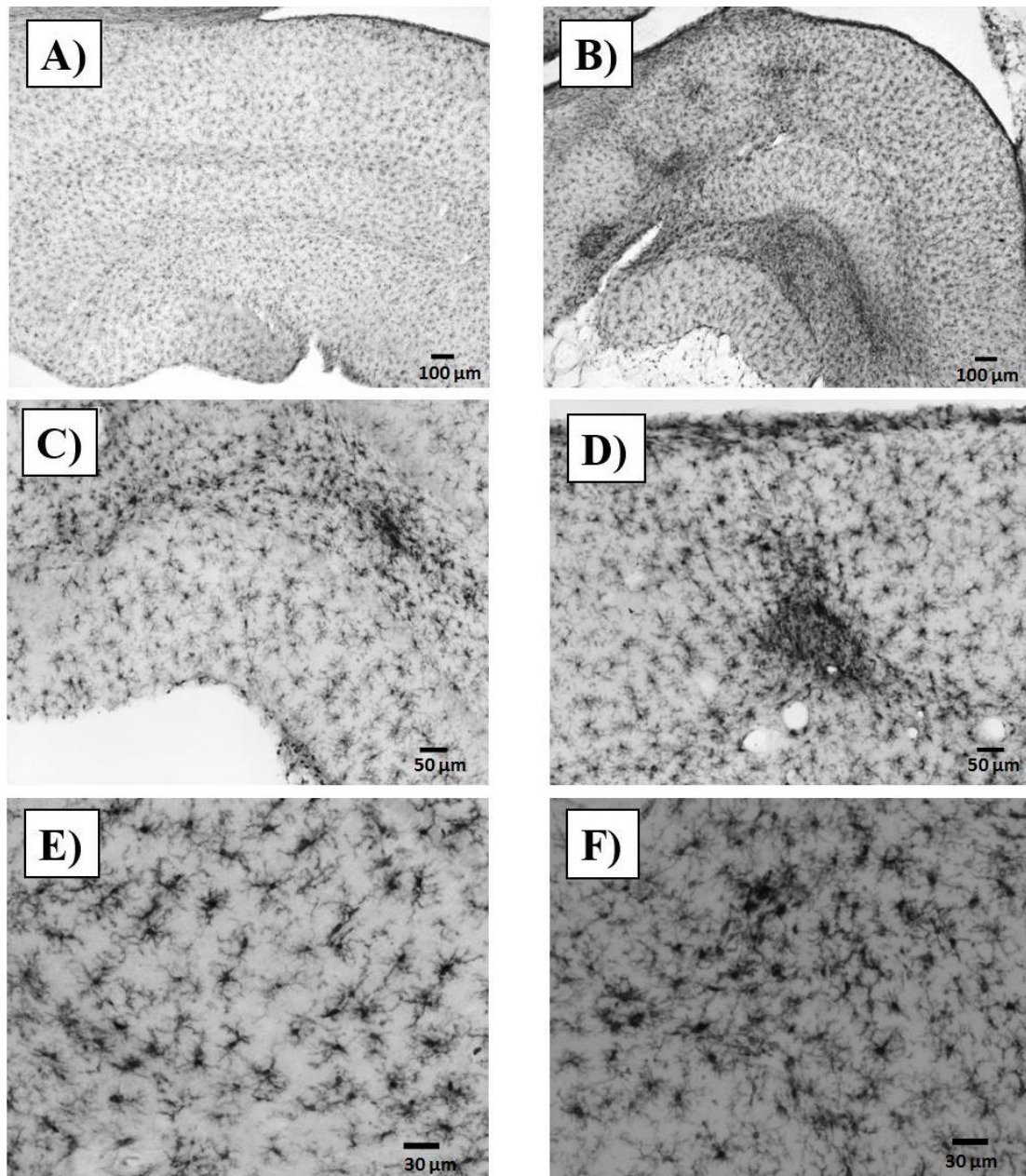


Figura 20: Imatges representatives de la classificació qualitativa. A) Subjecte Sham; B) Subjecte lesió; C) Pre-focus; D) Focus; E) Micròglia amb morfologia ramificada “resting” i F) Micròglia amb morfologia amebiode “activada”.

Criteri de classificació per a l'escala de puntuació		
4x	+/-	Marcatge més intens en hemisferi ipsilateral respecte el contra lateral. Presència d'algunes cèl·lules activades
	+	La zona amb marcatge és més extensa que en +/-
	++	La tinció permet distingir clarament les diferents regions de l'hipocamp

	+++	(CA1, CA2/3 i GD). Les cèl·lules activades no formen agregats Presència de petits focus o pre-focus amb marcatge intens en la formació hipocampal
	++++	Presència d'un focus o múltiples pre-focus
	+++++	Presència de múltiples focus
20x	+/-	Poques cèl·lules activades en un pla
	+	Presència d'ambdós fenotips (cèl·lules activades i "resting") en el mateix pla
	++	Presència de cèl·lules activades fàcilment visibles
	+++	La majoria de cèl·lules estan activades o s'observa la presència d'un pre-focus
	++++	Presència com a mínim d'un focus amb agregats de cèl·lula Iba1 ⁺ difícilment diferenciades individualment o presència de múltiples pre-focus
	+++++	Múltiples focus

Taula 2. Criteri de classificació de la reactivitat de les cèl·lules Iba1⁺ en l'hipocamp dorsal amb magnificacions a 4x i 20x.

Tenint en compte la valoració del conjunt de totes les seccions, la reactivitat microglial de cada subjecte era classificada en grau 0, 1, 2 o 3, d'acord amb el criteri indicat en la Taula 3.

Criteri de classificació per al grau de reactivitat	
Grau 0	Màxim 1 secció amb +
Grau 1	Mínim 2 seccions amb +/- o 1 secció amb +++
Grau 2	Mínim 2 seccions amb +++ o 1 secció amb ++++
Grau 3	Mínim 2 seccions amb ++++ o 1 secció amb ++++

Taula 3. Criteri de classificació per graus de la reactivitat de les cèl·lules Iba1⁺ en l'hipocamp dorsal.

Anàlisi quantitativa

L'anàlisi quantitativa es va realitzar en 3 de les seccions de cada animal. En concret, es van quantificar la tercera, cinquena i setena secció de la sèrie, és a dir, una de cada 20 seccions. La cinquena i setena seccions presentaven cavitat de lesió, i en alguns casos la tercera també, encara que en aquest cas la cavitat era molt petita. Es van digitalitzar a camp clar les seccions amb una càmera digital DXM1200 Nikon acoblada a un microscopi Nikon Eclipse 80i connectat a un ordinador amb el software ACT-1 2.20 (Nikon Corporation).

Per a cada secció es van realitzar una mitjana de 10 fotografies consecutives començant per la línia mitja del cervell i resseguint en meandre tot l'hipocamp dorsal,

a una magnificació de 10x, tant en l'hemisferi ipsilateral com en el contralateral a la lesió. En total es van analitzar un total aproximat de 2500 fotografies. La representació de l'obtenció de les imatges es pot veure a la Figura 21.

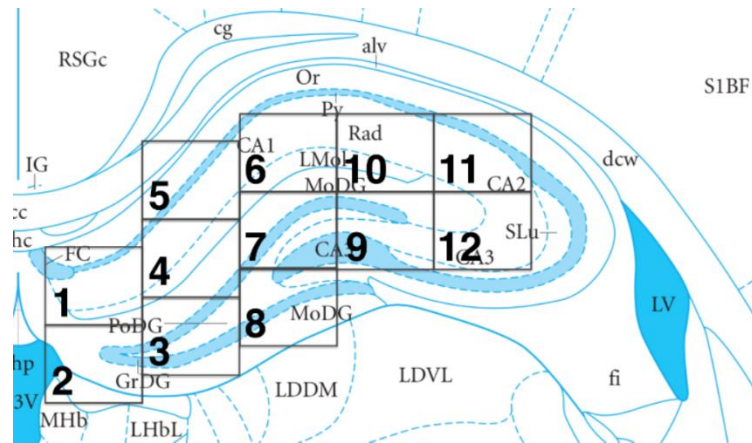


Figura 21: Il·lustració d'una secció coronal del cervell de rata a -3.24 mm de Bregma. Els quadres representen els llocs on es van realitzar fotografies i els números l'ordre en què es van fer. Imatge adaptada del Paxinos (Paxinos & Watson, 2007).

Es va utilitzar el software AnalySIS[®] per a l'anàlisi i quantificació del marcatge de cèl·lules Iba1.

Per a cada fotografia es van mesurar les següents variables: % de l'àrea ocupada pel marcatge en la regió d'interès i la mitjana del valor de gris (Mean Gray Value, MGV). El MGV és un valor d'intensitat i pot està comprès entre 0 i 255. A menor valor de MGV, major intensitat de marcatge. Per tal que la interpretació del MGV fos més intuïtiva, vam realitzar la diferència entre el valor màxim que pot assolir (255) i el MGV obtingut en cada fotografia. D'aquesta manera, com més alt és el valor del MGV, major és la intensitat de marcatge d'Iba1.

4.1.6 Anàlisis estadístiques

Les anàlisis de dades es van realitzar principalment mitjançant el paquet Deducer (Fellows, 2012) del programa R (R Development Core Team, 2011). Per examinar l'existència de diferències entre els grups experimentals es van utilitzar anàlisis de la variància (ANOVA), amb els posteriors contrastos post hoc (mètode Benjamini-Hochberg, BH) per a la comparació de parelles de grups en cas necessari, a excepció

dels resultats d'Iba1 en què es va utilitzar el mètode Bonferroni).

També es van portar a terme proves t de Student per a una mostra per tal de determinar, dintre de cada un dels grups experimentals, si els índexs de discriminació i diverses mesures macroscòpiques del teixit cerebral eren estadísticament diferents a un valor de referència. Les proves t de Student per a mostres independents van ser utilitzades per comparar variables d'exercici físic en els dos grups que tenien accés a les rodes d'activitat durant el mateix període temporal de l'experiment.

Es van realitzar també proves de correlació de Pearson i de regressió lineal per determinar la possible relació entre diferents variables quantitatives.

Pel que fa a les dades qualitatives, es van analitzar mitjançant taules de contingència i valors de Chi quadrat.

Finalment, les variables registrades a les diferents sessions d'habitució i algunes de les variables histològiques es van analitzar mitjançant el paquet estadístic SPSS (IBM), versió 17.0, utilitzant anàlisis multivariants de la variància (MANOVA) per a un factor intrasubjecte (sessió d'entrenament o secció cerebral analitzada) i un factor entresubjecte (grups experimentals). Amb aquest mateix paquet estadístic, i per tal d'examinar l'evolució d'aquestes variables al llarg de les sessions o en funció de la secció cerebral (en cas necessari), així com l'evolució temporal de l'exercici físic, es van realitzar contrastos polinomials.

4.2 Resultats

4.2.1 Estat dels subjectes i evolució del pes

Cap animal va morir com a conseqüència de la lesió traumàtica, ni va haver de ser sacrificat per criteris de punt final. Un subjecte no va sobreviure a la intervenció quirúrgica, degut a problemes amb l'anestèsia. De la resta dels subjectes, 1 va ser eliminat, perquè en les proves histològiques no es va detectar cavitat de lesió i altres 5 van ser eliminats de les anàlisis estadístiques per no complir els criteris d'exploració mínima durant l'adquisició i/o retenció de la MRO. Per tant, la mostra final utilitzada per a les anàlisis dels resultats és de 70 subjectes (Sham: 15, L-sed: 17, L-sed-exe: 13, L-exe-sed: 13 i L-exe-exe: 12).

A l'inici de l'experiment, en el primer dia de handling, l'ANOVA indicà diferències de pes

entre els diferents grups experimentals [$F_{(4,58)}=3.38$; $p=0.015$]. Concretament, la mitjana de pes del grup L-exe-exe era significativament més alta que la dels grups Sham ($p=0.037$), L-sed ($p=0.037$), L-exe-sed ($p=0.014$). Tenint en compte aquestes diferències inicials degudes a l'atzar, les anàlisis del pes en cada una de les fases posteriors de l'experiment es van fer introduint en les ANOVA els valors del pes inicial com a covariable. Aquestes anàlisis indicaren que la covariable era significativa pel que fa al pes el dia de la cirurgia [$F_{(53,1)}=98.01$; $p<0.001$] i en el post-operatori [$F_{(47,1)}=34.73$; $p<0.001$], però en canvi no ho era el factor grup. Això vol dir que el pes en aquestes sessions ve influït pel pes inicial i no per possibles efectes del tractament. En canvi, les anàlisis del pes just a l'inici de l'entrenament en MRO indicaren un efecte significatiu del grup [$F_{(53,4)}=4.99$; $p=0.002$] i una manca de significació de la covariable. Aquestes diferències entre grups eren degudes al fet que el pes del grup L-exe-exe era inferior al dels grups Sham ($p=0.002$), L-sed ($p=0.002$), L-exe-sed ($p=0.004$), mentre que no diferia significativament del grup L-sed-exe.

Així mateix, es va fer una anàlisi de la variància de l'increment de pes experimentat pels animals dels diferents grups entre el primer dia de handling i el primer dia d'entrenament en MRO (Figura 22). Aquestes anàlisis indicaren diferències significatives entre els grups [$F_{(4,66)}=5.11$; $p=0.001$]. Les comparacions post hoc indicaren que l'increment de pes del grup L-exe-exe era significativament inferior al dels altres grups (respecte als grups Sham, L-sed i L-exe-sed: $p<0.001$; respecte al grup L-sed-exe: $p=0.041$). D'altra banda el grup L-sed-exe també mostrava un increment de pes significativament inferior al del grup L-exe-sed ($p=0.041$), així com una tendència a la significació respecte als grups Sham ($p=0.08$) i L-sed ($p=0.06$).

Weight gain across experiment

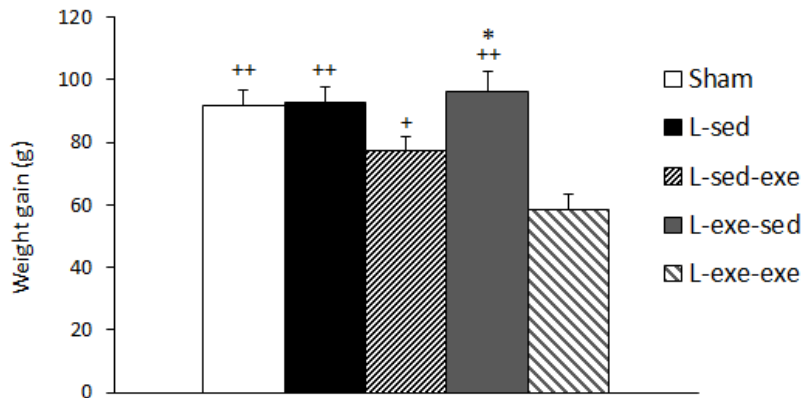


Figura 22: Increment de pes en els diferents grups experimentals al llarg de l'experiment. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. ANOVA: *Diferències respecte al grup L-sed-exe, *($p < 0.05$); +Diferències respecte al grup L-exe-exe +($p < 0.05$), ++($p < 0.01$).

4.2.2 Evolució de l'exercici físic: distància, temps i velocitat

Es va enregistrar diàriament el temps i la distància recorreguda dels subjectes que realitzaven exercici físic (L-sed-exe: 13, L-exe-sed: 13 i L-exe-exe: 12). Per problemes tècnics, en el grup L-exe-sed es van perdre les dades d'un subjecte i també es van perdre les dades del temps en la setmana 2 d'exercici d'un altre subjecte d'aquest grup ($n=11$ o 12 , segons la variable). En la Figura 23 es mostren representats gràficament els valors mitjans, per setmana, dels metres, temps i velocitat diaris.

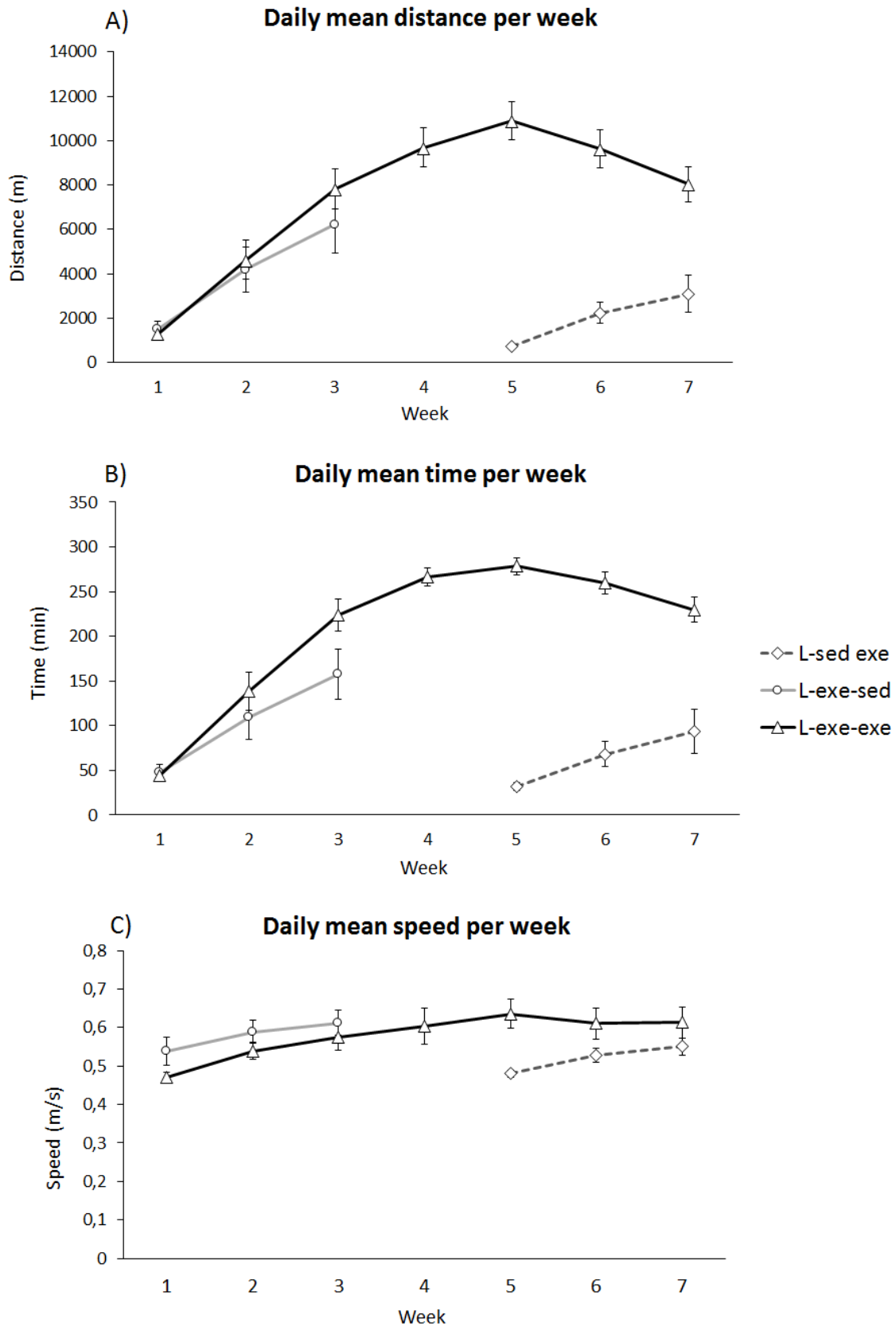


Figura 23: Mitjanes per setmana A) de la distància diària (metres) recorreguda en la roda d'activitat, B) del temps diari (minuts) d'exercici en la roda d'activitat i C) de la velocitat diària (metres per segon) d'exercici en la roda d'activitat.

Donat que el moment en què s'introduïa l'exercici o la durada del mateix eren diferents en funció del grup, les variables d'exercici es van analitzar de diferents maneres. En primer lloc, es van comparar les mitjanes per setmana dels metres diaris recorreguts en les tres primeres setmanes d'exercici (setmana 1, 2 i 3) per a cadascun dels grups, tenint en compte que la setmana 3 era la darrera setmana d'exercici dels grups L-exe-sed i L-sed-exe, però no del grup L-exe-exe, ja que aquest grup corria un total de 7 setmanes. L'ANOVA indicà diferències en la setmana 1 [$F_{(2,34)}=3.28$; $p=0.049$] i en la setmana 3 [$F_{(2,34)}=4.97$; $p=0.013$]. Concretament, les anàlisis post hoc van revelar que el grup L-sed-exe tendia a córrer significativament menys metres que el L-exe-sed durant la primera ($p=0.052$) i la tercera ($p=0.077$) setmana, i corria significativament menys que el L-exe-exe ($p=0.012$) en la tercera setmana d'exercici.

Les mateixes anàlisis respecte a la mitjana diària del temps que les rates passaven fent exercici en la roda, van indicar una tendència a la significació en la setmana 2 d'exercici [$F_{(2,33)}=2.82$; $p=0.074$], i diferències en la setmana 3 [$F_{(2,34)}=6.47$; $p=0.004$]. Les anàlisis post hoc van revelar que el grup L-sed-exe tendia a presentar temps diaris en roda inferiors als del grup L-exe-exe en la setmana 2 ($p=0.072$) i significativament inferiors en la setmana 3 ($p=0.003$).

No es van trobar diferències estadísticament significatives en la mitjana per setmanes de la velocitat diària de les 3 primeres setmanes d'exercici físic entre els tres grups d'exercici, a excepció d'una tendència en la setmana 1 ($p=0.085$).

Per altra banda, donat que el grup L-sed-exe començava l'exercici 4 setmanes més tard que els altres dos grups d'exercici, es van fer les comparacions anteriors sense el grup demorat (L-sed-exe). La prova t de Student per a mostres independents, indicà que la velocitat mitjana a la setmana 1 [$t_{(22)}=1.77$; $p=0.091$] del grup L-exe-sed tendia a ser superior a la del grup L-exe-exe, mentre que el temps mig a la setmana 3 tendia a ser superior en el grup L-exe-exe respecte al grup L-exe-sed [$t_{(22)}=-1.99$; $p=0.06$].

També es va realitzar la prova t de Student per a mostres independents per comparar les mateixes variables (distància, temps i velocitat diària per setmanes) però en aquest cas, durant les últimes 3 setmanes de l'experiment, entre els dos grups que feien exercici en aquesta fase experimental (grup L-sed-exe: setmanes 1, 2 i 3 d'exercici; grup L-exe-exe: setmanes 5, 6 i 7). La prova indicà que durant la primera i segona

setmanes d'exercici del grup L-sed-exe, aquest presentava una distància diària mitjana (setmana 1: $t_{(23)}=-12.24$, $p<0.001$; setmana 2 $t_{(23)}=-7.48$, $p<0.001$), i un temps mig d'exercici diari (setmana 1: $[t_{(23)}=-23.66$, $p<0.001]$; setmana 2: $[t_{(23)}=-9.55$, $p<0.001]$) inferiors que els del grup L-exe-exe. La velocitat mitjana diària del grup L-sed-exe també era significativament inferior a la del grup L-exe-exe durant la setmana 1 $[t_{(23)}=-4.08$; $p<0.001]$, i aquesta diferència tendia a la significació estadística durant la setmana 2 ($p=0.07$). En l'última setmana d'exercici dels dos grups (setmana en que es realitzava l'entrenament en la MRO), la prova t de Student va revelar que tant la distància $[t_{(23)}=-4.00$; $p<0.001]$, com el temps $[t_{(23)}=-4.25$; $p<0.001]$, però no la velocitat, seguien sent inferiors en el grup L-sed-exe respecte el grup L-exe-exe.

Finalment, es va analitzar l'evolució al llarg de les setmanes de la distància correguda en la roda d'activitat en cada grup d'exercici per separat. El contrast polinomial indicà una evolució lineal ascendent, tant en el grup L-exe-sed $[t=3.98$; $p=0.02]$, com en el grup L-sed-exe $[t=3.24$; $p=0.008]$. En canvi, l'evolució del grup L-exe-exe, s'ajustava tant a una funció lineal $[t=6.84$; $p<0.001]$, com quadràtica $[t=-9.38$; $p<0.01]$. Això indica una evolució lineal ascendent fins a la setmana 5, a partir de la qual s'observava una disminució.

4.2.2.1 Relació entre els nivells d'exercici físic i l'increment de pes

Donat que l'exercici físic pot afectar el pes corporal i que el grup L-exe-exe va mostrar un guany de pes inferior al dels altres grups al llarg de l'experiment, es va fer una anàlisi de la correlació de Pearson entre la mitjana per setmana dels metres diaris correguts en la roda d'activitat i l'increment de pes. Com era d'esperar, els animals que corrien més metres presentaven un increment de pes inferior al llarg de les setmanes. Els resultats es mostren en la Taula 4. En canvi, en els altres grups d'exercici no es van trobar correlacions significatives entre aquestes variables.

	Metres setmana4	Metres setmana5	Metres setmana6	Metres setmana7	Metres acumulats
Increment de pes	-0.73 (p=0.012)	-0.8 (p=0.003)	-0.61 (p=0.048)	-0.78 (p=0.005)	-0.66 (p=0.028)

Taula 4: Correlacions entre l'increment de pes des del handling fins al primer dia de MRO i la mitjana per setmana dels metres diaris correguts a la roda. Mostra: L-exe-exe (n=11).

4.2.3 Memòria de Reconeixement d'Objectes

Habituarió

Pel que fa a l'activitat locomotora durant les sessions d'habituarió, la MANOVA indicà que ni el factor grup ni la interacció grup x sessió eren significatius. En canvi, sí que era significatiu el factor sessió [$F_{(2)}=17.63$; $p<0.001$]. El contrast polinomial mostrà que l'evolució de l'activitat locomotora s'ajustava a una funció lineal [$t=-5.20$; $p<0.001$] i quadràtica [$t=3.52$; $p<0.001$], indicant una disminució entre la primera i la segona sessions i una estabilització entre la segona i la tercera (Figura 24).

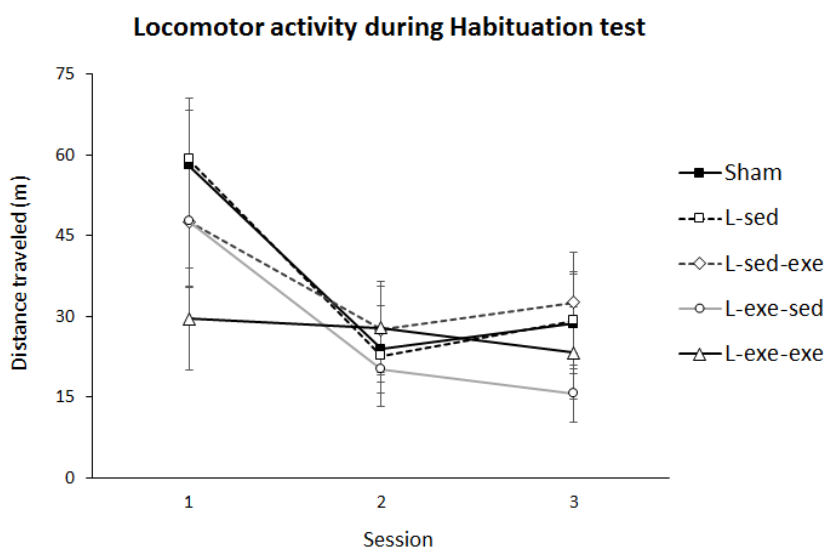


Figura 24: Mitjana \pm SEM de l'activitat locomotora dels 5 grups experimentals en cadascuna de les 3 sessions d'habituarió.

D'altra banda, pel que fa a les defecacions durant les sessions d'habituarió, les anàlisis indicaren que ni el factor grup ni la interacció grup x sessió eren significatius, però sí que era significatiu el factor sessió [$F_{(2)}=6.99$; $p=0.001$]. El contrast polinomial indicà que l'evolució de les defecacions s'ajustava a una funció quadràtica [$t=4.20$; $p<0.001$],

doncs van disminuir entre les sessions 1 i 2, i van tornar a augmentar entre les sessions 2 i 3 (Figura 25).

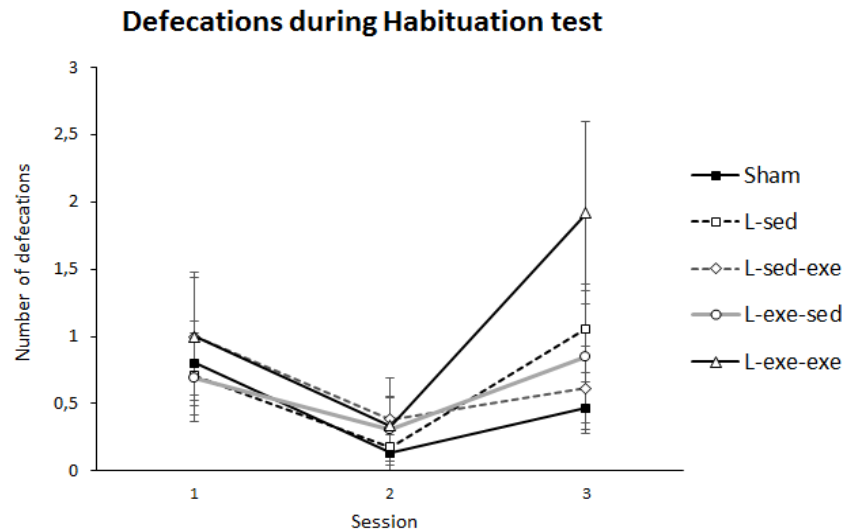


Figura 25: Mitjana \pm SEM de les defecacions dels 5 grups experimentals en cadascuna de les 3 sessions d'habitució.

Neofòbia

Aquesta prova permet estudiar la tendència dels animals a explorar un objecte desconegut en un entorn conegut. En la Figura 26 es pot veure la latència i el temps d'exploració a l'objecte, així com l'activitat locomotora durant el test de neofòbia.

Pel que fa a l'activitat locomotora, les anàlisis estadístiques (ANOVA) van indicar un efecte significatiu [$F_{(4,65)}=2.54$; $p=0.048$]. Les comparacions entre grups només van mostrar una tendència a la significació, en el sentit que el grup L-exe-exe mostrava una menor activitat locomotora que el grup L-sed-exe ($p=0.072$).

Per a les anàlisis estadístiques de la latència d'exploració de l'objecte es va eliminar un animal del grup L-exe-exe que no va explorar en tota la sessió, malgrat mostrar una exploració normal en la resta de sessions de MRO. Aquestes anàlisis indicaren una tendència a la significació [$F_{(4,64)}=2.27$; $p=0.071$], però els contrastos post hoc no van

mostrar diferències entre grups. Tampoc es van trobar diferències entre grups en el temps d'exploració de l'objecte.

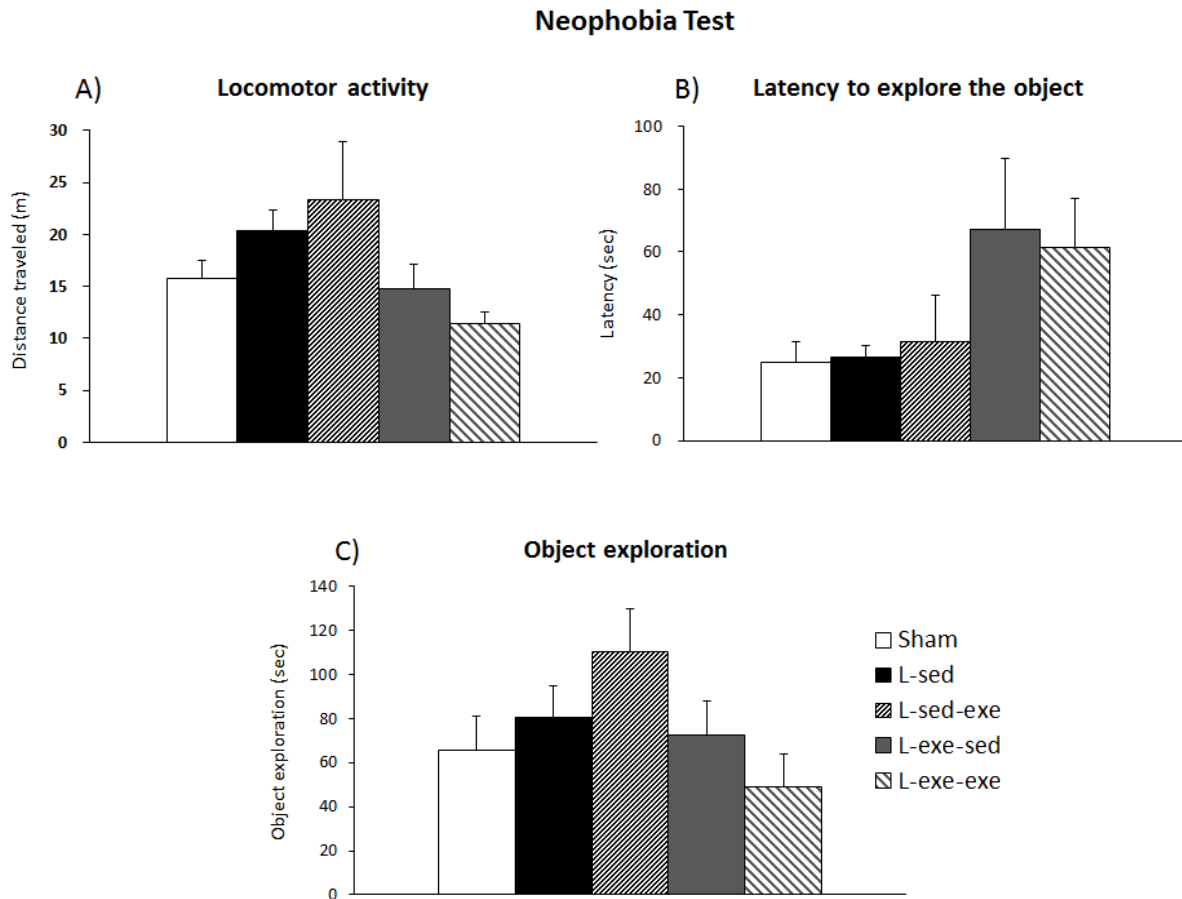


Figura 26: Variables analitzades durant el test de Neofòbia: A) Activitat locomotora; B) Latència d'exploració de l'objecte; C) Temps d'exploració de l'objecte. Cada valor representa la mitjana \pm SEM.

Adquisició

L'ANOVA no indicà diferències entre grups ni en la latència d'exploració dels objectes, ni en el temps total d'exploració dels dos objectes, així com tampoc en l'activitat locomotora durant el test. En la Figura 27 es pot veure el temps d'exploració total dels objectes per a cada grup experimental.

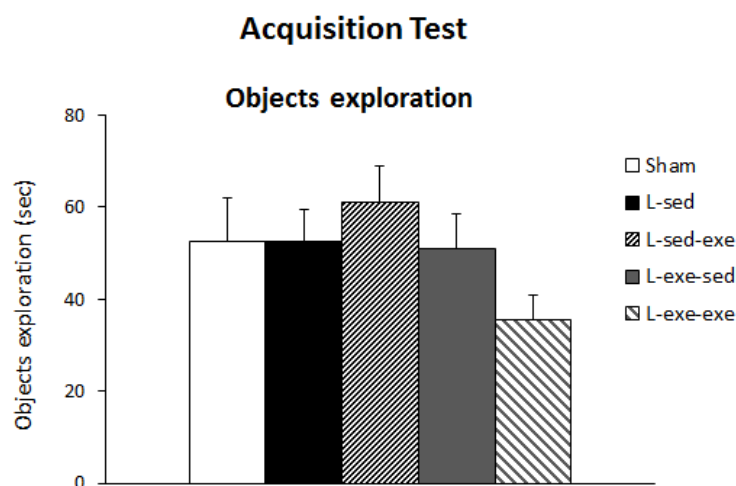


Figura 27: Temps total d'exploració dels objectes durant el test d'adquisició. Cada valor representa la mitjana \pm SEM.

Retenció 1 (3 hores)

La prova t de Student per a una mostra indicà que l'índex de discriminació era significativament superior a 0 en els grups Sham [$t_{(14)}=2.72$; $p=0.017$], L-sed-exe [$t_{(12)}=3.22$; $p=0.007$], L-exe-sed [$t_{(12)}=3.06$; $p<0.01$] i L-exe-exe [$t_{(11)}=2.40$; $p=0.04$]. En canvi, en el grup L-sed només es va observar una tendència a la significació [$t_{(16)}=2.01$; $p=0.062$]. Per tant, el grup sense lesió i els tres grups tractats amb exercici físic recordaven l'objecte familiar, mentre que el grup amb lesió i sense tractament no discriminava entre els dos objectes. Els resultats es mostren en la Figura 28.

Els resultats obtinguts en l'ANOVA no van indicar diferències significatives entre els diferents grups, ni el temps total d'exploració dels objectes, ni en l'índex de discriminació.

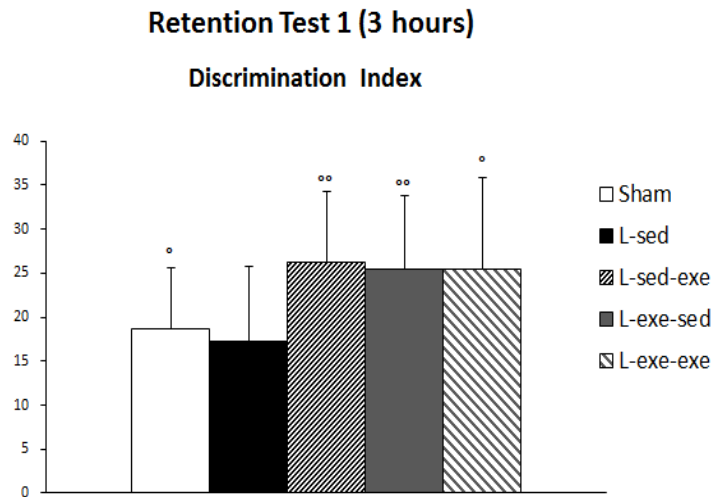


Figura 28: Índex de discriminació en el test de retenció 1. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. °Diferències respecte 0 en la prova t de Student per una mostra: °($p < 0.05$), °°($p < 0.01$).

Retenció 2 (24 hores)

Degut a problemes tècnics durant l'enregistrament de la retenció 2 es van perdre les dades d'un subjecte del grup L-sed. Per tant, la mostra final estava formada per un total de 69 subjectes (Sham: 15, L-sed: 16, L-sed-exe: 13, L-exe-sed: 13 i L-exe-exe: 12).

La prova t de Student per a una mostra indicà que l'índex de discriminació era superior a 0 en els grups Sham [$t_{(14)}=5.16$; $p < 0.001$], L-sed-exe [$t_{(12)}=6.44$; $p < 0.001$], L-exe-sed [$t_{(12)}=4.94$; $p < 0.001$] i L-exe-exe [$t_{(11)}=3.61$; $p=0.004$]. En canvi, l'índex de discriminació no diferia significativament de 0 en el grup L-sed [$t_{(15)}=1.55$; $p=0.142$]. Per tant, tant el grup Sham com els tres d'exercici recordaven l'objecte familiar, mentre que el grup L-sed no discriminava entre els dos objectes. Els resultats relatius a l'índex de Discriminació es poden veure en la Figura 29.

L'ANOVA indicà diferències significatives entre grups en l'índex de discriminació [$F_{(4,64)}=3.46$; $p=0.012$]. Les anàlisis post hoc van revelar que el grup L-sed tenia un índex de discriminació estadísticament inferior als grups Sham ($p=0.03$), L-sed-exe ($p=0.017$) i L-exe-sed ($p=0.048$). Per tant, els resultats posen de manifest l'efecte de la lesió i la reversió d'aquest dèficit mitjançant dues pautes de tractament amb exercici físic. No es van trobar diferències significatives entre els grups en el temps total d'exploració dels objectes.

Retention Test 2 (24 hours)

Discrimination Index

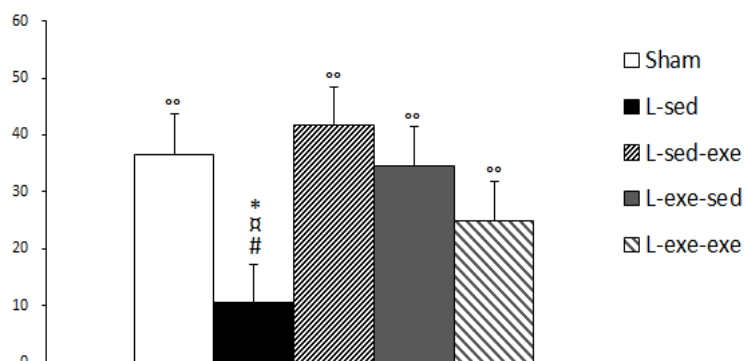


Figura 29: Índex de discriminació en el test de Retenció 2. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. °Diferències respecte 0 en la prova t de student per una mostra: °°(p<0.01). ANOVA: #Diferències respecte Sham #(p<0.05); *Diferències respecte L-sed-exe *(p<0.05); ¤Diferències respecte L-exe-sed ¤(p<0.05).

4.2.3.1 Relació entre les diferents sessions de la MRO

Per tal d'estudiar si hi havia correlació entre diferents test de la MRO es van realitzar correlacions de Pearson amb la mostra global de subjectes i per cada grup experimental per separat. No es va trobar cap correlació significativa entre l'exploració dels objectes durant les diferents sessions de la MRO (neofòbia, adquisició, retenció 1 i retenció 2) i els índexs de discriminació 1 i 2. Tampoc es va trobar cap correlació significativa entre els índexs de discriminació 1 i 2.

4.2.3.2 Relació entre l'increment de pes i la MRO

Tenint en compte les diferències de pes entre els grups, es va analitzar la relació entre l'increment de pes i variables d'exploració i aprenentatge, tant en la mostra global, com en cada grup per separat. Per a la mostra global es van trobar correlacions positives entre l'increment de pes i l'exploració en el test de neofòbia ($r=0.33$; $p=0.009$) i entre l'increment de pes i l'exploració durant el test de retenció a les 3 h ($r=0.31$; $p=0.013$). Pel que fa cada grup per separat, només es van trobar

correlacions significatives i positives en els grups L-sed i L-exe-exe. Els resultats es mostren en les Taules 5 i 6.

	Exploració Neofòbia	Exploració Adquisició	Índex de discriminació 1
Increment de pes	0.54 (p=0.031)	0.55 (p=0.028)	0.60 (p=0.015)

Taula 5: Correlacions entre l'increment de pes des del handling fins al primer dia de MRO i variables de la MRO. Mostra: L-sed (n=16).

	Exploració Neofòbia	Índex de discriminació 1	Exploració test de retenció 2
Increment de pes	0.62 (p=0.044)	0.62 (p=0.043)	0.71 (p=0.015)

Taula 6: Correlacions entre l'increment de pes des del handling fins al primer dia de MRO i variables de la MRO. Mostra: L-exe-exe (n=11).

4.2.3.3 Relació entre el nivell d'exercici i la MRO

Estudi correlacional

La relació entre el nivell d'exercici i la MRO es va analitzar en primer lloc mitjançant correlacions de Pearson.

No es va trobar cap correlació significativa entre les variables d'exercici (distància i temps) i l'execució dels animals en la MRO per a la mostra de tots els grups experimentals, així com tampoc separatament per al grup L-exe-sed. Ara bé, en el grup L-exe-exe es van trobar correlacions negatives entre el temps en roda durant les tres últimes setmanes de l'experiment i l'índex de discriminació en el test a les 3 h ($r=-0.76$; $p=0.004$), així com amb l'exploració total dels objectes durant aquesta sessió ($r=-0.60$; $p=0.039$). En canvi, en el grup L-sed-exe es va trobar una correlació positiva entre el temps durant les tres setmanes d'exercici i l'índex de discriminació 2 ($r=0.56$; $p=0.049$).

Anàlisi de la MRO en funció del nivell d'exercici

Per altra banda, la possible influència, sobre la MRO, del temps corregut es va estudiar distribuint els subjectes dels grups d'exercici en 3 categories (nivell baix, nivell mig i nivell alt), en funció del temps acumulat que corrien en la roda d'activitat al llarg de tot el període d'exercici. Per sota del primer quartil es considerava "nivell baix" en la roda d'activitat ($Q1=881.4$), els subjectes que es trobaven entre el primer quartil i per sota del tercer es van classificar a "nivell mig" i a partir del tercer quartil "nivell alt" ($Q3=8760.6$). En la Taula 7 es mostren les mitjanes i les desviacions estàndars per al temps acumulat en la roda d'activitat durant totes les setmanes d'exercici de cada grup d'exercici.

	L-sed-exe	L-exe-sed	L-exe-exe
Temps Acumulat	1352.8 (1057.9)	2132.6 (1378.6)	9959.4 (1377.44)

Taula 7: Mitjana (en negreta) i desviació estàndard (entre parèntesi) del temps acumulat en la roda d'activitat per a cada grup d'exercici.

En la Taula 8 es mostra la distribució dels subjectes dels diferents grups d'exercici, en funció de les 3 categories de temps acumulat en la roda d'activitat. Com es pot veure cap subjecte dels grups que feien exercici només durant 3 setmanes es classificava en "nivell alt".

	L-sed-exe	L-exe-sed	L-exe-exe	n
Nivell baix	7	2	0	9
Nivell mig	6	9	3	18
Nivell alt	0	0	9	9
n	13	11	12	36

Taula 8: Distribució dels subjectes dels grups amb exercici, en funció de les 3 categories de temps acumulat en la roda d'activitat.

L'ANOVA indicà una tendència a la significació ($p=0.055$) en l'índex de discriminació en la retenció 2. Aquesta tendència es deu al fet que la mitjana de l'índex de discriminació de la retenció 2 és més alta en els animals de la categoria "nivell mig" que en els de les altres dues. Les anàlisis post hoc indicaren que l'índex de discriminació 2 dels subjectes de "nivell mig" tendia a ser estadísticament superior al del subjectes de "nivell alt"

($p=0.066$), tal com es pot observar en la Figura 30. No es van trobar diferències entre les tres categories ni en l'índex de discriminació 1, ni en el temps total d'exploració dels objectes en cap dels tests de retenció.

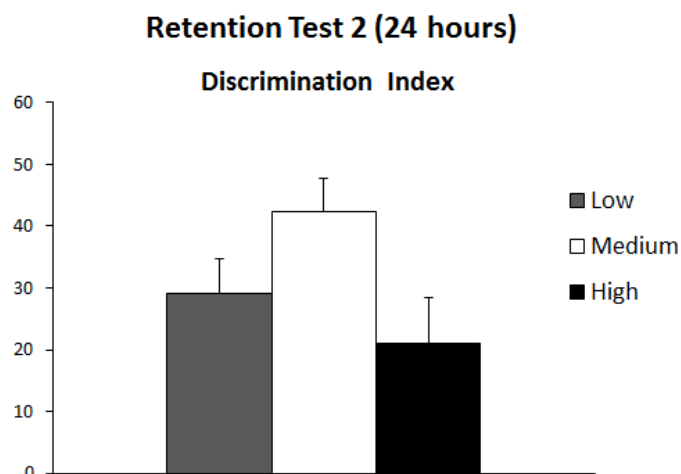


Figura 30: Índex de discriminació en el test de Retenció 2. Cada valor representa la mitjana \pm SEM.

4.2.4 Avaluació macroscòpica de la lesió

La mostra utilitzada per fer les valoracions macroscòpiques estava formada per 56 subjectes (Sham: 14, L-sed: 11, L-sed-exe: 11, L-exe-sed: 10 i L-exe-exe: 10).

Pel que fa a les variables relacionades amb les característiques macroscòpiques de la lesió, l'ANOVA no indicà diferències entre els grups amb TBI, ni en la coordenada d'inici de la cavitat de la lesió, ni en la profunditat màxima de la cavitat. En la Taula 9 es presenten els descriptius per a aquestes variables.

	L-sed	L-sed-exe	L-exe-sed	L-exe-exe	Tots els grups lesió
Coordenada inici cavitat lesió (respecte Bregma)	-2.73 (0.64)	-3.04 (0.84)	-2.78 (0.80)	-2.58 (0.70)	-2.79 (0.74)
Profunditat màxima cavitat (mm)	1.13 (0.51)	1.1 (0.40)	0.94 (0.24)	0.89 (0.45)	1.02 (0.41)

Taula 9: Mitjana (en negreta) i desviació estàndard (entre parèntesi) de les variables relatives a la lesió en cada grup de lesió i en el global dels grups lesió.

Les proves t de Student per a una mostra indicaren que la ratio interhemisfèrica de l'hipocamp dorsal era significativament inferior al valor de referència (100) en tots els grups de lesió: L-sed [$t_{(10)}=-4.07$; $p=0.002$], L-sed-exe [$t_{(10)}=-2.46$; $p=0.034$], L-exe-sed [$t_{(9)}=-2.69$; $p=0.025$] i L-exe-exe [$t_{(9)}=-3.42$; $p=0.008$], mentre que no diferien d'aquest valor en el grup Sham. L'ANOVA indicà l'existència de diferències entre grups [$F_{(4, 51)}=3.28$; $p=0.018$]. Les comparacions post hoc van mostrar que els grups L-sed ($p=0.033$) i L-exe-exe ($p=0.025$) presentaven una ratio d'hipocamp inferior respecte el grup Sham. En canvi, la ratio interhemisfèrica dels grups L-sed-exe i L-exe-sed no diferia significativament del grup Sham. Aquests resultats es poden veure en la Figura 31.

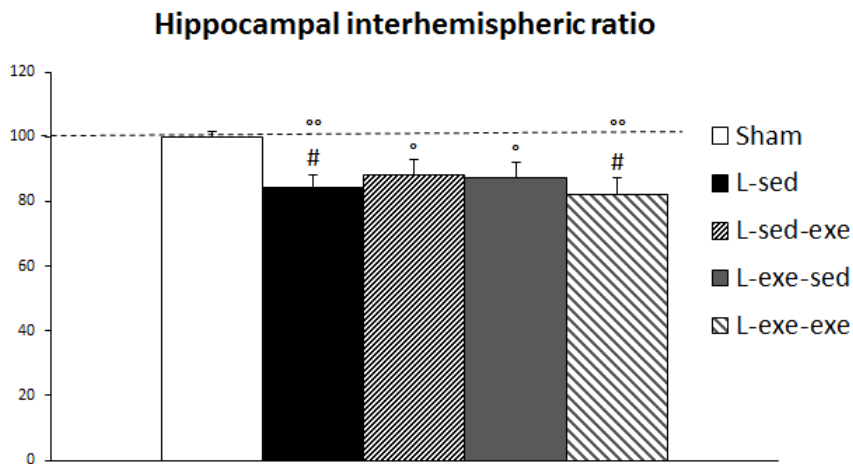


Figura 31: Ratio interhemisfèrica de la formació hipocampal. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. °Diferències respecte 100 en la prova t de Student per a una mostra: °($p<0.05$), °°($p<0.01$); ANOVA: #Diferències respecte Sham #($p<0.05$).

4.2.4.1 Relació entre les mesures macroscòpiques i altres variables

No es va trobar cap correlació significativa entre les mesures macroscòpiques (profunditat màxima de la cavitat, ratio interhemisfèrica hipocampal) i les variables relatives a l'exercici i a la MRO.

4.2.5 Neurogènesi en el gir dentat

Degut a problemes en el teixit, no es van poder quantificar 5 animals, i donat que ja s'havien exclòs 6 subjectes prèviament, les anàlisis es van dur a terme en 60 animals en l'hemisferi esquerre (Sham: 12, L-sed: 14, L-sed-exe: 12, L-exe-sed: 10 i L-exe-exe: 12) i 59 animals en l'hemisferi dret i en el total dels dos hemisferis (Sham: 12, L-sed: 14, L-sed-exe: 11, L-exe-sed: 10 i L-exe-exe: 12).

Les Figures 32 i 33 mostren imatges representatives dels diferents grups experimentals en l'hemisferi ipsilateral i en el contralateral a la lesió.

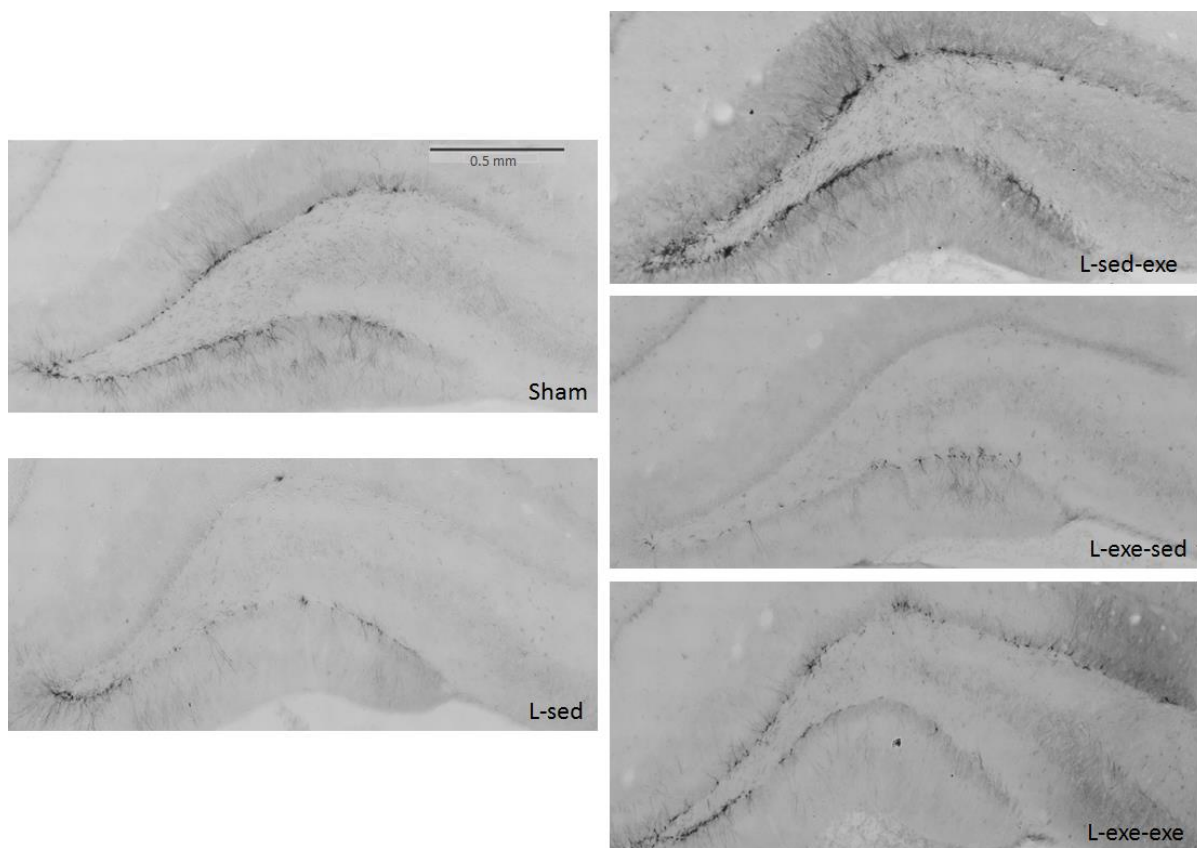


Figura 32. | Imatges representatives de mosaics de gir dentat de l'hemisferi ipsilateral a la lesió realitzats a partir de microfotografies de seccions processades per a immunohistoquímica de DCX+ de cada grup experimental.

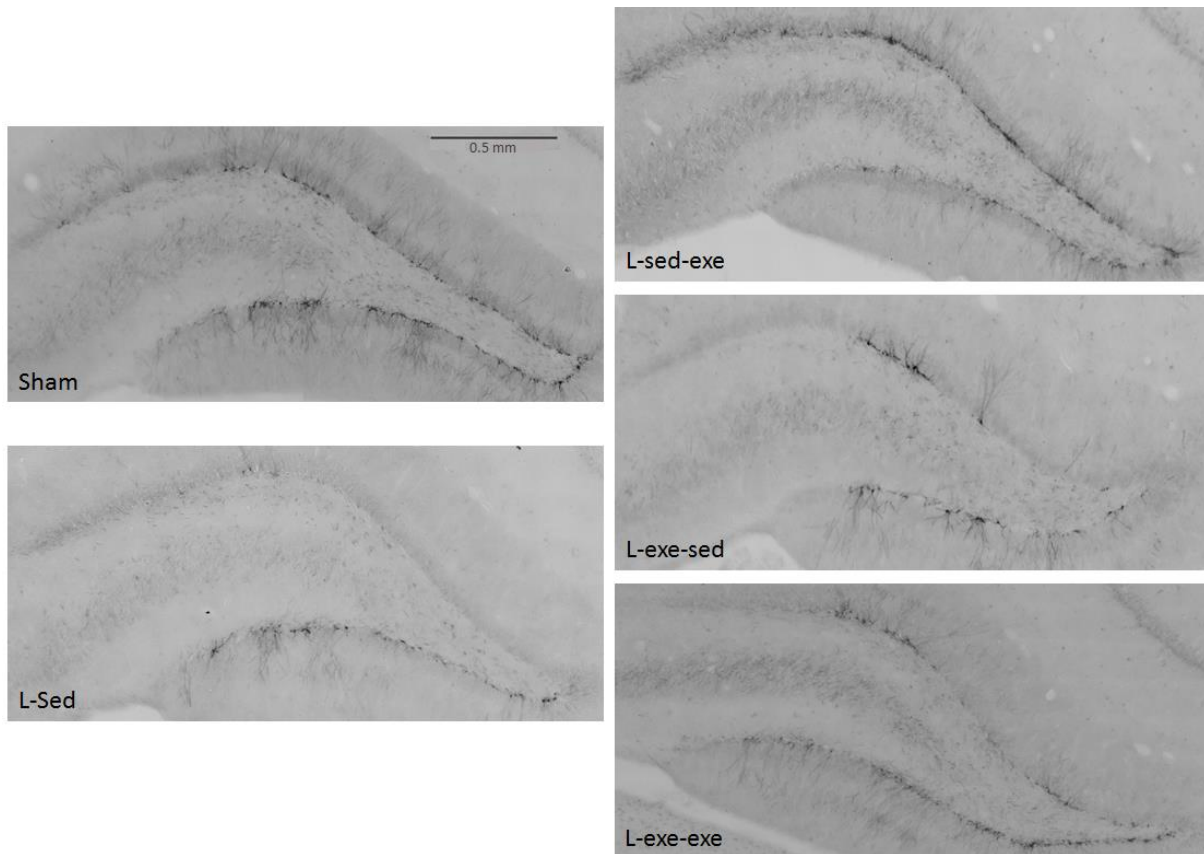


Figura 33: Imatges representatives de mosaics de gir dentat de l'hemisferi contralateral a la lesió realitzats a partir de microfotografies de seccions processades per a immunohistoquímica de DCX+ de cada grup experimental.

4.2.5.1 Quantificació del número de cèl·lules DCX+

En la Figura 34 es mostra gràficament el número mig de cèl·lules DCX+ estimades per secció en el gir dentat en els hemisferi ipsilateral i contralateral. L'ANOVA indicà diferències entre grups en el número estimat de cèl·lules DCX+ per secció tant en l'hemisferi ipsilateral a la lesió [$F_{(4,54)} = 4.56$; $p=0.003$], com en el contralateral [$F_{(4,55)} = 7.21$; $p<0.001$]. Les comparacions post hoc indicaren que en l'hemisferi ipsilateral el número estimat de cèl·lules DCX+ per secció era significativament major en els grups L-sed-exe i Sham en comparació als grups L-sed ($p=0.018$ i $p=0.012$, respectivament) i L-exe-sed ($p=0.035$ i $p=0.018$, respectivament). També indicaren que en l'hemisferi contralateral els grups L-sed-exe i L-exe-exe presentaven un número de cèl·lules DCX+ per secció significativament major que els grups L-sed ($p=0.002$ i $p=0.009$, respectivament), L-exe-sed ($p=0.002$ i $p=0.005$, respectivament) i Sham ($p=0.003$ i $p=0.014$, respectivament).

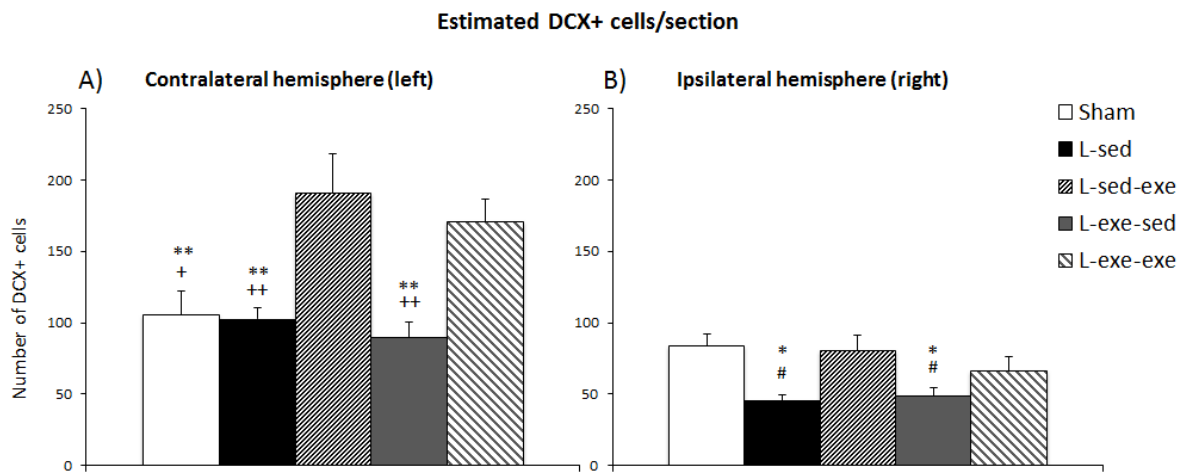


Figura 34: Cèl·lules estimades DCX+ per secció en el gir dentat, per a cada grup experimental. A) hemisferi contralateral a la lesió; B) hemisferi ipsilateral a la lesió. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. ANOVA: #Diferències respecte Sham #($p<0.05$); *Diferències respecte L-sed-exe *($p<0.05$), **($p<0.01$); +Diferències respecte L-exe-exe +(p<0.05), ++(p<0.01).

L'ANOVA també indicà diferències entre els grups en el nombre de cèl·lules estimades per secció en el total dels dos hemisferis [$F_{(4,54)} = 5.99$; $p<0.001$]. El total de cèl·lules estimades per secció era significativament major en el grup L-sed-exe respecte als grups Sham ($p=0.026$), L-sed ($p=0.001$) i L-exe-sed ($p=0.001$). I també era significativament major en el grup L-exe-exe respecte els grups L-sed ($p=0.021$) i L-exe-sed ($p=0.021$). Els resultats es mostren en la Figura 35.

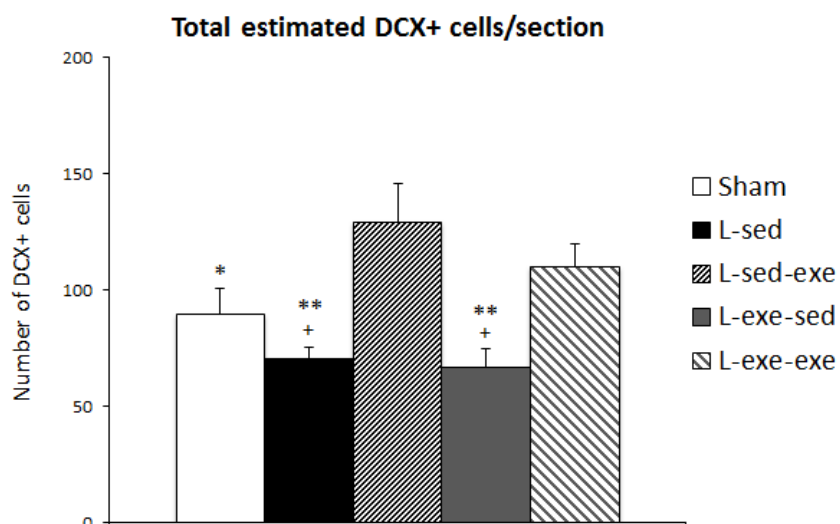


Figura 35: Cèl·lules estimades DCX+ per secció en el gir dentat dels dos hemisferis. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. ANOVA: *Diferències respecte L-sed-exe *($p<0.05$), **($p<0.01$); +Diferències respecte L-exe-exe +(p<0.05), ++(p<0.01).

En la Figura 36 es mostren els resultats corresponents a la densitat de cèl·lules DCX+. L'anàlisi estadística va mostrar resultats semblants pel que fa a la densitat de cèl·lules DCX+ per mm². L'ANOVA indicà diferències tant en l'hemisferi ipsilateral a la lesió [F_(4,54)= 5.95; p<0.001], com en el contralateral [F_(4,55)= 6.25; p<0.001]. Les comparacions post hoc van indicar que el grup L-sed-exe tenia una densitat de cèl·lules DCX+ significativament superior respecte als grups L-sed (ipsilateral: p=0.003; contralateral p=0.002), L-exe-sed (ipsilateral: p=0.005; contralateral: p=0.002), i també respecte al Sham en l'hemisferi contralateral (p=0.005). Per la seva banda el grup L-exe-exe presentava una densitat significativament superior de cèl·lules DCX+ que el grup L-sed en els dos hemisferis (ipsilateral: p=0.035; contralateral: p=0.016) i que els grups L-exe-sed i Sham en l'hemisferi contralateral (p=0.016 i p=0.045, respectivament). A més, en el grup L-exe-exe la densitat de cèl·lules DCX+ en l'hemisferi ipsilateral tendia a ser significativament superior que en el grup L-exe-sed (p=0.052). Finalment, l'ANOVA indicà que el grup Sham presentava una major densitat de cèl·lules DCX+ en l'hemisferi ipsilateral que els grups L-sed (p=0.008) i L-exe-sed (p=0.014).

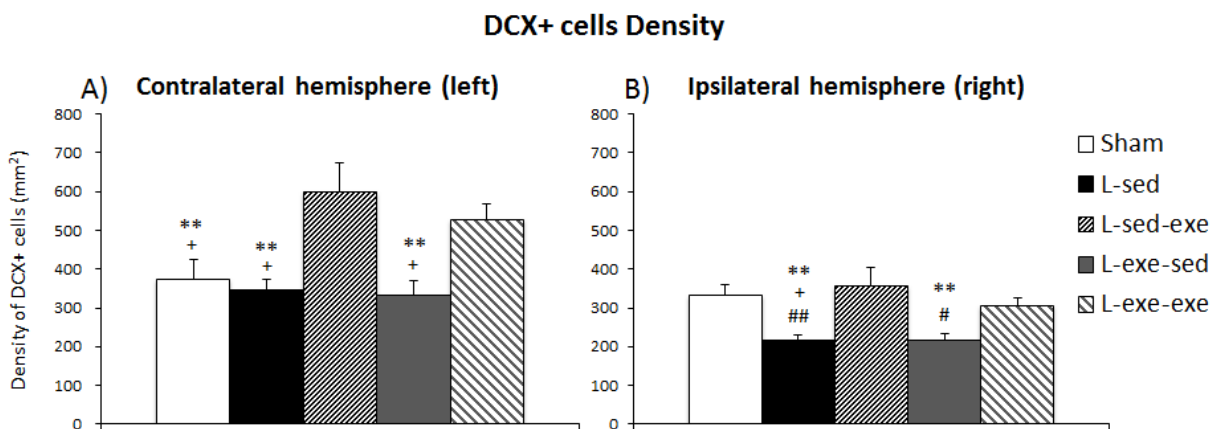


Figura 36: Densitat de cèl·lules DCX+ per mm² en el gir dentat per a cada grup experimental A) hemisferi contralateral a la lesió; B) hemisferi ipsilateral a la lesió. Cada valor representa la mitjana ±SEM. ANOVA: #Diferències respecte Sham #(p<0.05), ##(p<0.01); *Diferències respecte L-sed-exe *(p<0.05), **(p<0.01); +Diferències respecte L-exe-exe +(p<0.05), ++(p<0.01).

Pel que fa la densitat considerant conjuntament els dos hemisferis, l'ANOVA també indicà diferències entre grups [F_(4,54)= 8.02; p<0.001]. Les anàlisis post hoc obtingudes indicaven que la densitat total de cèl·lules DCX+ era significativament superior en el

grup L-sed-exe respecte als grups Sham ($p=0.005$), L-sed ($p<0.001$) i L-exe-sed ($p<0.001$). També el grup L-exe-exe presentava una densitat total significativament superior de cèl·lules DCX+ en comparació als grups L-sed ($p=0.005$) i L-exe-sed ($p=0.005$). Els resultats es mostren en la Figura 37.

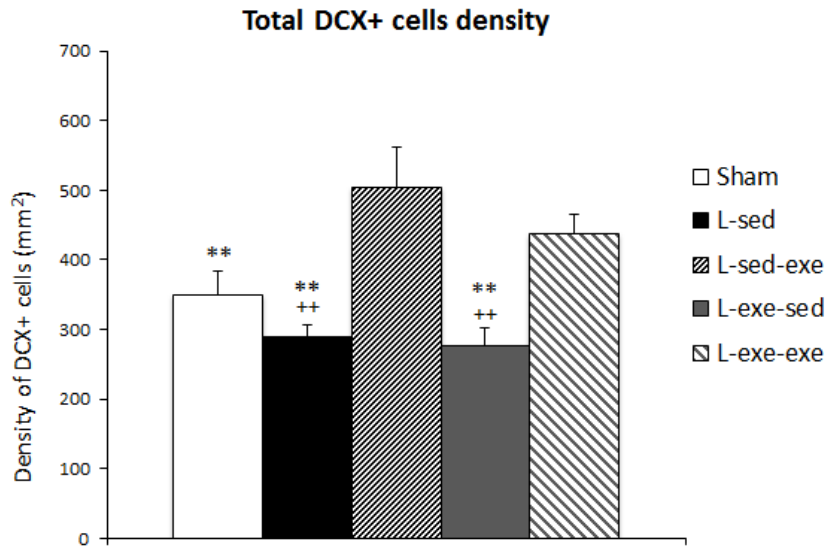


Figura 37: Densitat de cèl·lules DCX+ en mm^2 en el gir dentat de l'hipocamp dels dos hemisferis cerebrals. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. ANOVA: *Diferències respecte L-sed-exe **($p<0.01$); +Diferències respecte L-exe-exe +(p<0.05), ++(p<0.01).

En resum, en l'hemisferi contralateral els grups que realitzaven exercici físic durant les últimes setmanes de l'experiment (L-sed-exe i L-exe-exe), presentaven un major número i densitat de cèl·lules DCX+ que els grups sense accés a roda d'activitat durant aquest període (Sham, L-sed i L-exe-sed). En l'hemisferi ipsilateral, els grups Sham i L-sed-exe presentaven un nivell de neurogènesi superior (tant de cèl·lules estimades com de densitat) que els grups amb lesió i condició sedentària en les darreres setmanes de l'experiment (L-sed i L-exe-sed), mentre que el grup L-exe-exe tenia més densitat, però no un major número de cèl·lules, que el grup L-sed. Pel que fa al conjunt dels dos hemisferis, els grups amb exercici en les darreres setmanes de l'experiment (L-sed-exe i L-exe-exe) presentaven major neurogènesi, per a les dues variables analitzades, que els grups lesió assignats a condició sedentària durant aquest període (L-sed i L-exe-sed). Addicionalment, el grup L-sed-exe també presentava més neurogènesi, tant en densitat com en cèl·lules estimades, que el grup Sham.

4.2.5.2 Relació entre la neurogènesi i la MRO

Per analitzar si existia relació entre els nivells de neurogènesi i la memòria, vam utilitzar també la prova de correlació de Pearson. En la Taula 10 es presenten els resultats amb significació estadística. En aquestes anàlisis s'han inclòs només els grups que realitzaven exercici al final de l'experiment (n=23), ja que hem vist que un cop es retira l'exercici, el seu efecte sobre la neurogènesi es perd. Com es pot veure, com més neurogènesi presentaven (cèl·lules DCX+ estimades per secció i densitat cèl·lules DCX+), major era l'índex de discriminació a les 24 h. No es va trobar correlació entre la neurogènesi i l'índex de discriminació a les 3 h.

	Índex de discriminació 2
Número de cèl·lules DCX+/secció en hemisferi ipsilateral	0.52 (p=0.011)
Número de cèl·lules DCX+/secció en els dos hemisferis	0.47 (p=0.024)
Densitat de cèl·lules DCX+ en hemisferi ipsilateral	0.68 (p<0.001)
Densitat de cèl·lules DCX+ en els dos hemisferis	0.44 (p=0.03)

Taula 10: Correlacions de Pearson entre diferents mesures de neurogènesi i la retenció a les 24 h en la tasca de MRO. Mostra: L-sed-exe i L-exe-exe (n=23).

Aquestes mateixes anàlisis es van realitzar separatament per a cadascun d'aquests dos grups. En el grup L-sed-exe es van trobar correlacions positives significatives entre diferents variables de neurogènesi i l'índex de discriminació 2, tal com es pot veure en la Taula 11. En canvi, no es va trobar cap correlació significativa entre aquestes variables en el grup L-exe-exe.

	Índex de discriminació 2
Número de cèl·lules DCX+/secció en hemisferi ipsilateral	0.80 (p=0.003)
Número de cèl·lules DCX+/secció en els dos hemisferis	0.64 (p=0.034)
Densitat de cèl·lules DCX+ en hemisferi ipsilateral	0.88 (p<0.001)
Densitat de cèl·lules DCX+ en els dos hemisferis	0.63 (p=0.039)

Taula 11: Correlacions de Pearson entre diferents mesures de neurogènesi i la retenció a les 24 h en la tasca de MRO. Mostra: L-sed-exe (n=11).

4.2.5.3 Relació entre el nivell d'exercici i la neurogènesi

Estudi correlacional

Per tal d'estudiar si existia relació entre el nivell d'exercici i el número de neurones noves immadures, es van fer proves de correlacions de Pearson entre diferents variables d'exercici (distància, temps i velocitat) i les variables de neurogènesi separatament per a cadascun dels dos grups que realitzaven exercici al final de l'experiment (L-sed-exe i L-exe-exe). Tal com es veu a la Taula 12 en el grup L-sed-exe es van trobar correlacions positives entre algunes variables d'exercici i de neurogènesi. En canvi, en el grup L-exe-exe no es van trobar correlacions significatives entre aquests grups de variables, però sí que es va veure una tendència a que les correlacions fossin negatives entre el temps en la roda durant les 2 últimes setmanes i la densitat de cèl·lules DCX+ en l'hemisferi contralateral ($r=-0.51$; $p=0.089$), contràriament a les obtingudes en el grup L-sed-exe.

	Metres correguts		Temps corregut	
	Últimes 2 setmanes	Acumulats	Últimes 2 setmanes	Acumulat
Densitat DCX+ Hemisferi contralateral	0.78 ($p=0.003$)	0.78 ($p=0.003$)	0.77 ($p=0.004$)	0.78 ($p=0.003$)
Densitat DCX+ Hemisferi ipsilateral	0.66 ($p=0.027$)	0.67 ($p=0.025$)	0.74 ($p=0.009$)	0.74 ($p=0.009$)
Densitat DCX+ conjunt 2 hemisferis	0.84 ($p=0.001$)	0.85 ($p=0.001$)	0.85 ($p=0.001$)	0.86 ($p<0.001$)
DCX+/secció Hemisferi Esquerre	0.81 ($p=0.001$)	0.81 ($p=0.001$)	0.79 ($p=0.002$)	0.80 ($p=0.002$)
DCX+/secció Hemisferi Dret	0.69 ($p=0.019$)	0.69 ($p=0.018$)	0.79 ($p=0.004$)	0.78 ($p=0.005$)
DCX+/secció conjunt 2 hemisferis	0.86 ($p<0.001$)	0.86 ($p<0.001$)	0.88 ($p<0.001$)	0.89 ($p<0.001$)

Taula 12: Correlacions de Pearson entre exercici i neurogènesi. Mostra: L-sed-exe ($n=12$ i $n=11$ dependent de la variable).

En la Figura 38 es representen gràficament els diagrames de dispersió corresponents a aquestes correlacions.

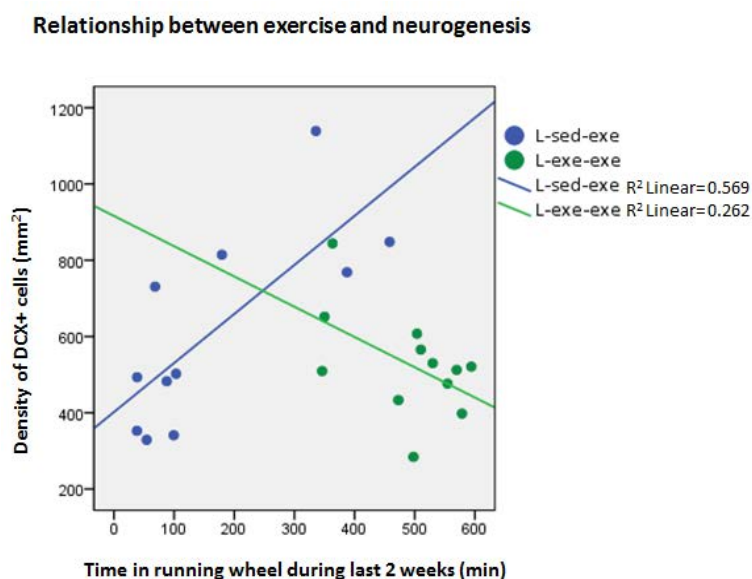


Figura 38: Diagrama de dispersió de la densitat de cèl·lules DCX+ en l'hemisferi contralateral i el temps en la roda durant les dues últimes setmanes d'exercici (i d'experiment) en els grups L-sed-exe i L-exe-exe.

Anàlisi de la neurogènesi en funció del nivell d'exercici

Donat que la DCX marca les neurones nascudes durant les 2 o 3 setmanes prèvies al sacrifici, vam considerar només els subjectes dels grups L-sed-exe i L-exe-exe, i els vam distribuir en les categories “nivell alt”, “nivell mig” i “nivell baix”, en funció de la mitjana diària de temps en la roda d'activitat durant les dues últimes setmanes d'exercici, mantenint el mateix criteri de quartils seguit en l'apartat 4.2.3.3 (Q1=49.7 i Q3=251.9). En la Taula 13 es mostren els descriptius del temps en la roda d'activitat durant les 2 últimes setmanes d'exercici dels grups que realitzaven exercici al final de l'experiment.

	L-sed-exe	L-exe-exe
Temps en la roda d'activitat durant les 2 últimes setmanes d'experiment	85.3 (73.5)	244.6 (44.7)

Taula 13: Mitjana (en negreta) i desviació estàndard (entre parèntesi) del temps mig en la roda d'activitat durant les dues últimes setmanes d'experiment

En la Taula 14 es mostra la distribució de cada grup experimental en funció de les 3 categories establertes.

	L-sed-exe	L-exe-exe	n
Nivell baix	8	0	8
Nivell Mig	5	4	9
Nivell Alt	0	8	8
n	13	12	25

Taula 14: Distribució dels subjectes dels grups que realitzaven exercici al final de l'experiment, en funció de les 3 categories de temps durant les 2 últimes setmanes en la roda d'activitat.

En la Taula 15 es presenten els descriptius per a cada variable de neurogènesi analitzada, en funció de la distribució de temps en roda durant les 2 últimes setmanes.

	DCX/secció HE	DCX/secció HD	Total DCX/secció	Densitat DCX HE	Densitat DCX HD	Densitat DCX total	n Grup Exercici
Nivell Baix	133.4 (43.1)	64.0 (16.0)	91.6 (17.7)	453.0 (133.0)	302.8 (100.9)	381.6 (92.0)	8 L-sed-exe
Nivell Mig	247.8 (76.9)	85.3 (43.3)	156.1 (48.4)	751.1 (221.0)	373.9 (151.6)	599.1 (163.2)	5 L-sed-exe 4 L-exe-exe
Nivell Alt	161.6 (54.9)	68.8 (42.1)	105.5 (40.1)	486.9 (102.5)	310.1 (95.3)	417.2 (87.0)	8 L-exe-exe

Taula 15: Mitjana (en negreta) i desviació estàndard (entre parèntesi) de les diferents variables de neurogènesi, en funció de les 3 categories de temps en la roda d'activitat durant les 2 últimes setmanes d'exercici dels grups que realitzaven exercici al final de l'experiment.

L'ANOVA per a les cèl·lules DCX+ estimades per secció indicà diferències en l'hemisferi contralateral a la lesió [$F_{(2,21)} = 7.92$; $p=0.003$] entre les tres categories d'exercici. En concret les comparacions post hoc indicaren que les rates classificades en "nivell mig" tenien un nivell de neurogènesi superior que les rates de "nivell baix" ($p=0.003$) i que les rates de "nivell alt" ($p=0.014$). L'ANOVA també indicà diferències en el total de cèl·lules DCX+ en els dos hemisferis [$F_{(2,20)} = 5.98$; $p=0.009$]. De forma semblant a l'observat per l'hemisferi contralateral, les comparacions post hoc van mostrar que les rates classificades en "nivell mig" presentaven més cèl·lules DCX+ que les rates de la categoria "nivell baix" ($p=0.012$) i les de "nivell alt" ($p=0.024$). En la Figura 39 es

mostren gràficament aquests resultats. No es van trobar diferències entre les tres categories d'exercici per al número de cèl·lules DCX+ de l'hemisferi ipsilateral.

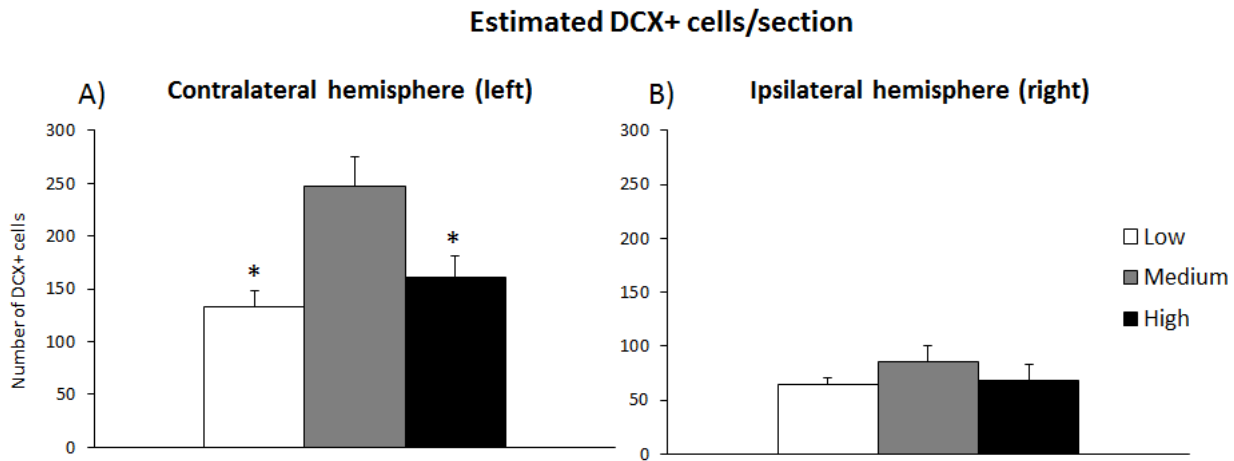


Figura 39: Cèl·lules DCX+ estimades per secció, en funció de la distribució de temps en roda durant les dues últimes setmanes d'exercici dels grups L-sed-exe i L-exe-exe A) hemisferi contralateral a la lesió; B) hemisferi ipsilateral a la lesió. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. ANOVA: *Diferències respecte nivell mig *($p < 0.05$).

Resultats similars es van observar pel que fa la densitat de cèl·lules DCX+ en el gir dentat. L'ANOVA també indicà diferències en l'hemisferi contralateral a la lesió [$F_{(2, 21)} = 8.30$; $p = 0.002$], i les comparacions post hoc van mostrar que les rates "nivell mig" presentaven més densitat que les de "nivell baix" ($p = 0.004$) i les de "nivell alt" ($p = 0.005$). Finalment, pel que fa la densitat de cèl·lules DCX+ en el conjunt dels dos hemisferis, l'ANOVA també indicà diferències [$F_{(2, 20)} = 7.25$; $p = 0.004$]. En concret, els subjectes que corrien a "nivell mig" durant les 2 últimes setmanes, presentaven major densitat que les que corrien a "nivell baix" ($p = 0.007$) i que les que corrien a "nivell alt" ($p = 0.010$). Per tant, els efectes del temps en roda eren més marcats en l'hemisferi contralateral i en el conjunt dels dos hemisferis, sense mostrar diferències en l'ipsilateral.

Per tal d'estudiar si hi havia relació entre la neurogènesi i la MRO en funció del nivell d'exercici es van realitzar proves de correlacions de Pearson entre la MRO i les diferents variables de neurogènesi per a cada nivell d'exercici. En els nivells "baix" i "mig" es va trobar una correlació positiva entre la densitat de cèl·lules DCX+ en

l'hemisferi ipsilateral i l'índex de discriminació 2 ($r=0.79$; $p=0.034$ i $r=0.77$ i $p=0.026$, respectivament). A més, la categoria "nivell mig" també presentava una correlació positiva entre l'índex de discriminació 2 i el número de cèl·lules DCX+ per secció en el mateix hemisferi ($r=0.81$; $p=0.014$).

La Figura 40 representa gràficament la correlació entre la neurogènesi i l'índex de discriminació 2, en funció de la distribució en aquests 3 nivells d'exercici.

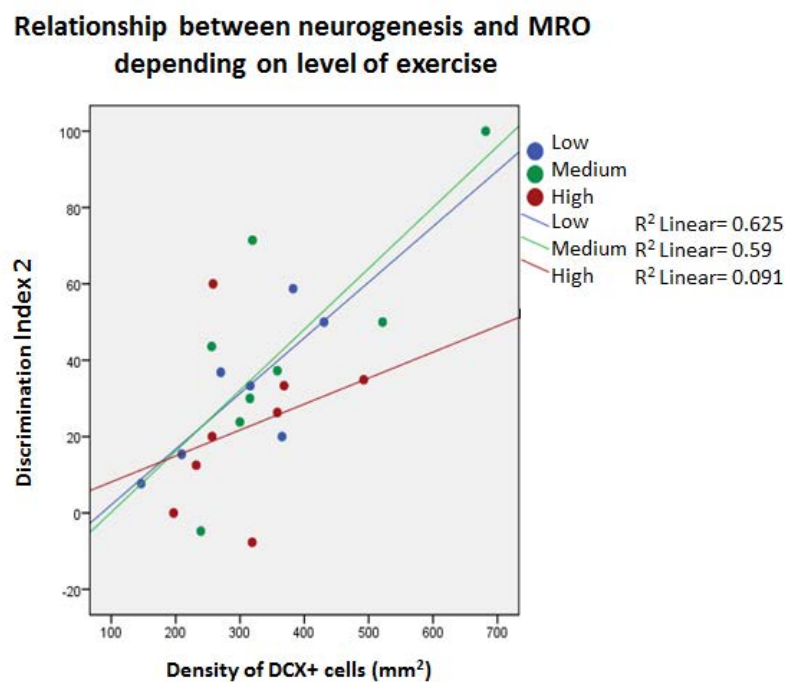


Figura 40: Diagrama de dispersió de la densitat de cèl·lules DCX+ en l'hemisferi ipsilateral i l'índex de discriminació a les 24 h, en funció de la distribució de nivells d'exercici durant les dues últimes setmanes.

4.2.6 Neuroprotecció: cèl·lules NeuN+ en l'hilus del gir dentat

Degut a problemes en el teixit, no va ser possible quantificar les cèl·lules NeuN+ a l'hilus de 7 dels animals; per tant, aquestes anàlisis es van dur a terme en 58 animals (Sham: 14, L-sed: 11, L-sed-exe: 11, L-exe-sed: 11 i L-exe-exe: 11).

La Figura 41 mostra imatges representatives de cèl·lules NeuN+ en l'hilus de l'hemisferi ipsilateral per a cada grup experimental.

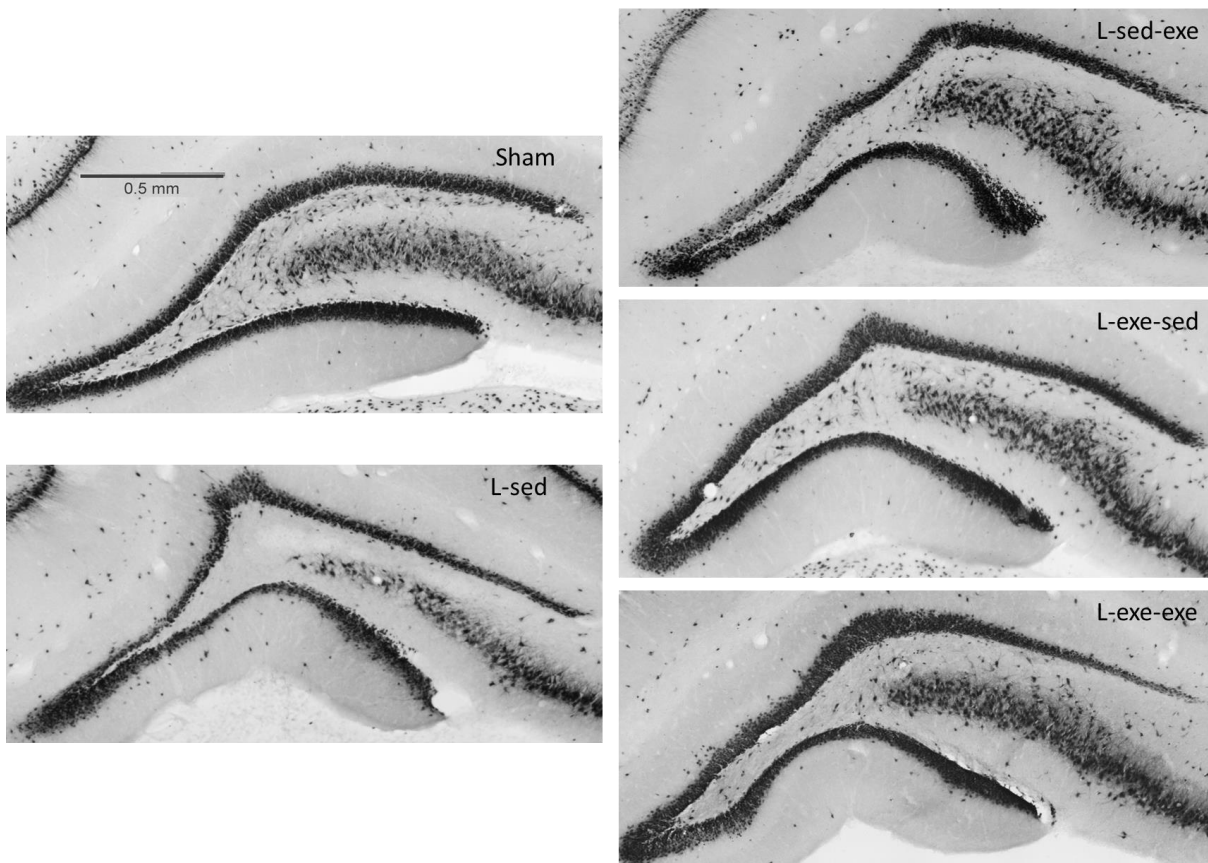


Figura 41: Imatges representatives de mosaics de l'hilus del gir dentat de cada un dels grups experimentals processats mitjançant immunohistoquímica de NeuN.

4.2.6.1 Quantificació

Donat que el número de neurones madures pot estar influït per l'àrea de teixit intacte, es va quantificar el número de cèl·lules NeuN+ i es va calcular també la seva densitat. A més es va estudiar si existien diferències entre grups en l'àrea de l'hilus de les 3 seccions considerades per a l'estudi de cèl·lules NeuN+.

Pel que fa a l'anàlisi de les àrees, l'ANOVA indicà diferències en l'àrea total de les 3 seccions de l'hilus en l'hemisferi ipsilateral a la lesió [$F_{(4,53)} = 6.13$; $p < 0.001$]. Les comparacions post hoc indicaren que l'àrea de l'hilus de l'hemisferi ipsilateral era significativament inferior en tots els grups lesionats respecte el Sham: L-sed ($p < 0.001$), L-sed-exe ($p < 0.001$), L-exe-sed ($p < 0.01$), L-exe-exe ($p = 0.045$). En les seccions analitzades, es va observar que la pèrdua de teixit era menor en la secció més anterior en l'eix rostro-caudal, per incrementar-se progressivament en les dues seccions posteriors. Per aquest motiu, també es van analitzar les àrees de l'hilus de les 3 seccions per separat. L'ANOVA no indicà diferències entre grups en la secció 1 (la més

anterior), però sí en les seccions 2 [$F_{(4,53)}= 3.57$; $p=0.012$] i 3 [$F_{(4,53)}= 8.16$; $p<0.001$]. Les comparacions post hoc van revelar que l'àrea de la secció 2 era inferior en el grup L-sed-exe que en el Sham ($p<0.01$) i tendia a ser significativament inferior en el grup L-sed respecte al Sham ($p=0.06$). En el cas de la secció 3, les mateixes anàlisis indicaren que tots els grups de lesió presentaven una àrea de l'hilus inferior que les del grup Sham: L-sed ($p<0.001$), L-sed-exe ($p<0.001$), L-exe-sed ($p<0.01$) i L-exe-exe ($p<0.01$). En la Figura 42 es mostren els gràfics de les àrees de l'hilus per seccions corresponents a l'hemisferi ipsilateral a la lesió.

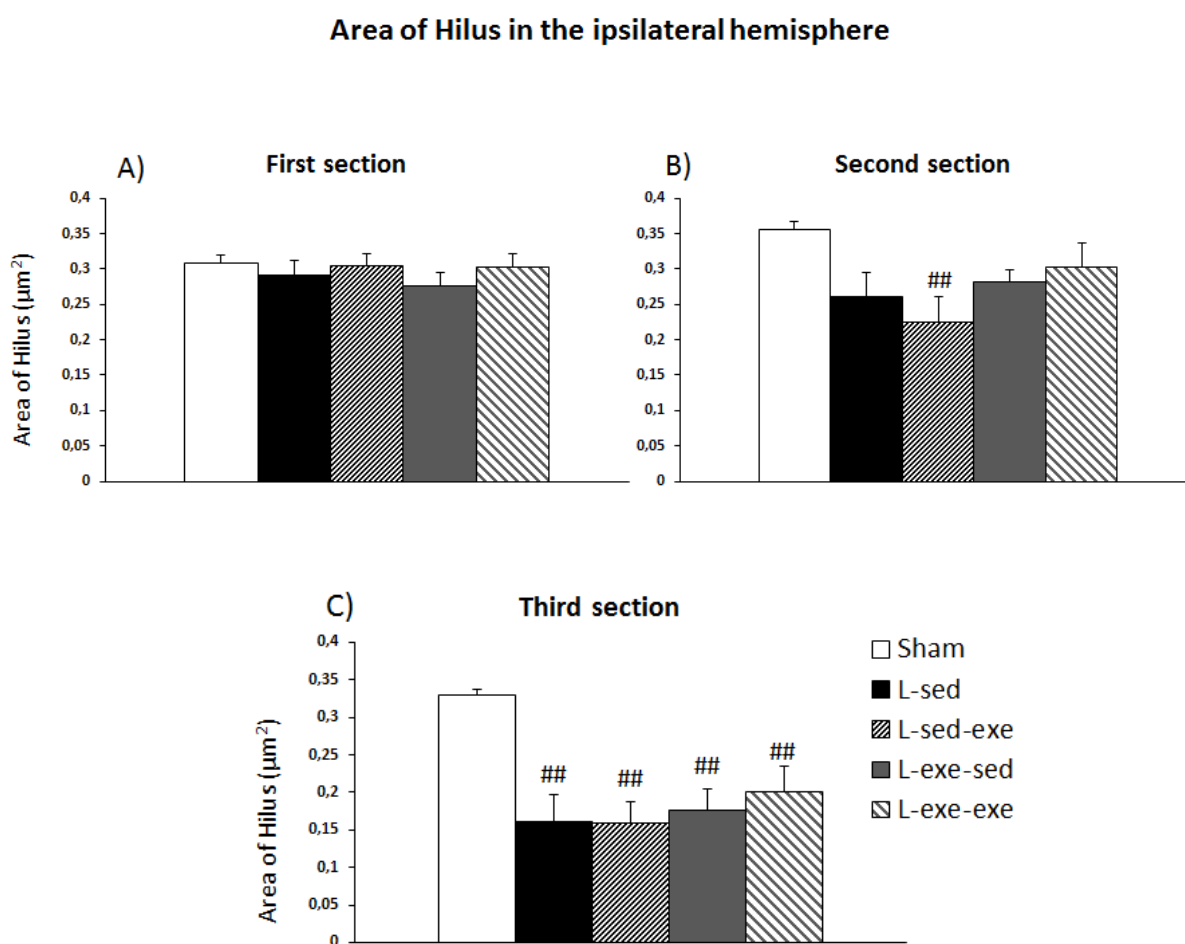


Figura 42: Àrea de l'hilus en la primera (A), la segona (B) i la tercera (C) secció. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. ANOVA: #Diferències respecte Sham #($p<0.05$), ##($p<0.01$).

En la Figura 43 es mostren els resultats del número de cèl·lules NeuN+ en l'hilus de l'hemisferi contralateral i de l'hemisferi ipsilateral a la lesió.

L'ANOVA indicà diferències entre grups en el número total de cèl·lules NeuN+ en l'hemisferi ipsilateral a la lesió [$F_{(4,53)}= 29.75$; $p<0.001$]. En canvi, en l'hemisferi contralateral no es van trobar diferències. Les comparacions post hoc indicaren que en l'hemisferi ipsilateral el grup Sham presentava un número significativament major de cèl·lules NeuN+ que tots els altres grups: L-sed ($p<0.001$), L-sed-exe ($p<0.001$), L-exe-sed ($p<0.001$), L-exe-exe ($p<0.001$). També van mostrar que el grup L-exe-sed presentava més cèl·lules NeuN+ que el grup L-sed ($p=0.023$). Pel que fa al número de cèl·lules NeuN+ en el conjunt dels dos hemisferis, l'ANOVA indicà diferències entre grups [$F_{(4, 53)}= 14.36$; $p<0.001$]. Les anàlisis post hoc indicaren que tots els grups lesió presentaven menys número de cèl·lules NeuN+ que el grup Sham: L-sed (<0.001), L-sed-exe (<0.001), L-exe-sed (<0.001), L-exe-exe (<0.001).

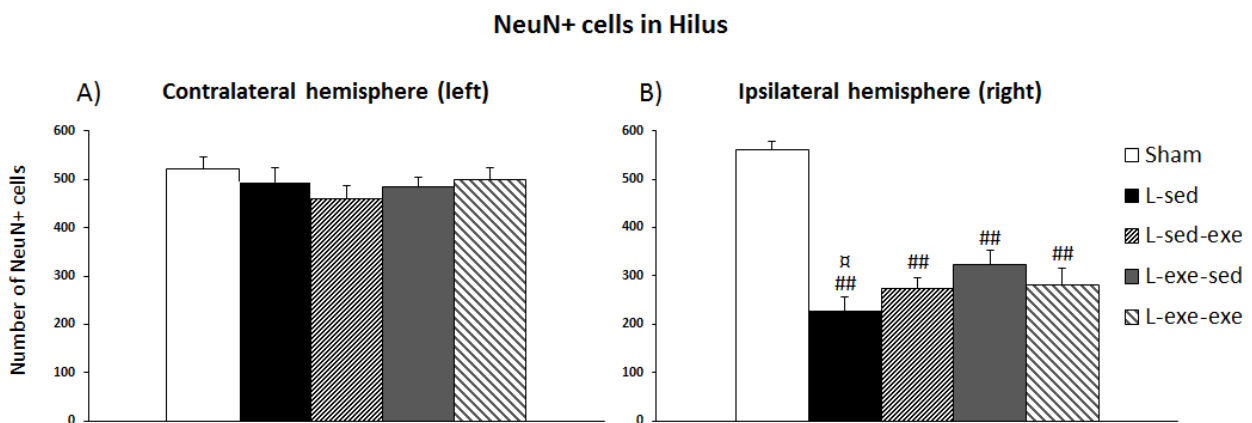


Figura 43: Número de cèl·lules NeuN+ en l'hilus. A) hemisferi contralateral a la lesió; B) hemisferi ipsilateral a la lesió. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. ANOVA: #Diferències respecte Sham #($p<0.05$), ##($p<0.01$). \times Diferències respecte el grup L-exe-sed \times ($p<0.05$).

Per examinar un possible efecte regional del TBI sobre la pèrdua de cèl·lules NeuN+ a l'hilus, tant el número com la densitat d'aquestes cèl·lules es van analitzar també mitjançant una MANOVA mixt amb un factor entresubjecte (grup) i un factor intrasubjecte (secció cerebral). Pel que fa al número de cèl·lules NeuN+ de l'hemisferi esquerre la MANOVA no indicà cap efecte dels factors principals i la seva interacció. Pel que fa a la densitat en aquest hemisferi, tampoc no eren significatius el grup i la interacció grup x secció, però sí el factor secció [$F_{(106,2)}=21.17$; $p<0.001$]. Els contrastos polinomials indicaren una evolució quadràtica en sentit anteroposterior

[$t=6.34$; $p<0.001$]. Això respon al fet que, en el conjunt de la mostra, hi ha una reducció de la densitat entre la secció 1 i la 2, i una certa recuperació de la densitat a la secció 3.

Les anàlisis per a l'hemisferi dret (ipsilateral a la lesió), que estan especificats a la Taula 16, indicaren, per a totes dues variables (número i densitat), que tant l'efecte grup, com l'efecte secció, així com la interacció grup x secció eren significatius. Per aquest motiu vam portar a terme anàlisis d'efectes simples per a cada una de les tres seccions separatament, i es van realitzar també contrastos (mètode: contrast simple) per tal de comparar els valors de cada un dels grups amb els del grup Sham, per una banda, i amb els del grup L-sed per l'altra. Com es pot veure a la taula, a la primera secció només el grup L-sed tenia un número de cèl·lules NeuN+ significativament inferior al del grup Sham, mentre que els valors del grup L-exe-sed eren significativament superiors als del grup L-sed. Pel que fa a la densitat de la secció 1, el grup L-sed tenia valors significativament inferiors als del grup Sham, així com als dels grups L-exe-sed i L-sed-exe (i amb una tendència a la significació respecte al grup L-exe-exe). A les seccions 2 i 3 tots els grups amb TBI presentaven valors de número i densitat significativament inferiors als del grup Sham. A més, a la secció 2, igual que a la 1, el número de cèl·lules NeuN+ del grup L-exe-sed era significativament superior al del grup L-sed.

Finalment, una anàlisi de les diferències entre seccions cerebrals dintre de cada grup indicà la manca de diferències significatives en el grup Sham, tant pel que fa al número com a la densitat de cèl·lules NeuN+. En canvi, en tots els grups de lesió es van trobar diferències entre seccions en ambdues variables.

En resum, aquestes variables confirmen un efecte regional del TBI, amb major afectació a les seccions 2 i 3 (coincidents amb la zona de cavitat de la lesió) que a la primera secció, tot i que en el grup L-sed, però no en cap dels tres grups amb exercici, també s'observa pèrdua cel·lular en aquesta secció. L'efecte protector de l'exercici és especialment marcat en el grup L-exe-sed, que presenta un número significativament superior de cèl·lules NeuN+ que el grup L-sed a les seccions 1 i 2 (però no a la 3).

El número de cèl·lules NeuN+ per a cada una de les tres seccions i per a cada un dels grups experimentals es representen a la Figura 44.

Número de cèl·lules NeuN+ Hilus hemisferi dret	Densitat de cèl·lules NeuN+ Hilus hemisferi dret
MANOVA grup x secció Grup: $F_{(53,4)} = 29.75$; $p < 0.001$ Secció: $F_{(106,2)} = 129.47$; $p < 0.001$ Grup x secció: $F_{(106,8)} = 7.68$; $p < 0.001$	MANOVA grup x secció Grup: $F_{(47,4)} = 13.94$; $p < 0.001$ Secció: $F_{(94,2)} = 82.93$; $p < 0.001$ Grup x secció: $F_{(94,8)} = 4.50$; $p < 0.001$
Comparació entre grups (contrast simple) separadament per a cada una de les seccions Secció 1: Factor grup: $p = 0.06$. L-sed < Sham; $t = -2.84$; $p = 0.006$ L-exe-sed > L-sed; $t = 2.51$; $p = 0.015$ Secció 2: Factor grup: $F_{(53,4)} = 21.25$; $p < 0.001$ L-sed < Sham; $t = -7.41$; $p < 0.001$ L-exe-sed < Sham; $t = -5.60$; $p < 0.001$ L-sed-exe < Sham; $t = -7.34$; $p < 0.001$ L-exe-exe < Sham; $t = -7.08$; $p < 0.001$ Tendència L-exe-sed > L-sed; $p = 0.09$ Secció 3: Factor grup: $F_{(53,4)} = 52.97$; $p < 0.001$ L-sed < Sham; $t = -11.78$; $p < 0.001$ L-exe-sed < Sham; $t = -10.76$; $p < 0.001$ L-sed-exe < Sham; $t = -11.11$; $p < 0.001$ L-exe-exe < Sham; $t = -10.50$; $p < 0.001$	Comparació entre grups (contrast simple) separadament per a cada una de les seccions Secció 1: Factor grup: $F_{(47,4)} = 2.81$; $p = 0.036$ L-sed < Sham; $t = -2.74$; $p = 0.008$ L-exe-sed > L-sed; $t = 3.16$; $p = 0.027$ L-sed-exe > L-sed; $t = 2.13$; $p = 0.037$ L-exe-exe > L-sed; $p = 0.055$ Secció 2: Factor grup: $F_{(47,4)} = 13.11$; $p < 0.001$ L-sed < Sham; $t = -5.33$; $p < 0.001$ L-exe-sed < Sham; $t = -3.80$; $p = 0.004$ L-sed-exe < Sham; $t = -4.98$; $p < 0.001$ L-exe-exe < Sham; $t = -6.27$; $p < 0.001$ Secció 3: Factor grup: $F_{(47,4)} = 17.81$; $p < 0.001$ L-sed < Sham; $t = -6.39$; $p < 0.001$ L-exe-sed < Sham; $t = -6.43$; $p < 0.001$ L-sed-exe < Sham; $t = -6.20$; $p < 0.001$ L-exe-exe < Sham; $t = -5.97$; $p < 0.001$
Diferències entre les tres seccions cerebrals dintre de cada grup Grup Sham: NS Grup L-sed: $p < 0.001$ (funció lineal) Grup L-exe-sed: $p < 0.001$ (funció lineal) Grup L-sed-exe: $p < 0.013$ (funció quadràtica) Grup L-exe-exe: $p < 0.005$ (funció quadràtica)	Diferències entre les tres seccions cerebrals dintre de cada grup Grup Sham: NS Grup L-sed: $p = 0.004$ (funció quadràtica) Grup L-exe-sed: $p < 0.001$ (funció quadràtica) Grup L-sed-exe: $p < 0.001$ (funció quadràtica) Grup L-exe-exe: $p = 0.021$ (funció quadràtica)

Taula 16: Resultats de la MANOVA per analitzar les possibles diferències entre grups i entre les tres seccions quantificades pel que fa tant al número com a la densitat de cèl·lules NeuN+ a l'hilus de l'hemisferi dret. A l'hemisferi esquerre no es va trobar cap efecte significatiu.

NeuN+ cells in Hilus of ipsilateral hemisphere (right)

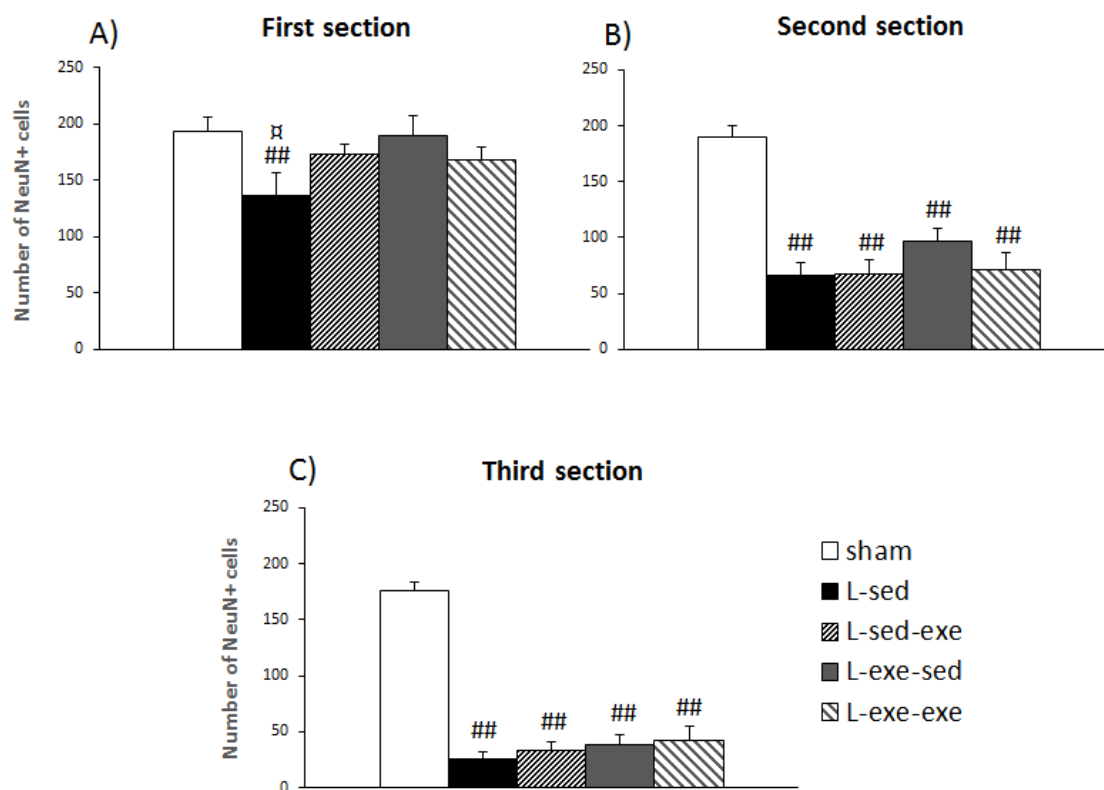


Figura 44: Número de cèl·lules NeuN+ en l'hilus del gir dentat de l'hemisferi ipsilateral a la lesió A) primera secció; B) segona secció; C) tercera secció. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. MANOVA: #Diferències respecte Sham ($p < 0.05$), ##($p < 0.01$). α Diferències respecte el grup L-exe-sed ($p < 0.05$).

L'ANOVA també indicà diferències entre grups, en la densitat de cèl·lules NeuN+ en l'hemisferi ipsilateral a la lesió [$F_{(4,50)} = 9.35$; $p < 0.001$]. En canvi, en l'hemisferi contralateral no es van trobar diferències. Les comparacions post hoc pel que fa a l'hemisferi ipsilateral indicaren que el grup Sham presentava una densitat de cèl·lules NeuN+ significativament superior que tots els altres: sed ($p < 0.001$), L-sed-exe ($p < 0.001$), L-exe-sed ($p = 0.014$), L-exe-exe ($p < 0.001$). També van mostrar que el grup L-exe-sed tendia a presentar més densitat de cèl·lules NeuN+ que els grups L-sed ($p = 0.051$) i L-exe-exe ($p = 0.084$). Aquests resultats es mostren en la Figura 45.

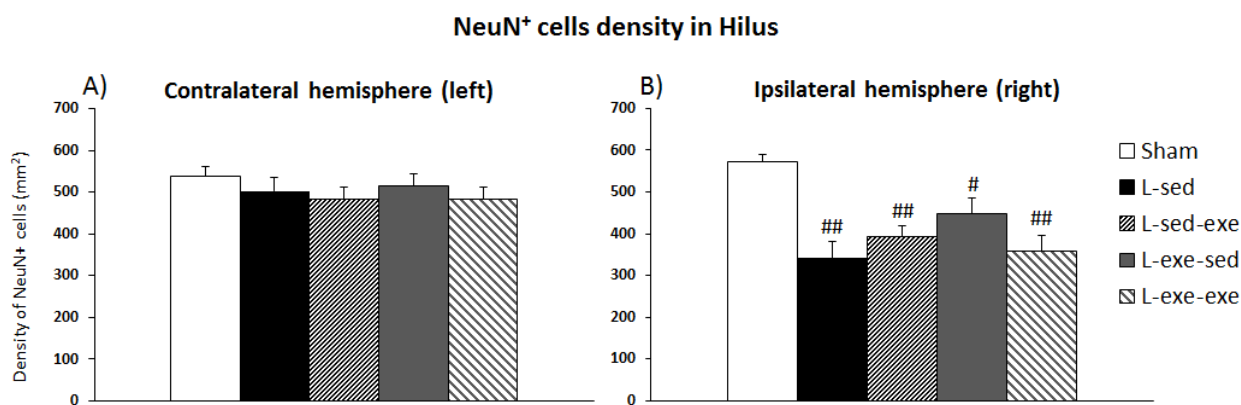


Figura 45: densitat de cèl·lules NeuN⁺ en l'hilus del gir dentat A) hemisferi contralateral a la lesió; B) hemisferi ipsilateral a la lesió. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. ANOVA: #Diferències respecte sham #($p<0.05$), ##($p<0.01$).

4.2.6.2 Relació entre el número de cèl·lules NeuN⁺ en hilus i la MRO

Tal com es pot veure a la Taula 17, l'estudi correlacional realitzat amb la mostra de tots els grups ($n=58$), indicà l'existència de correlacions positives entre diferents variables de NeuN i l'índex de discriminació 2 (24 h).

	Índex de Discriminació 2
Número de cèl·lules NeuN a la secció1 de l'hilus de l'hemisferi dret	0.40 ($p=0.002$)
Número total de cèl·lules NeuN ⁺ a l'hilus de l'hemisferi dret	0.28 ($p=0.031$)
Número de cèl·lules NeuN ⁺ a la secció 1 de l'hilus de l'hemisferi esquerre	0.33 ($p=0.013$)
Número de cèl·lules NeuN ⁺ a l'hilus en el conjunt dels 2 hemisferis	0.30 ($p=0.025$)

Taula 17: Correlacions de Pearson entre MRO i cèl·lules NeuN⁺ en hilus. Mostra: tots els grups.

Les mateixes correlacions es van analitzar per a cada grup per separat. En les Taules 18 i 19 es presenten les correlacions de Pearson entre les cèl·lules NeuN⁺ en l'hilus i la MRO en els grups en què s'han trobat correlacions significatives: Sham ($n=14$) i L-exe-exe ($n=11$).

	Índex de Discriminació 2
Número total de cèl·lules NeuN+ a l'hilus de l'hemisferi dret	0.66 (p=0.001)
Número total de cèl·lules NeuN+ a la secció 2 de l'hilus de l'hemisferi dret esquerre	0.56 (p=0.04)

Taula 18: Correlacions de Pearson entre MRO i cèl·lules NeuN en hilus. Mostra: Sham (n=14).

	Índex de Discriminació 2
Número de cèl·lules NeuN a la secció1 de l'hilus de l'hemisferi dret	0.67 (p=0.023)
Número de cèl·lules NeuN a la secció1 de l'hilus de l'hemisferi esquerre	0.69 (p=0.02)

Taula 19: Correlacions de Pearson MRO i cèl·lules NeuN en hilus. Mostra: L-exe-exe (n=11).

4.2.6.3 Relació entre número de cèl·lules NeuN+ a l'hilus i l'exercici físic

Considerant els dos grups que iniciaven l'exercici 4 dies després del TBI, es va trobar una correlació negativa significativa entre el temps acumulat en la roda d'activitat al llarg de totes les setmanes d'exercici i la densitat de cèl·lules NeuN+ a la segona secció de l'hemisferi dret analitzada ($r=-0.45$; $p=0.034$).

4.2.7 Neuroprotecció: cèl·lules NeuN+ en l'escorça perirhinal

Per a la quantificació de cèl·lules madures en la PRhc es van analitzar un total de 40 subjectes. L'ANOVA no indicà diferències entre grups ni en el número de cèl·lules NeuN+ estimades, ni en la densitat de cèl·lules NeuN+ en la PRhc. Per tant, no es va observar cap efecte deteriorant del TBI (ni tampoc cap efecte de l'exercici físic) sobre el número de neurones madures en aquesta regió cerebral.

4.2.8 Neuroinflamació: cèl·lules iba1+ reactives en l'hipocamp dorsal

Tot i que es van apreciar indicis de reactivitat de cèl·lules Iba1 en diferents regions cerebrals (cos callós, tàlem dorsal, etc), només es va analitzar la corresponent a l'hipocamp dorsal. La Figura 46 mostra una imatge on es poden veure les alteracions en diferents estructures.

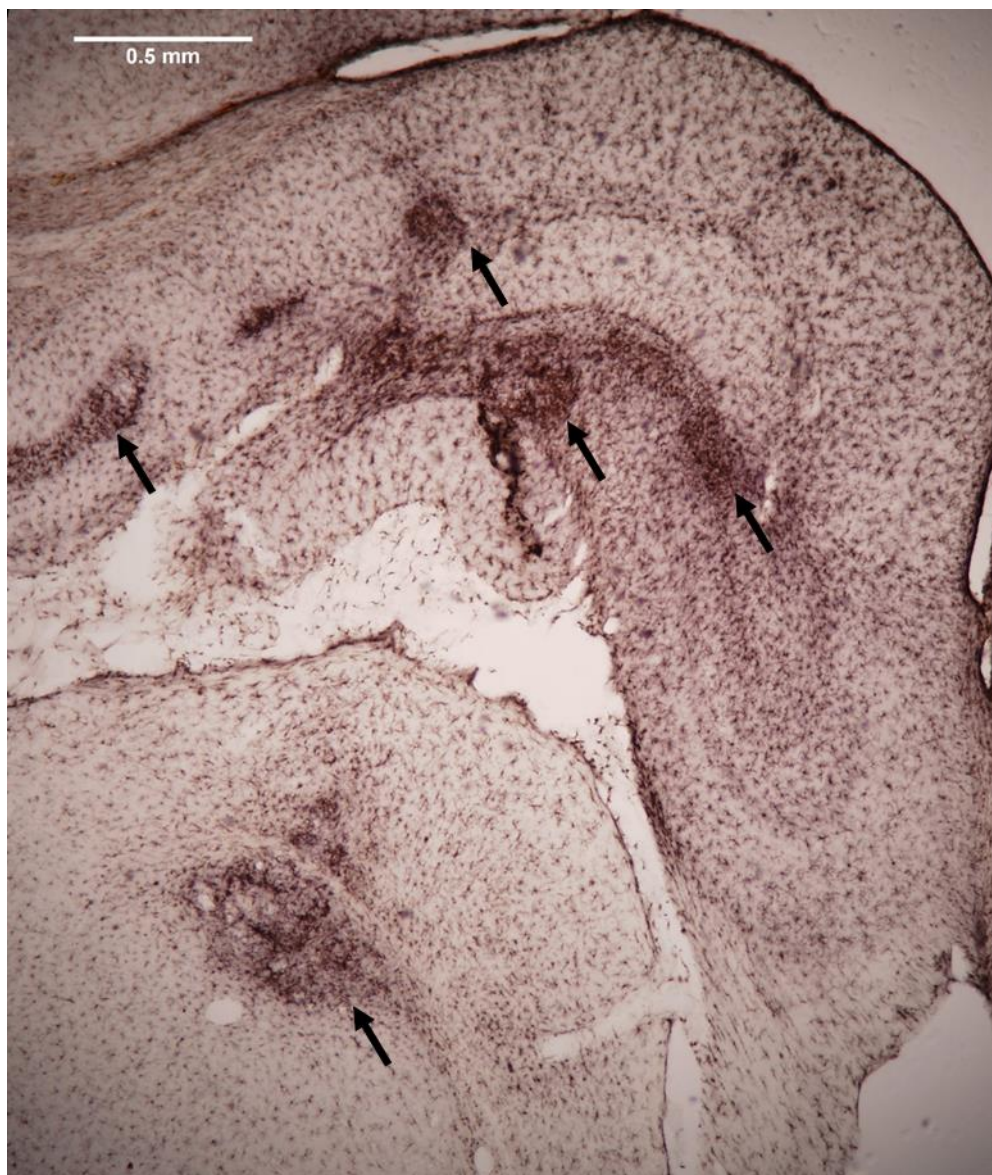


Figura 46: Imatge representativa de part d'una secció coronal d'encèfal processada per immunohistoquímica amb Iba1+ a objectiu 4x de l'hemisferi ipsilateral d'un subjecte amb lesió. S'observen diferents focus de reactivitat a l'hipocamp dorsal i en el tàlem.

4.2.8.1 Anàlisi qualitativa

En la Figura 47 es mostren imatges representatives del marcatge amb Iba1 en l'hipocamp dorsal, en els diferents grups experimentals.

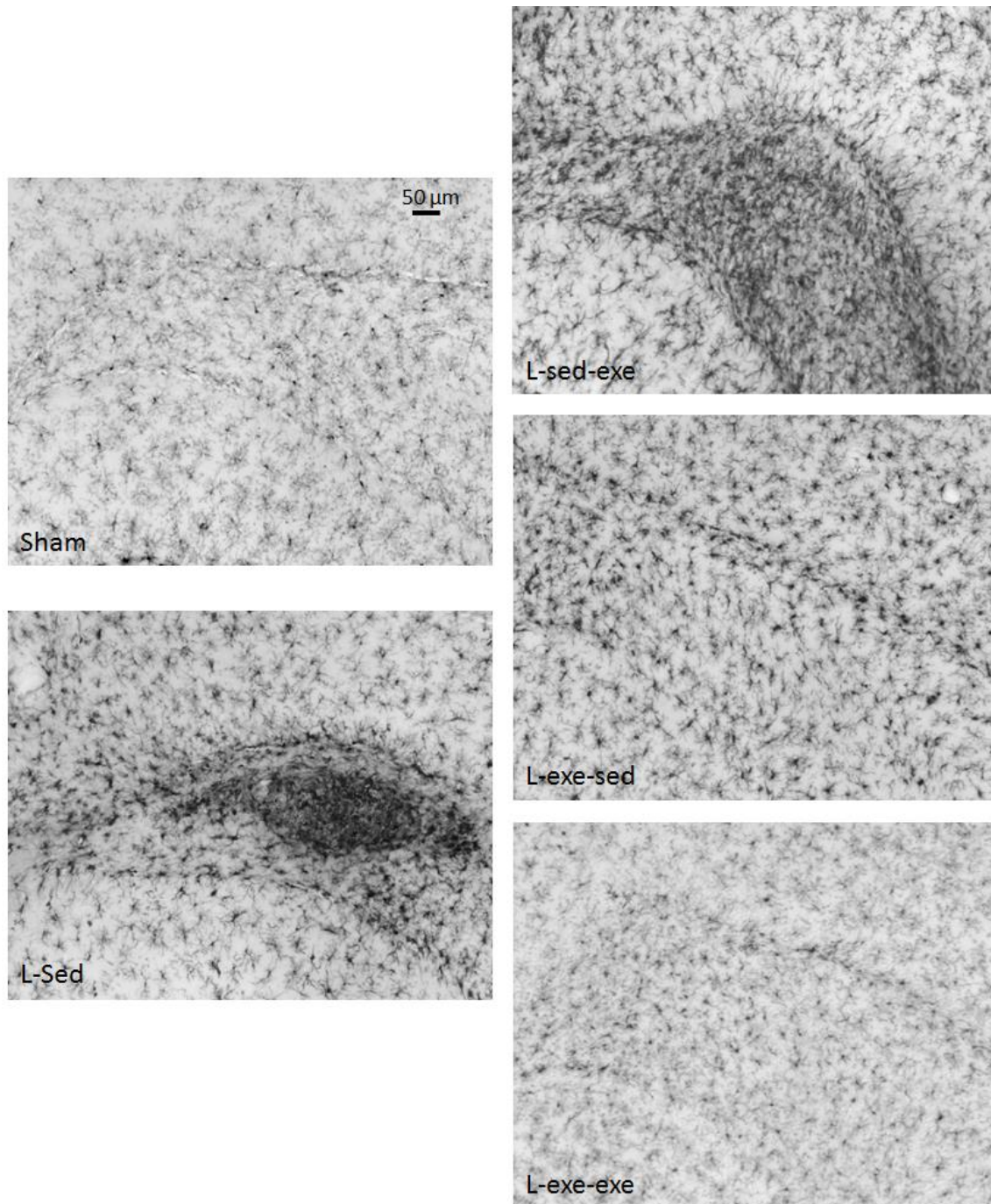


Figura 47: Imatges representatives de cèl·lules Iba1+ a objectiu 10x de l'hipocamp dorsal en l'hemisferi ipsilateral.

En la Figura 48 es representa gràficament el percentatge de subjectes que presenten diferents graus de reactivitat d'Iba1 (segons la classificació descrita en el punt x de l'apartat de mètodes) en cada grup experimental. Els subjectes del grup Sham es van classificar amb grau de reactivitat 0, a excepció d'un animal (14.30%), que mostrava cert grau de reactivitat d'Iba 1 (Grau 1) tant en l'hemisferi ipsilateral com en el

contralateral a la craniotomia. En la resta d'animals, pel que fa a l'hipocamp dorsal només es va observar reactivitat d'iba1 en l'hemisferi ipsilateral. El grup amb la major proporció d'animals amb grau de reactivitat 3 (la més alta) va ser el L-sed (57.10%), seguit pel grup L-sed-exe (42.90%). Aquesta proporció era inferior en els grups que iniciaven l'exercici als 4 dies de la lesió: L-exe-sed (28.60%) i L-exe-exe (28.60%). El test de taules de contingències mostrà que hi havia diferències significatives entre grups en la distribució de les proporcions dels graus de reactivitat [chi quadrat (12)= 25.08; p= 0.014].

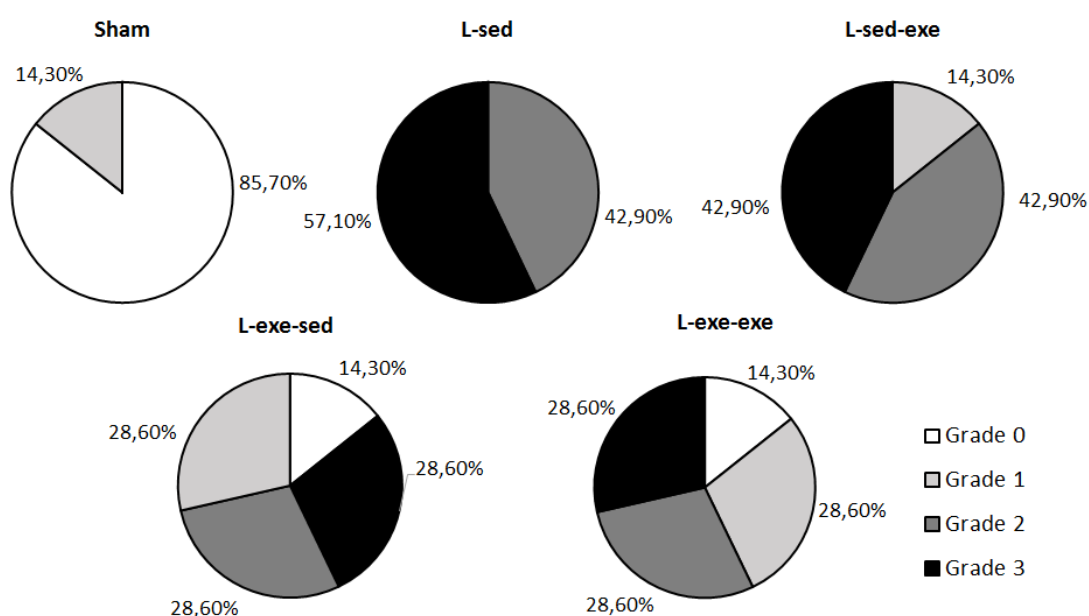


Figura 48: Percentatge de subjectes amb diferents graus de reactivitat d'Iba1⁺ per a cada grup experimental en l'hipocamp dorsal.

En la Figura 49 es representa gràficament la proporció de subjectes amb presència o absència de mínim 1 focus de reactivitat d'Iba1 en l'hipocamp dorsal ipsilateral a la lesió (Grau de reactivitat 2 o 3). Cap dels subjectes del grup Sham presentava focus, en cap de les seccions analitzades, mentre que el 100% dels subjectes del grup L-sed i el 85.70% dels subjectes del grup L-sed-exe presentaven com a mínim un focus. En canvi, els grups que iniciaven l'exercici als 4 dies de la lesió (L-exe-sed i L-exe-exe) presentaven una proporció de subjectes amb presència de focus del 57.10%. El test de taules de contingències mostrà que hi havia diferències significatives entre grups en la

distribució de presència i absència de focus de reactivitat [chi quadrat (4) = 17.14; p= 0.002].

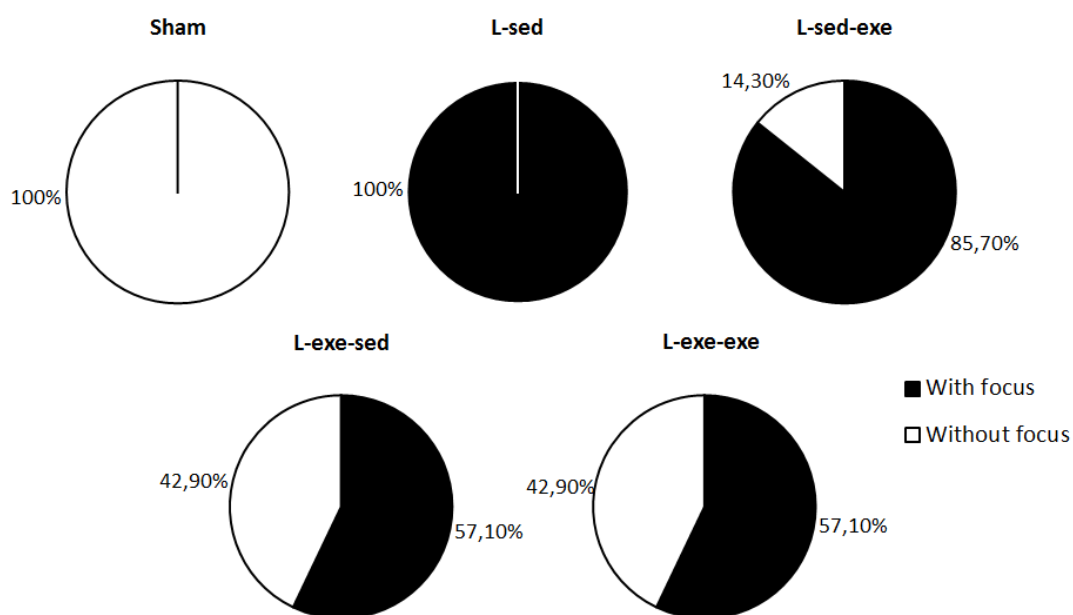


Figura 49: Percentatge de subjectes amb presència de focus i sense focus per a cada grup experimental en l'hipocamp dorsal.

4.2.8.2 Anàlisi quantitativa

El subjecte Sham que presentava cert grau de reactivitat microglial en els dos hemisferis va ser exclòs de l'anàlisi quantitativa. La mostra final per tant, estava formada per 34 subjectes (Sham: 6, L-sed: 7, L-sed-exe: 7, L-exe-sed: 7 i L-exe-exe: 7). En alguns animals lesionats, no es va poder analitzar alguna secció perquè la cavitat de la lesió abarcava la regió que hauria contingut l'hipocamp dorsal. Per aquest motiu, les anàlisis estadístiques d'aquestes seccions es van realitzar amb una mostra inferior a 34.

L'ANOVA no indicà diferències significatives entre grups respecte l'àrea ocupada per cèl·lules iba1+, ni per cada secció per separat, ni per la mitjana de les 3 seccions analitzades, en cap dels dos hemisferis.

En la Figura 50 es representen gràficament les mitjanes, per a cada grup experimental, de la intensitat mitjana de grisos (MGV) per a la secció 3, 5 i 7, tant de l'hemisferi ipsilateral, com del contralateral a la lesió. Un major valor de MGV indica una major intensitat de marcatge per Iba1.

L'ANOVA no indicà diferències significatives entre grups experimentals per la secció 3, en cap dels dos hemisferi, i tampoc en l'hemisferi contralateral de les seccions 5 i 7. En canvi, sí indicà diferències entre grups en las seccions 5 [$F_{(4,29)}=4.13$; $p<0.01$] i 7 [$F_{(4,25)}=5.76$; $p<0.01$] en l'hemisferi ipsilateral a la lesió. En el cas de la secció 5, les anàlisis post hoc van mostrar un increment de MGv en els grups L-sed ($p=0.018$) i L-sed-exe ($p=0.010$) respecte al grup Sham. En canvi, el MGv no diferia estadísticament del Sham en els grup L-exe-sed i L-exe-exe, tot i que el grup L-exe-sed tendia a mostrar una major intensitat de marcatge que el Sham ($p=0.088$). En relació a la secció 7, el MGv era major en els grups L-sed ($p<0.01$), L-sed-exe ($p<0.01$) i L-exe-sed ($p=0.036$) en comparació al grup Sham. En canvi, no es van trobar diferències significatives entre els grups L-exe-exe i Sham.

L'ANOVA també indicà diferències entre grups per la mitjana de MGv de les 3 seccions en l'hemisferi ipsilateral [$F_{(4,29)}=5.05$; $p<0.01$]. Les anàlisis post hoc van mostrar que els grup L-sed ($p=0.013$) i L-sed-exe ($p<0.01$) presentaven un valor de MGv significativament superior que el del grup Sham. En canvi, no es van trobar diferències significatives en els grups L-exe-sed i L-exe-exe respecte el Sham, tot i que es va observar una tendència a la significació en el grup L-exe-sed ($p=0.068$).

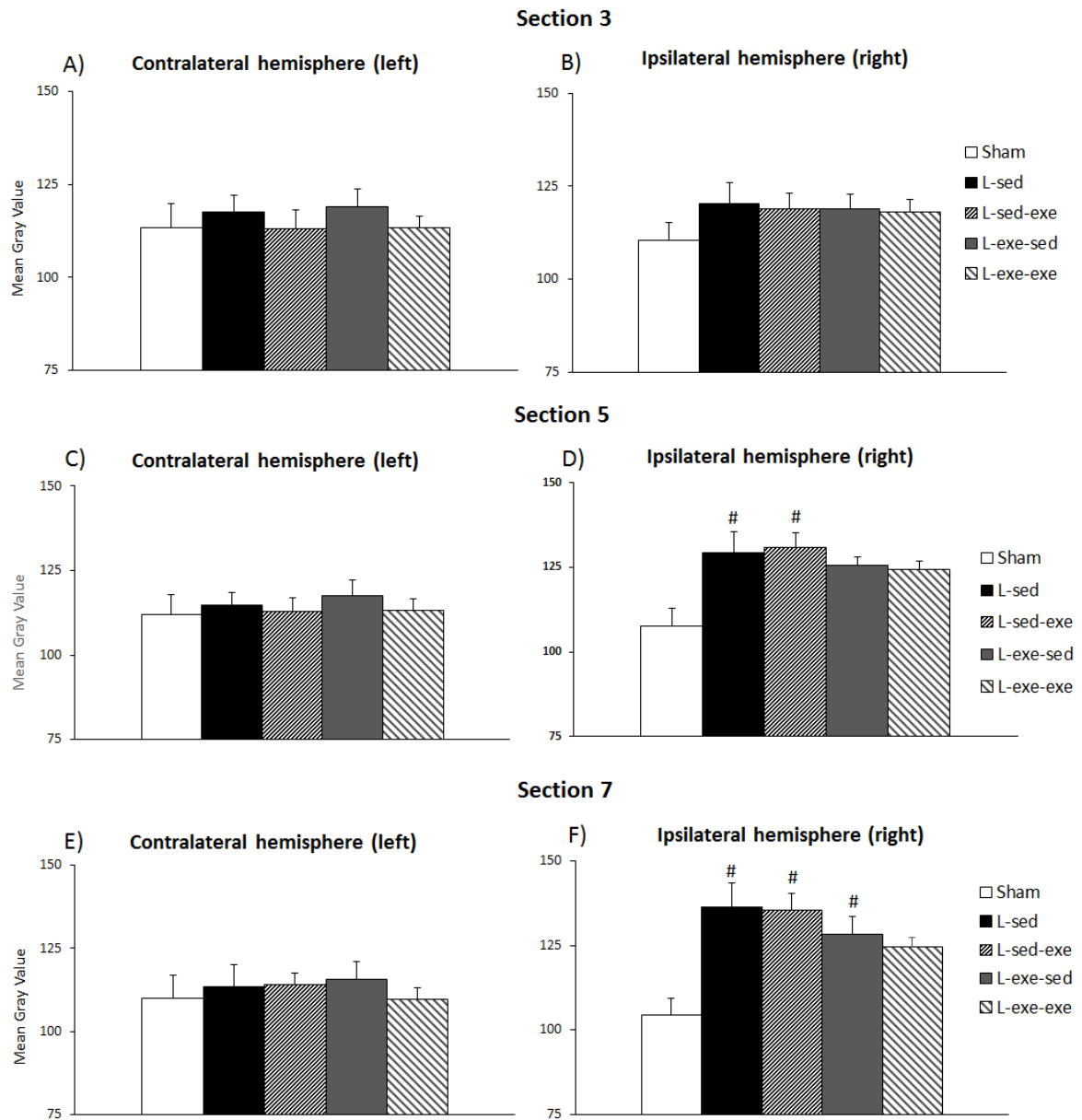


Figura 50: Intensitat mitjana de grisos (MGV) en l'hipocamp dorsal de cada una de les tres seccions analitzades per a cada grup experimental. A) Secció 3, hemisferi contralateral; B) secció 3 hemisferi ipsilateral; C) Secció 5, hemisferi contralateral; D) Secció, hemisferi ipsilateral; E) Secció 7, hemisferi contralateral; F) Secció 7, hemisferi ipsilateral. Cada valor representa la mitjana \pm SEM. ANOVA: #Diferències respecte a Sham $\#(p < 0.05)$.

4.2.8.3 Relació entre la neuroinflamació i altres variables

Per tal de determinar si els nivells de neuroinflamació estaven relacionats amb les mesures de memòria, els nivells d'exercici o amb les altres variables histològiques estudiades, es van fer anàlisis de correlacions de Pearson en tots els grups lesionats (n=25-28) i amb la mostra global (n=34).

Relació amb l'exercici

En la mostra formada pel conjunt d'animals lesionats amb exercici (19-21), no es va trobar cap correlació entre les variables relatives a reactivitat d'Iba1 i les variables d'exercici (distància, velocitat i temps) durant les 3 primeres setmanes de cada grup. En canvi, considerant per separat cadascun dels grups d'exercici, en l'únic en què es van trobar correlacions significatives va ser en el grup L-exe-exe. Concretament, en aquest grup es van trobar correlacions positives entre el temps mig diari en la roda d'activitat durant les darreres setmanes de l'experiment i la reactivitat d'Iba1. Aquests resultats es mostren en la Taula 20.

	Temps exercici setmana5	Temps exercici setmana6	Temps exercici setmana7	Temps exercici 2 últimes setmanes
MGV secció 5 Hemisferi Dret	0.68 (p=0.093)	0.71 (p=0.071)	0.73 (p=0.061)	0.76 (p=0.046)

Taula 20: Correlacions entre reactivitat Iba1 i temps exercici. Mostra: L-exe-exe (n=7)

Relació amb la MRO

Per al conjunt d'animals amb TBI, es van trobar correlacions negatives entre l'àrea ocupada per cèl·lules Iba1+ a l'hipocamp dorsal i l'índex de discriminació 1 (Taula 21), però no amb l'índex de discriminació 2. En canvi, el MGVS no correlacionava amb l'execució en cap dels dos test de retenció.

	Àrea_ secció3 Hemisferi Dret	Àrea secció5 Hemisferi Dret	Àrea secció7 Hemisferi Dret	Àrea total Hemisferi Dret
Índex de Discriminació 1	-0.49 (p<0.01)	-0.46 (p=0.014)	-0.51 (p<0.01)	-0.47 (p=0.012)

Taula 21: Correlacions de Pearson entre reactivitat d'Iba1 i MRO. Mostra: grups lesió (n=25-28).

Relació amb les mesures macroscòpiques de la lesió

L'estudi de la relació entre les variables analitzades en l'avaluació macroscòpica de la lesió i el marcatge amb Iba1, va mostrar una correlació positiva significativa entre la profunditat màxima de la cavitat de lesió i les variables de reactivitat d'Iba1 en les diferents seccions estudiades, per al conjunt d'animals (Taula 22).

	MGV secció5 Hemisferi Dret	MGV secció7 Hemisferi Dret	MGV total Hemisferi Dret
Profunditat màxima cavitat	0.45 (<0.01)	0.60 (<0.001)	0.45 (<0.01)

Taula 22: Correlacions de Pearson entre mesures macroscòpiques lesió i Iba1. Mostra: tots els grups (n=29-32).

Relació amb la neuroprotecció a l'hilus

En la mostra global de subjectes es van trobar correlacions negatives entre alguns dels valors de MG, i el número de cèl·lules NeuN+ i l'àrea de l'hilus (Taula 23).

	MGV secció5 Hemisferi Dret	MGV secció7 Hemisferi Dret	MGV total Hemisferi Dret
NeuN+ hilus Hemisferi Dret	-0.53 (p<0.01)	-0.64 (p<0.01)	-0.49 (p=0.003)
NeuN hilus conjunt 2 hemisferis	-0.41 (p=0.016)	-0.50 (p<0.01)	-0.38 (p=0.026)
Àrea hilus Hemisferi Dret	-0.48 (p<0.01)	-0.49 (p<0.01)	-0.41 (p=0.015)

Taula 23: Correlacions de Pearson reactivitat d'Iba1 i NeuN. Mostra: tots els grups (N=29-34).

Relació amb la neurogènesi

No es van trobar correlacions significatives entre la neurogènesi i la reactivitat microglial.

4.2.9 Taula resum dels resultats

La Taula 24 indica de manera esquemàtica els principals resultats significatius obtinguts en aquest experiment.

	Sham	L-sed	L-sed-exe	L-exe-sed	L-exe-exe
MRO: Record 3h	Sí	No	Sí	Sí	Sí
MRO: Record 24h	Sí	No	Sí	Sí	Sí
MRO: ≠ entre grups		↓vs. Sham	=Sham ↑vs. L-sed	=Sham ↑vs. L-sed	= Sham = L-sed
Ratio hipocampal: ≠ 100	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Ratio hipocampal ≠ entre grups		↓vs. Sham	= Sham = L-sed	= Sham = L-sed	↓vs. Sham
Neurogènesi: ≠ entre grups gir dentat ipsilateral		↓vs. Sham	=Sham ↑vs. L-sed i L-exe-sed	↓vs. Sham	=Sham ↑vs. L-sed
Neurogènesi: ≠ entre grups gir dentat contralateral			↑vs. Sham, L-sed i L-exe-sed		↑vs. Sham, L-sed i L-exe-sed
Neuroprotecció: ≠ entre grups hilus ipsilateral		↓vs. Sham	↓vs. Sham	↓vs. Sham ↑vs. L-sed	↓vs. Sham
Neuroprotecció: PRhc		= Sham	= Sham	= Sham	= Sham
Inflamació: ≠ entre grups hipocamp ipsilateral		↑vs. Sham	↑vs. Sham	= Sham = L-sed	= Sham = L-sed

Taula 24: Resum dels principals resultats. ↑: increment significatiu; ↓: disminució significativa.

4.3 Discussió

D'acord amb els resultats obtinguts, el TBI va causar dèficit de la MRO a les 24 h, mentre que la MRO a les 3 h va tenir una lleu afectació. Aquest deteriorament de la memòria, observat durant la fase crònica del TBI (7 setmanes després de la lesió), s'acompanyava d'una pèrdua important de teixit cerebral a nivell del cortex parietal (cavitat de la lesió produïda principalment per dany primari), i de diversos canvis histològics (principalment associats a dany secundari) que afectaven sobretot a l'hipocamp de l'hemisferi ipsilateral, tals com: disminució del volum de l'hipocamp dorsal, menor neurogènesi en el gir dentat, pèrdua de neurones madures en l'hilus i

reactivitat microglial. Les tres pautes temporals d'exercici físic voluntari provades en el nostre experiment van mostrar efectivitat per reduir el dèficit de memòria tant a les 3 h, on la pèrdua de memòria era mínima, com a les 24 h, on la memòria estava greument afectada. D'aquesta manera, els tres grups d'exercici recordaven l'objecte familiar tant en el primer com en el segon test. Tot i així, en els animals assignats a les dues pautes de 3 setmanes d'exercici, tant la interrompuda com la que s'iniciava amb demora, es van revertir els dèficits del segon test de memòria (24 h), mentre que els animals que realitzaven la pauta de 7 setmanes d'exercici no es diferenciaven ni del grup Sham, ni del grup lesió sedentari. A més, cada pauta d'exercici va tenir diferents efectes sobre els canvis histològics produïts pel TBI. En concret, i d'acord amb la nostra hipòtesi, els animals que iniciaven l'exercici durant la fase sub-aguda (interrompuda i continuada) van beneficiar-se dels mecanismes neuroprotectors del tractament, mitjançant una disminució de la resposta neuroinflamatòria que es va acompanyar, en el cas del grup amb exercici interromput, d'una reducció de la pèrdua de neurones en l'hilus. En canvi, només els animals que realitzaven exercici en el moment de finalitzar l'experiment (grups amb exercici demorat i continuat), van mostrar un augment de neurones immadures en la capa granular del gir dentat. Tot i així, i en contra del que esperàvem, el grup continuat, que tenia una pauta d'exercici d'inici primerenc que es mantenia durant tot l'experiment, malgrat beneficiar-se de les dues grans vies d'acció de l'exercici, va ser l'únic que no va revertir el dèficit de memòria produït pel TBI.

4.3.1 Efectes del CCI

4.3.1.1 Canvis histològics produïts pel CCI

El model utilitzat en el nostre treball és un model de TBI focal, però també comporta dany cerebral en regions relativament allunyades de la cavitat de la lesió. El dany focal es produeix a conseqüència d'un impacte sobre la duramàter a nivell del lòbul parietal. Això es tradueix en la mort cel·lular massiva en la zona de l'impacte i en la formació d'una cavitat, així com la deformació morfològica d'estructures adjacents, principalment l'hipocamp dorsal.

Tal com ja hem vist en treballs previs (Jacotte-Simancas et al., 2015; Amorós-Aguilar, et al., 2015), en aquest treball hem constatat que el CCI provoca una cavitat considerable

de lesió en el còrtex parietal de l'hemisferi ipsilateral, amb una profunditat màxima mitjana de 1.13 mm. A més, a l'hemisferi ipsilateral, dona lloc a una reducció d'un 15.7% del volum global de l'hipocamp dorsal, i d'un 32.7% del volum de l'hilus del gir dentat, en comparació amb l'hemisferi contralateral. També produeix una pèrdua neuronal massiva a nivell de l'hilus (59.5%) i un increment de la reactivitat microglial a l'hipocamp dorsal (19.5%), amb presència de focus molt densos de micròglia activada, en comparació amb el grup sham. De fet, la totalitat dels animals del grup L-sed mostraven focus d'elevada densitat de cèl·lules Iba1+ de morfologia majoritàriament ameboide (micròglia activada). En molts casos, els focus incloïen també la presència de monòcits. Les anàlisis quantitatives indicaren un increment significatiu de la intensitat de gris, sense que hi hagués un augment significatiu de l'àrea amb marcatge. Això és coherent amb les observacions qualitatives, que ens mostraren que les àrees de reactivitat microglial no eren uniformes, sinó que la micròglia reactiva tendia a concentrar-se en regions específiques, envoltades per altres regions amb poca reactivitat.

D'acord amb l'anterior, tant la pèrdua neuronal i de volum de l'hilus, com la reactivitat microglial a l'hipocamp dorsal mostren un patró regional. Així, de les tres seccions analitzades, la més anterior (que, en la majoria d'animals es localitzava rostral a la cavitat de la lesió) mostrava només alteracions modestes. En canvi, les seccions ubicades en coordenades més posteriors, i coincidents amb part de la cavitat de la lesió, presentaven una afectació molt severa.

Finalment hem trobat que el nostre model de lesió redueix significativament la neurogènesi a la capa granular del gir dentat. Així, els animals lesionats sotmesos a una condició sedentària presentaven un menor nombre (45.8%) i densitat de cèl·lules DCX+ (34.9%) que el grup Sham en l'hemisferi ipsilateral a la lesió.

La reducció en el volum de l'hipocamp dorsal i l'hilus, i en el nombre de neurones madures en aquesta regió, observats 7 setmanes després de la lesió en el nostre experiment, ja eren presents a les 3 setmanes, tal com es va posar de manifest en un estudi previ en el nostre laboratori (Jacotte-Simancas et al, 2015). Ara bé, en aquest estudi previ també es va observar una certa disminució de neurones madures a la PRhc

de l'hemisferi ipsilateral, en comparació amb el contralateral. En canvi, en el present treball no hem trobat cap efecte del CCI sobre el número de neurones d'aquesta regió, força més allunyada del lloc d'impacte que l'hipocamp dorsal. Aquesta divergència entre els dos treballs podria ser deguda a petites diferències en la realització de la lesió. En aquest sentit, mentre que en el present experiment la coordenada anteroposterior mitjana d'inici de la cavitat de la lesió en el grup lesió sedentari era -2.83 respecte Bregma, en l'experiment de Jacotte-Simancas et al. (2015) era -1.9 respecte Bregma.

De manera concordant a les dades d'aquesta tesi, és un fet demostrat que el TBI, tant en models animals com en humans, provoca múltiples i complexos canvis inflamatoris que s'inicien poc després de la lesió i que es van modificant amb el temps. En general, el TBI a llarg termini produeix neuroinflamació crònica, pèrdua cel·lular i reducció de la neurogènesi en l'hemisferi ipsilateral a l'impacte (Glushakova et al., 2014; Acosta et al., 2013). L'increment de reactivitat microglial observat en aquest treball és congruent amb el que passa amb humans (Karve, Taylor i Crack, 2015) i també concorda amb les dades descrites en altres treballs amb el model CCI en rata i ratolí. Per exemple, Acosta i col.laboradors (Acosta et al., 2013) van trobar un increment de micròglia reactiva en diferents regions de substància blanca i grisa de l'hemisferi ipsilateral a la lesió, 8 setmanes després d'una lesió per CCI en rates. Tot i així, i a diferència del present treball, no es va trobar micròglia reactiva en el gir dentat de l'hipocamp. Aquest fet pot ser degut a dos motius. En primer lloc, la coordenada d'impacte respecte a Bregma en el treball d'Acosta et al. era força més anterior (+0.2 mm) que la del nostre treball (-4.5 mm). En segon lloc, el dany induït era menys sever (1 mm profunditat). Així mateix, Piao et al. (2013) també van trobar un increment del número de cèl·lules de micròglia reactiva 12 setmanes després d'un CCI en ratolins. En canvi, Turtzo et al., (2014) no van trobar neuroinflamació crònica (a les 8 setmanes post-TBI) en el còrtex circumdant a la lesió, en rates femelles amb una lesió per CCI més severa que la del nostre model (2.5 mm de profunditat). En concret, la reactivitat microglial associada a marcadors tant M1 com M2 ja havia tornat als nivells de les rates control a partir dels 5-7 dies post-TBI. Aquest fet pot ser degut a que només van analitzar àrees corticals circumdants a la cavitat de lesió, i a llarg termini podria ser que la reactivitat microglial es trobi en zones

pròximes però una mica més allunyades de la cavitat de lesió. De fet, Wang et al., (2013) seguien observant micròglia amb perfil M1 als 14 dies d'una lesió per CCI en ratolins en regions molt pròximes no circumdants a la cavitat de lesió, mentre que la micròglia amb perfil M2 havia tornat als nivells dels ratolins sham en aquest moment post-TBI.

Pel que fa la pèrdua cel·lular a l'hipocamp, els nostres resultats són concordants amb els d'altres treballs amb CCI, com el d'Acosta et al. (2013), que van trobar reducció del número de neurones madures en CA3, i el de Piao et al., (2013) que van observar una reducció en el gir dentat. En el nostre cas, la reducció s'ha estudiat en una altra regió de l'hipocamp, l'hilus. Pel que fa al número de neurones immadures, alguns treballs, tant del nostre (Jacotte-Simancas et al, 2015), com d'altres laboratoris (Acosta et al., 2013) no han trobat cap disminució en animals lesionats en comparació amb el sham, a diferència de les dades del present treball. Aquestes aparents discrepàncies podrien ser atribuïbles, entre altres factors, a diferències en la localització específica de la lesió i la seva severitat o al moment específic post-TBI en què s'analitza la neurogènesi.

4.3.1.2 Efectes sobre la memòria de reconeixement d'objectes

Els resultats del segon experiment han confirmat la persistència a llarg termini (53 dies) del dèficit en la MRO en animals sotmesos al mètode CCI per a la inducció de dany cerebral traumàtic quan el test de memòria té lloc 24 h després de l'adquisició. En canvi, en el test de retenció a les 3 h, només s'ha trobat un efecte marginal de la lesió, doncs, si bé el grup amb lesió i condició sedentària no va mostrar un clar record de l'objecte familiar, el seu índex de discriminació no diferia del dels altres grups. En altres experiments realitzats en el nostre laboratori hem trobat resultats divergents en quant al test de retenció a les 3 h. Així, en l'Experiment 1 d'aquesta tesi no es va trobar efecte de la lesió, mentre que en altres treballs previs sí es va observar afectació (Jacotte-Simancas et al., 2015; Lorón-Sánchez et al., 2016). Tal com hem comentat en la discussió de l'Experiment 1, aquestes discrepàncies entre experiments, podrien ser degudes a petites diferències en l'aplicació de la lesió, o a les manipulacions concretes de cada disseny experimental. Tot indica que el record a les 3 h és més difícil d'afectar,

i això el fa molt sensible a petites variacions en la localització i extensió de la lesió. En canvi la retenció a les 24 h s'ha vist sistemàticament afectada en tots els treballs previs, la qual cosa indica que l'execució en aquesta prova és enormement vulnerable al model de TBI utilitzat. Els resultats tornen a suggerir que tant la demanda cognitiva com el substrat neural subjacent dels dos test de retenció, seguint la metodologia específica dels nostres experiments, són diferents. En primer lloc, en aquest segon experiment no s'ha trobat cap correlació entre els dos test de memòria. En referència a les bases neurals, en la formació de la MRO a les 3 h, tot i que hi participen diferents àrees, sembla que la PRhc té un rol clau (Barker et al., 2007; Warburton & Brown, 2015). Alguns autors consideren que la PRhc seria especialment crítica per a la consolidació de la memòria quan hi ha una alta ambigüitat entre les característiques visuals dels objectes, és a dir, quan aquests són molt similars entre ells. En concret, estaria relacionada amb la separació de patrons, és a dir, permetria emmagatzemar en diferents records memòries que per la seva similitud podrien quedar solapades (Miranda et al., 2017). Com en el nostre treball els objectes utilitzats durant les diferents sessions són molt diferents entre ells (forma i color), sembla que el paper de la PRhc en el nostre model de MRO estaria relacionat amb al reconeixement de la familiaritat de l'objecte, i no contribuiria a la consolidació de la memòria a llarg termini d'aquest reconeixement. Això concorda amb el fet que en el present experiment, en el que no s'ha observat dany en la PRhc, la MRO mesurada a les 3 h només està afectada marginalment, però en canvi sí que hi ha un dèficit clar d'aquesta memòria en els experiments en que aquesta regió cerebral mostra una disminució del número de neurones (Jacotte-Simancas et al., 2015). En canvi, en la MRO mesurada a les 24 h, tot i que la PRhc podria també intervenir, pel seu paper en el reconeixement visual dels objectes, l'hipocamp sembla intervenir de forma més important, degut al component espacial del segon test. El fet que l'hipocamp estigui molt relacionat amb el segon test, concorda tant amb el present experiment com amb els treballs previs, ja que en tots sempre hi ha una greu afectació tant de l'hipocamp, com del test de memòria a les 24 h. D'acord amb això, com hem indicat abans, els resultats actuals mostren una reducció important de teixit a l'hipocamp ipsilateral, especialment a la regió del gir dentat, una pèrdua neuronal a l'hilus, una disminució de la neurogènesis en l'hemisferi

ipsilateral, i un augment de la neuroinflamació, amb focus que s'observen en tots els animals.

4.3.2 Conducta dels animals en la roda d'activitat

Considerant l'exercici dels animals durant les 3 primeres setmanes de cada grup, es va observar que els grups amb inici primerenc mostraven nivells semblants entre ells, i superiors als mostrats pel grup que iniciava l'exercici 4 setmanes després de la lesió. Donat que l'edat dels animals dels grups L-exe-sed i L-exe-exe a l'inici de l'exercici era de 8 setmanes, mentre que els animals del grup L-sed-exe iniciaven l'exercici a les 12 setmanes d'edat, aquestes dades són coherents amb la reducció del nivell d'exercici voluntari en funció de l'edat (Goh & Ladiges, 2015).

Per altra banda, considerant l'exercici total fet pels animals, en el grup L-exe-exe els valors mitjos diaris de distància recorreguda i de temps d'activitat en la roda van anar incrementant durant les 5 primeres setmanes, per disminuir durant les dues últimes, sent la setena setmana la coincident amb l'entrenament en la tasca de MRO. Tot i així, en les darreres setmanes de l'experiment els metres diaris recorreguts i el temps diari d'exercici encara mostraven nivells molt elevats, considerablement superiors als assolits pels altres dos grups (que només corrien durant tres setmanes). Aquest efecte ja s'ha observat en altres treballs en animals sans (Mondon et al., 1985).

4.3.3 Efectes de les diferents pautes d'exercici físic sobre la MRO i sobre les mesures histològiques

4.3.3.1 Exercici demorat

Els animals que iniciaren l'exercici físic amb una demora de 4 setmanes respecte a la lesió (grup L-sed-exe) van mostrar un nivell molt elevat d'execució en les dues proves de retenció de la MRO. En concret, mostraven record de l'objecte familiar a les 3 h, de manera molt similar al grup Sham. A les 24 h de la MRO, també presentaven un record equiparable al nivell del grup Sham i significativament superior al del grup lesió

sedentari. A més, es va trobar una correlació positiva entre el temps acumulat d'exercici i l'índex de discriminació a les 24 h ($r=0.56$). Això indica que l'exercici físic pot reduir els dèficits de memòria fins i tot quan s'inicia durant l'etapa crònica del TBI, molt després que s'hagin posat en marxa les cascades bioquímiques responsables del dany secundari.

Aquests resultats concorden amb els descrits per Piao et al. (2013) en ratolins, que van posar de manifest que l'exercici iniciat 5 setmanes després del CCI revertia el dèficit de MRO induït pel TBI. En canvi, no concorden amb els descrits per Chen et al. (2013), també en ratolins, que van trobar que només els animals que començaven l'exercici físic dos dies després de la lesió presentaven una reversió dels dèficits de MRO, però no així quan l'exercici començava als 9 dies. Tanmateix, hem de tenir present que en aquest darrer treball es va utilitzar un altre model de TBI, concretament un model d'impacte sobre el crani. És possible que el moment òptim d'inici de l'exercici físic després d'un TBI pugui variar en funció del tipus de dany produït (focal o difús, grau de severitat, regió precisa de l'impacte, etc.).

A nivell histològic, l'exercici iniciat amb una demora de 4 setmanes va revertir la disminució de cèl·lules DCX+ tant en número com en densitat, causada per la lesió en l'hemisferi ipsilateral. A més, en l'hemisferi contralateral a la lesió, i també en el conjunt dels dos hemisferis, va augmentar el número i la densitat de neurones immadures en comparació al grup Sham. Així mateix, en el grup d'exercici demorat, es va observar que quants més metres diaris i quan més temps diari corrien els animals en la roda d'activitat major era el número de cèl·lules DCX+ ($r=0.86$ i 0.89 , respectivament). Finalment, també es va observar una relació positiva entre el número de neurones immadures i l'índex de discriminació en la retenció a 24 h ($r=0.64$). Aquests resultats són consistents amb la noció que l'exercici contribueix a augmentar el número de neurones noves, i que les neurones immadures participen en la formació de la memòria, principalment en tasques hipocamp-dependents (Toda & Gage, 2018). Donat que aquesta última correlació no es dona amb l'índex de discriminació en la retenció 1, això reforça més la idea que els dos tests estan mesurant aspectes cognitius diferents.

L'exercici demorat també va atenuar la pèrdua de volum de l'hipocamp ipsilateral, comparat amb el contralateral. En canvi, no es va observar reducció de la pèrdua de neurones madures a l'hilus del gir dentat, ni va atenuar la reactivitat microglial a l'hipocamp. De fet, el percentatge d'animals d'aquest grup que presentaven focus de reactivitat microglial era molt elevat (85.70%), només lleugerament inferior al del grup sedentari i molt superior al dels grups interromput (L-exe-sed) i continuat (L-exe-exe). Aquests resultats no concorden amb la reducció de reactivitat microglial descrita per Piao et al. (2013) en ratolins després d'exercici demorat. Creiem que part d'aquesta discrepància podria ser atribuïble a diferències en la severitat del TBI, ja que Piao et al. van utilitzar una profunditat d'impacte de 2 mm en ratolins, la mateixa que nosaltres en rates. La profunditat és un dels paràmetres del CCI que més influeix en el grau de severitat de la lesió, per la qual cosa pensem que en ratolins aquesta profunditat de l'impacte comporta un nivell de severitat superior a l'induït en rates. També s'ha vist en l'experiment de Piao et al., que els ratolins que iniciaven l'exercici una setmana post-TBI, a diferència del que l'iniciaven a les 5 setmanes, no presentaven una millor execució durant l'aprenentatge que els ratolins TBI sedentaris. Aquest fet pot deure's a un inici primerenc de l'exercici i/o a la seva interrupció, ja que aquests animals passaven quasi un mes en condició sedentària abans d'iniciar les proves de memòria i les proves histològiques no es realitzaven fins gairebé 8 setmanes després de la interrupció de l'exercici. Així, doncs, els efectes observats també poden ser deguts, al menys en part, al llarg període d'interrupció de l'exercici, i no només al moment del seu inici (Piao et al., 2013).

En resum, l'inici de l'exercici a las 4 setmanes de la lesió va tenir efectes beneficiosos en la MRO avaluada a les 24 h, i sembla que aquests beneficis estaven mediat, al menys en part, per l'increment de neurogènesi en el gir dentat. En concret, a major quantitat d'exercici, les rates presentaven un major nivell de neurogènesi, i com més elevada era la neurogènesi a l'hemisferi lesionat, millor era l'execució de la memòria a les 24 h. Per tant, l'exercici sembla haver tingut efectes neuroreparadors. Tot i així, l'inici demorat de l'exercici sembla haver tingut pocs efectes neuroprotectors, ja que només va disminuir una mica la pèrdua de volum de l'hipocamp ipsilateral, però no va reduir la inflamació en l'hipocamp dorsal, ni la mort neuronal a l'hilus del gir dentat.

4.3.3.2 Exercici interromput

En un treball previ del nostre laboratori (Jacotte-Simancas et. al, 2015) es va trobar que tres setmanes d'exercici físic voluntari iniciat 4 dies després de la lesió revertia el dèficit de memòria en un test a 24 h, quan la tasca de MRO s'administrava 3 setmanes després de la lesió en un moment en què encara es mantenia el tractament d'exercici. Aquest mateix tractament va donar lloc a un increment de la neurogènesi en el gir dentat, i va atenuar la pèrdua de neurones madures en l'hilus del gir dentat i, en menor mesura, en la PRhc, una regió menys afectada per la lesió. Un dels objectius del nostre treball era determinar si els esmentats efectes beneficiosos de l'exercici iniciat 4 dies després del TBI i mantingut durant 3 setmanes disminuïrien o s'esvaïrien del tot després d'interrompre el tractament i d'aplicar la tasca de MRO 4 setmanes després de la finalització de l'exercici. En altres paraules, volíem saber si els efectes beneficiosos de l'exercici físic sobre els dèficits de memòria es mantindrien un cop finalitzat aquest tractament, o l'exercici s'hauria de mantenir de forma crònica per mantenir els seus efectes. Els resultats que hem trobat indiquen que quatre setmanes després de la interrupció de l'exercici físic encara s'observa un efecte beneficiós sobre la memòria i sobre alguns índexs de neuroprotecció.

Així, els animals del grup L-exe-sed van mostrar record de l'objecte familiar a les sessions de retenció a les 3 h i a les 24 h, un índex de discriminació similar al de les rates del grup Sham i superior al dels animals lesionats sedentaris en el segon test de retenció. A més, el grup amb exercici interromput presentava una menor pèrdua del número, i en menor mesura de la densitat, de neurones madures a l'hilus que el grup L-sed, una atenuació de la pèrdua de volum de l'hipocamp ipsilateral, així com una reducció de la reactivitat microglial. Concretament, la proporció d'animals d'aquest grup amb presència de focus de micròglia reactiva era d'un 57%, en comparació al 100% en el grup L-sed.

La interrupció de l'exercici va donar lloc, no obstant, a la pèrdua de l'increment de la neurogènesi. D'aquesta manera, el grup L-exe-sed presentava un número i densitat de neurones immadures semblant al del grup L-sed en els dos hemisferis, i inferior al del grup Sham en l'hemisferi ipsilateral. Això indica que l'increment de la neurogènesi que presumiblement s'hauria produït com a conseqüència de les tres setmanes d'exercici

físic (d'acord amb els resultats de l'estudi previ de Jacotte-Simancas et al, 2015), ja no estava present 4 setmanes després de la finalització d'aquest tractament. En animals sans s'ha descrit fins i tot que la interrupció de l'exercici físic pot reduir la neurogènesi per sota dels nivells dels animals sedentaris en ratolins sans, a partir de les 5 setmanes d'interrupció (Nishijima et al., 2017). Nosaltres no hem observat un efecte tant acusat, ja sigui perquè el temps des de la finalització de l'exercici fins al sacrifici ha sigut més limitat, per diferències en l'edat d'inici de l'exercici i l'espècie animal utilitzada, o pel fet que en el nostre experiment els animals tenien dany cerebral.

Malgrat els baixos nivells de neurogènesi en el moment de les proves de memòria, aquest tractament amb exercici interromput va ser capaç de revertir els dèficits de memòria en el test a 24 h, tal com s'ha indicat abans. Tot fa pensar que aquests efectes beneficiosos serien atribuïbles a la neuroprotecció induïda per l'exercici iniciat pocs dies després de la lesió, que hauria pogut atenuar algunes de les cascades que donen lloc al dany secundari i que s'hauria evidenciat en una menor reactivitat microglial a l'hipocamp dorsal i una menor pèrdua neuronal a l'hilus. A més, no podem descartar que les neurones noves generades durant el període d'exercici, i que en el moment del sacrifici ja serien neurones madures i per tant detectables mitjançant el marcador DCX, hagin pogut contribuir també a la millora de la memòria. En experiments futurs s'haurà de determinar si els efectes beneficiosos de l'exercici primerenc es mantenen durant terminis encara més llargs, o si, en contraposició, desapareixen completament en la línia dels resultats trobats per Piao et al. (2013) en ratolins amb un nivell d'afectació més severa, tal com hem comentat abans.

Alguns treballs han observat que l'exercici iniciat poc després de la lesió pot tenir un efecte deteriorant, ja que la lesió promou una resposta neuroreparadora innata, mitjançant l'augment de molècules associades a la plasticitat, i l'exercici immediat disminueix aquesta resposta neuroreparadora endògena (Griesbach, Gomez-Pinilla i Hovda, 2004). No obstant, en el nostre laboratori hem observat repetidament un efecte beneficiós de l'exercici quan aquest s'inicia 4 dies després de la lesió. Ho havíem observat en el treball de Jacotte-Simancas et al., (2015), i l'hem tornat a observar en el present experiment (grups L-exe-sed i L-exe-exe). Sembla ser que aquestes discrepàncies respecte al moment en què convé iniciar l'exercici físic després d'un TBI

estarien relacionades, almenys en part, amb la severitat de la lesió. Tal com van veure Griesbach et al., com major és el grau de severitat de la lesió, major temps ha de transcórrer per iniciar l'exercici físic per tal que aquest tingui efectes beneficiosos (Griesbach, Gomez-Pinilla i Hovda, 2007). Sembla haver-hi una finestra temporal concreta perquè els efectes terapèutics de l'exercici tinguin un efecte positiu en la regulació a l'alça de molècules associades a plasticitat. És possible, doncs, que iniciar l'exercici 5 dies després de la lesió pugui resultar contraproduent si la severitat del TBI és alta, i en canvi, pot tenir efectes beneficiosos si la severitat és moderada. I, a la inversa, quan la severitat és moderada l'inici de l'exercici poc després de la lesió pot maximitzar l'efecte antiinflamatori d'aquest.

4.3.3.3 Exercici continuat

La nostra hipòtesi de partida era que l'exercici iniciat poc després de la lesió hauria de reduir les deficiències de memòria principalment induint efectes neuroprotectors, mentre que l'exercici iniciat amb demora exerciria efectes beneficiosos principalment a través de canvis plàstics i incrementant la neurogènesi. En conseqüència, seria d'esperar que iniciar l'exercici pocs dies després de la lesió i mantenir-lo a llarg termini, sense interrupció, hauria de constituir la millor pauta, per la combinació d'efectes neuroprotectors i neuroreparadors. Tanmateix, i contràriament a la nostra hipòtesi, l'execució dels animals del grup L-exe-exe en el segon test de retenció, no va ser significativament superior a la del grup L-sed, encara que tampoc no va ser significativament inferior a la del grup Sham. Es a dir, els animals del grup amb exercici continuat mostraven un índex de discriminació significativament superior a zero, no únicament en la sessió de retenció 1, sinó també en la 2, indicant que hi havia record de l'objecte familiar. Per tant, el tractament d'exercici continuat va tenir efectes beneficiosos, ja que va reduir el dèficit de memòria, però no els va arribar a revertir, a diferència de les altres dues pautes d'exercici.

Un factor que pot haver contribuït a reduir l'efecte beneficiós d'aquesta pauta d'exercici és la elevada quantitat d'exercici que presentaven aquests animals. En aquest grup els valors diaris de distància recorreguda i de temps d'activitat en la roda

van anar incrementant durant les primeres 5 setmanes, per disminuir lleugerament durant les dues últimes. Tot i així, en les darreres setmanes de l'experiment els metres diaris recorreguts i el temps diari d'exercici eren considerablement superiors als assolits pels altres dos grups (que només corrien durant tres setmanes). En altres treballs s'ha vist que els animals sans amb alts nivells d'exercici són els que mostren una pitjor execució en proves de MRO (Garcia-Capdevila et al., 2009). També s'ha vist que els animals seleccionats genèticament per tenir alts nivells d'exercici espontani mostren una pitjor execució en tasques de memòria (Rhodes et al., 2003).

Reforçant aquesta idea, només en aquest grup les variables distància i temps d'exercici presentaven correlacions negatives amb l'índex de discriminació i l'exploració total en el test de retenció a 3 h. Tot i així, la pitjor execució no sembla ser deguda a una menor exploració, ja que no es van trobar correlacions significatives entre l'exploració dels objectes durant les diferents sessions de la MRO i els índexs de discriminació 1 i 2.

A nivell histològic, l'exercici continuat va donar lloc a alguns efectes neuroprotectors i a un increment de la neurogènesi. Els efectes neuroprotectors es van manifestar, principalment, mitjançant una atenuació de la reactivitat microglial. La proporció d'animals d'aquest grup que presentava focus de micròglia reactiva era d'un 57% (la mateixa que en el grup L-exe-sed) i sensiblement inferior a la del grup L-sed (100%). D'altra banda, les mesures de reactivitat d'Iba1 indicaren una clara atenuació, amb valors que no diferien significativament del grup Sham, encara que tampoc del grup L-sed. Val a dir que en aquest grup es va trobar una correlació positiva entre el temps d'exercici durant les tres últimes setmanes (però no durant les primeres setmanes) i la reactivitat microglial. És a dir, tot i que l'exercici continuat reduïa la reactivitat microglial, aquest efecte era menor en els animals que passaven més temps al dia a la roda d'activitat durant els darrers dies de l'experiment.

A diferència del grup amb exercici interromput, en el grup d'exercici continuat no es va observar atenuació de la mort de neurones madures a l'hilus, a excepció d'un efecte marginal en la secció més anterior. És probable que durant les primeres setmanes l'exercici hagi pogut tenir efectes neuroprotectors també en el grup continuat, però els alts nivells d'exercici durant les últimes setmanes podrien haver esvaït aquest efecte,

en la línia del que sembla haver passat amb la neuroinflamació. És a dir, una part de les neurones que haurien aconseguit sobreviure durant les primeres setmanes post-TBI gràcies al tractament amb exercici, podrien haver mort posteriorment degut a un excés d'exercici.

Pel que fa a la neuroreparació, les dades indiquen que aquest grup va presentar nivells molt elevats de neurogènesi, encara que no tant com els observats en el grup demorat. Així, igual que aquest, el grup L-exe-exe mostrava un número i densitat de cèl·lules DCX+ en l'hemisferi contralateral superior als altres dos grups lesionats i al grup Sham. En canvi, en l'hemisferi ipsilateral, tot i que mostrava una densitat de cèl·lules DCX+ superior que la del grup lesió sedentari, el número d'aquestes no diferia significativament de cap altre grup. Així mateix, per al conjunt dels dos hemisferis, el grup continuat presentava més neurogènesi, en número i densitat, que els grups lesió sedentari i exercici interromput, però no que el Sham. A diferència del que es va observar en el grup demorat, en aquest grup no es va trobar cap correlació positiva entre els nivells d'exercici (distància i temps) i el número de cèl·lules DCX+. De fet, fins i tot presentava una correlació negativa ($r=-0.51$) (amb tendència a la significació) entre el temps en la roda d'activitat durant les últimes setmanes i el nivell de neurogènesi. Aquestes dades concorden amb resultats obtinguts en altres laboratoris. En rates seleccionades genèticament per mostrar alts nivells d'exercici espontani s'ha vist que l'increment de la neurogènesi induït per l'exercici s'atenua quan aquest es manté durant períodes llargs de temps (Naylor et al., 2005). D'altra banda, Nguemeni et al., (2018) van mostrar una relació negativa entre les distàncies recorregudes i la supervivència de noves neurones en rates sanes amb accés crònic a roda d'activitat. En canvi, els animals que corrien menys pel fet de tenir limitat l'accés a la roda d'activitat presentaven nivells superiors de neurogènesi. És a dir, a llarg termini nivells moderats d'exercici semblen incrementar més la neurogènesi que nivells alts.

Una conseqüència dels nivells excessius d'exercici, que podria explicar que els efectes beneficiosos del tractament hagin estat menors als esperats, és el menor increment de pes corporal observat en el grup amb exercici continuat, en comparació amb els altres grups. No obstant, aquest menor increment del pes corporal no va impedir que els animals mostressin un bon record en la primera sessió de retenció, malgrat observar-

se una correlació positiva entre l'increment de pes corporal i l'índex de discriminació en aquesta sessió. Per altra banda, tampoc va impedir que l'exercici tingués un efecte beneficiós sobre la MRO en el test a 24h. Tot i que la reducció del dèficit en aquesta sessió va ser una mica inferior a la dels altres grups tractats amb exercici, no s'ha trobat relació entre l'increment de pes i l'índex de discriminació 2. Encara que està dada no s'hagi especificat en l'apartat de resultats, tampoc es va trobar cap correlació entre l'increment de pes i la neurogènesi, que és una altra variable en què s'ha observat un menor increment de l'esperat. No sembla, per tant, que el menor increment en el pes corporal dels animals del grup amb exercici continuat pugui haver contribuït de forma substancial a reduir l'efecte beneficiós de l'exercici.

4.3.4 Relació entre els nivells d'exercici físic i la magnitud dels seus efectes beneficiosos

Donat que havíem observat diferències en la quantitat diària d'exercici dels animals dels tres grups, i que aquestes diferències semblen estar relacionades amb la magnitud dels efectes beneficiosos de l'exercici sobre la memòria (Garcia-Capdevila et al., 2009), vam distribuir els animals dels tres grups d'exercici en tres nivells (baix, moderat i alt) diferents en funció d'una banda, del temps acumulat al llarg de tot el període d'exercici i de l'altra, del temps diari d'exercici durant les dues darreres setmanes de l'experiment, per examinar si els efectes de l'exercici variaven en funció d'aquests nivells.

Pel que fa la distribució segons el temps total acumulat en roda, els animals classificats dins la categoria de "nivell mig" d'exercici tendien a presentar un millor índex de retenció a les 24 h ($p= 0.056$) que els animals de les categories "nivell baix" i "nivell alt". Això és concordant amb els resultats d'altres treballs, tant en animals sans (Garcia-Capdevila et al., 2009) com amb dany cerebral isquèmic (Shih, Yang & Wang, 2013), que han observat que els nivells moderats d'exercici són més efectius per millorar la memòria que els nivells alts.

Quan es van classificar els animals en funció del temps en roda durant les dues últimes setmanes de l'experiment, es va observar que els animals de nivell moderat

presentaven més neurogènesi que els de les altres dues categories (“nivell baix” i “nivell alt”). Aquestes dades suggereixen que la relació entre temps diari d’exercici i neurogènesi és dosi-dependent, amb forma d’U invertida, sent el nivell òptim el moderat.

Cal tenir en compte que en les dues classificacions realitzades, la majoria d’animals del grup amb exercici continuat se situaven en la categoria de “nivell alt”. Aquestes dades podrien explicar perquè els nivells de memòria i de neurogènesi en aquest grup són més modestos del que s’hauria d’esperar. Això recolzaria la idea que un nivell excessiu d’exercici, com l’observat en el grup continuat, podria explicar el menor efecte del tractament sobre la MRO.

En resum, les diferents pautes d’exercici físic van reduir els dèficits de MRO causats pel TBI en la prova de retenció a 24 h, però aquest efecte va ser més marcat en els animals sotmesos a tres setmanes d’exercici, ja fos iniciat 4 dies després de la cirurgia i interromput 4 setmanes abans de la finalització de l’experiment (grup L-exe-sed), o iniciat amb una demora de 4 setmanes respecte a la lesió (grup L-sed-exe). En tots dos grups es van revertir els dèficits de memòria, ja que aquests animals presentaven un índex de discriminació similar als animals del grup Sham, i significativament superior als animals amb lesió mantinguts sempre en condició sedentària (grup L-sed).

En canvi, i en contra del que era d’esperar, el grup que va realitzar exercici físic de manera continuada durant 7 setmanes, des de 4 dies post-TBI fins al moment del sacrifici, va mostrar una execució més modesta que els altres dos grups d’exercici en la prova de retenció a 24 h.

A nivell histològic, els dos grups de tractament amb inici primerenc (L-exe-sed i L-exe-exe), mostraren efectes neuroprotectors. En el grup amb exercici continuat només es van observar aquests efectes en relació a la neuroinflamació, però no en el número de neurones a hilus. En canvi, en el grup interromput l’efecte neuroprotector es va evidenciar tant en una reducció de la mort de neurones madures a l’hilus, com en una reducció de la reactivitat microglial.

Pel que fa la neurogènesi, si bé en els dos grups que realitzaven exercici al final de l'experiment es trobava incrementada, aquest augment era més acusat en el grup demorat.

DISCUSSIÓ GENERAL

5. Discussió general

Els resultats d'aquest treball mostren que els dèficits de memòria produïts pel TBI tendeixen a mantenir-se en el temps, en cas que no s'administri cap tipus de tractament. D'altra banda, posen de manifest que l'exercici físic pot ser un tractament eficaç per reduir aquests dèficits, especialment quan s'administra en nivells moderats. Resulta prometedor que l'exercici hagi sigut capaç de reduir la neuroinflamació i la mort neuronal, i d'incrementar la neurogènesi, efectes que varien en funció de la pauta d'exercici, i que podrien contribuir a millorar altres funcions cognitives, a més de la MRO avaluada en aquest treball.

Un resultat sorprenent del segon experiment és que la pauta de llarga durada ha sigut la menys eficaç per reduir els dèficits de memòria. Vol dir això que no és convenient que els pacients portin a terme exercici de manera continuada? Pensem que aquesta seria una interpretació inadequada, ja que hem observat que aquesta pauta d'exercici és l'única que va mostrar efectes positius sobre els dos grans mecanismes d'acció esperats: neuroprotectors i neuroreparadors. A més, encara que el nombre d'estudis sistemàtics i ben controlats metodològicament realitzats amb pacients amb TBI és escàs, en general les pautes de llarga durada acostumen a ser més efectives que les curtes o puntuals (Vanderbeken & Kerckhofs, 2017). Per tant, creiem que el fet que la pauta d'exercici continuat no hagi estat la més beneficiosa estaria relacionat amb un factor que probablement sigui clau: la quantitat o intensitat diàries d'exercici. Hem vist que el temps diari d'exercici modulava els efectes cognitius (i també alguns efectes histològics) del tractament. Concretament, els animals que dedicaven un temps mitjà d'exercici diari moderat eren els que mostraven una millor recuperació cognitiva, i la majoria d'aquests animals eren dels grups demorat o interromput. En canvi, la major part dels animals amb exercici continuat mostraven nivells alts d'exercici.

Què passa quan el tractament amb exercici físic s'interromp? En el nostre treball, la pauta interrompuda també ha resultat eficaç per reduir els dèficits de memòria, principalment atenuant la neuroinflamació i la mort neuronal. No obstant, hi ha mecanismes neuroreparadors iniciats durant el període d'exercici que suposadament s'han esvaït. Novament, això reforçaria la recomanació que els pacient amb TBI que presenten dèficits cognitius segueixin fent exercici físic de manera crònica, o almenys

durant un temps relativament llarg més enllà de la recuperació total de les funcions cognitives.

D'altra banda, el fet d'iniciar l'exercici durant la fase crònica del TBI també ha mostrat ser beneficiós per a la recuperació de la memòria, principalment a través de canvis neuroreparadors (increment de la neurogènesi); en canvi, no va ser capaç d'atenuar la inflamació ni la pèrdua cel·lular en l'hipocamp. Això suggereix que durant els períodes en què es practica exercici físic es poden reduir les deficiències cognitives a través de mecanismes neuroplàstics, fins i tot quan aquest no s'ha iniciat en el període subagut del TBI. Això resulta esperançador per a aquells pacients que, per diverses circumstàncies (per exemple, politraumatismes) no han pogut iniciar el tractament més aviat. En els nostres animals hem vist que el nivell de recuperació cognitiva era directament proporcional als nivells de neurogènesi en l'hemisferi lesionat. Cal remarcar que no hi ha consens sobre l'existència de neurogènesi adulta en humans (Sorrells et al., 2018; Boldrini et al., 2018), però, en tot cas, no es posa en dubte que en aquests l'exercici també genera canvis plàstics en el cervell, principalment a l'hipocamp i a l'escorça prefrontal, estructures molt relacionades amb les funcions cognitives i especialment vulnerables al TBI (Voss, et al., 2013; Vivar & van Praag, 2017).

El present treball també presenta certes limitacions. En primer lloc, el tipus de tasca utilitzada no permet avaluar l'execució dels animals de manera gradual i, per tant, no permet establir diferents nivells en la millora dels dèficits. Tot i amb això, l'ús de la MRO presenta també avantatges, ja que, en mesurar una conducta espontània com és l'exploració, no requereix pre-entrenament, ni estimulació aversiva (xocs elèctrics o natació forçada), ni privació de menjar (que podria constituir una variable interferent amb l'exercici físic, tenint en compte els seus requeriments metabòlics). A més, és un bon model de memòria de tipus episòdic equiparable a les tasques utilitzades en humans (Winters, Saksida & Bussey, 2008). Així mateix, la memòria de reconeixement freqüentment està afectada en el dany cerebral adquirit i en les malalties neurodegeneratives (Russell, et al., 2011; Wammes, Good, & Fernandes, 2017; Gold & Budson, 2008).

Una altra limitació del nostre treball és que els animals estaven aïllats en gàbies individuals. L'aïllament era necessari per poder controlar les distàncies i temps d'exercici de cada animal i per evitar que alguns animals restringissin l'accés d'altres a la roda. Sabem que l'aïllament social augmenta l'estrès i pot tenir un efecte negatiu sobre la neurogenèsi (Leigh Leasure & Decker, 2009). Tot i així, en el nostre laboratori hem observat que els animals amb TBI estabulats en gàbies individuals mostren un important increment de neurogènesi després de 10 dies d'exercici (Jacotte-Simancas et al 2015). Sens dubte, l'entorn dels pacients és molt més ric que el de les rates de laboratori; per la mateixa raó, hi ha una gran diversitat de factors que dificulten la interpretació dels resultats, com ara les diferències en funció de l'entorn familiar i social, de si hi ha altres trastorns associats, etc.

Una tercera limitació de la intervenció realitzada en el present treball és que aquesta consta d'un únic tractament, mentre que a la pràctica clínica és habitual l'ús d'intervencions multifactorials (Morris et al., 2016), que poden potenciar-se o, ben al contrari, interferir entre elles. Així, per exemple, en un treball previ amb rates vam observar una interacció negativa entre l'exercici físic i l'administració de citicolina, mentre que cada un dels dos tractaments per separat tenia efectes positius (Jacotte-Simancas et al., 2015). En el present treball hem preferit centrar-nos en un únic tractament, però en el futur sens dubte tornarem a estudiar els efectes de la combinació de diferents tractaments amb l'exercici físic.

Un altre aspecte a tenir en compte és el model de TBI utilitzat en el nostre experiment. El CCI, igual que qualsevol dels altres models animals de TBI, no és capaç de reproduir totes les alteracions que es donen en la pràctica clínica, tot i que sí en reproduïx una bona part (O'Connor, 2011).

Finalment no podem oblidar que el nostre treball s'ha realitzat en rates mascle i que la seva edat en el moment de la cirurgia corresponia a l'adolescència tardana. Edat i gènere són, sens dubte, dos factors que poden influir tant en les seqüeles del TBI com en la capacitat dels tractaments per reduir-les. Vam escollir rates mascles adolescents perquè, en població jove, el TBI constitueix la principal causa de dany cerebral adquirit. En aquesta població la prevalença de TBI és superior en nois que en noies (Thurman, 2016). Tanmateix, el TBI es pot donar a qualsevol edat i, de fet, en persones grans la

seva prevalença és superior en dones (Thurman, 2016; Majdan et al., 2016). Coneixent aquestes limitacions, en el nostre laboratori hem començat a estudiar els efectes del TBI i de l'exercici físic també en rates femella.

Els treballs amb humans no estan tampoc exempts de limitacions. Així, els estudis realitzats fins ara acostumen a incloure pacients de diferents perfils de lesió en quant a severitat i tipus, així com d'edats molt diverses (Morris et al., 2016). A més, sovint els tests cognitius utilitzats no són prou sensibles i específics per detectar canvis després de la intervenció (Morris et al., 2016). Cal assenyalar també altres limitacions en els estudis en humans, com la diversitat en l'entorn familiar i social dels pacients, la presència de comorbiditat, la polimediació, l'ús d'altres tractaments rehabilitadors, etc. A més, l'estudi de la "dosi" adequada d'exercici en humans ha de tenir present també que el TBI pot ocasionar alteracions en el sistema nerviós autònom que dificulten l'ús de les mesures habituals d'intensitat de l'exercici basades en la taxa cardíaca, així com alteracions en la percepció de l'esforç realitzat (Morris et al., 2018).

Així doncs, els models animals tenen l'avantatge de poder fer estudis més controlats i resulten molt útils per examinar els mecanismes neurals subjacents tant a la fisiopatologia del TBI com a l'efecte dels tractaments. D'altra banda, els estudis amb humans són indispensables per poder acabar de definir quines són les pautes específiques d'exercici més apropiades per a cada tipus de pacient. Per tot plegat, pensem que és necessari combinar la recerca animal amb estudis amb humans per tal de poder arribar a "receptar" dosis i períodes d'exercici concrets als pacients amb TBI. Ara per ara, malgrat que hi queda molt per investigar, creiem que l'exercici físic hauria de constituir una intervenció crònica, incorporada a la vida quotidiana dels pacients i, en la mesura que fos possible, iniciada durant el període subagut del TBI. D'aquesta manera es podrien aprofitar al màxim les accions neuroprotectores i neuroplàstiques del tractament.

CONCLUSIONS

6. Conclusions

- 1) El model de TBI d'impacte cortical controlat induïx dèficits de memòria de reconeixement d'objectes quan la retenció s'avalua 24 h després de l'adquisició, sense que s'afecti la reactivitat emocional. Aquests dèficits es mantenen a llarg termini (almenys fins a 7 setmanes després de la lesió).
- 2) Totes les pautes temporals d'exercici físic avaluades redueixen el dèficit de memòria induït per TBI.
- 3) L'exercici físic interromput (iniciat durant la fase sub-aguda i finalitzat 4 setmanes abans de les proves de memòria) reverteix el dèficit de memòria, i té efectes neuroprotectors, reduint la pèrdua de teixit, la mort de neurones madures, i la resposta inflamatòria a l'hipocamp dorsal.
- 4) L'exercici físic demorat (iniciat durant la fase crònica) reverteix el dèficit de memòria, i té efectes neuroreparadors, mitjançant un augment de la neurogènesi en el gir dentat de l'hipocamp dels dos hemisferis. La neurogènesi de l'hemisferi ipsilateral correlaciona positivament amb la memòria a les 24 h.
- 5) L'exercici continuat (iniciat durant la fase sub-aguda i mantingut al llarg de l'experiment) redueix el dèficit de memòria en menor mesura que les altres dues pautes d'exercici, tot i que genera tant canvis neuroprotectors, que es manifesten amb una reducció de la neuroinflamació a l'hipocamp dorsal, com canvis neuroreparadors, mitjançant un augment de la neurogènesi en el gir dentat.
- 6) Sembla haver-hi una relació entre el nivell d'exercici i la millora de la memòria, essent els nivells moderats més eficaços que els nivells baixos i alts, independentment de la pauta temporal aplicada.
- 7) El menor efecte sobre el dèficit de memòria de l'exercici continuat podria estar relacionat amb nivells d'exercici voluntari molt elevats en els animals assignats a aquesta pauta, i no amb el fet que l'exercici crònic pugui ser menys efectiu, ja que, a diferència de les altres pautes d'exercici, aquesta té efectes tant neuroprotectors com neuroreparadors.

BIBLIOGRAFIA

7. Bibliografia

- Åberg, N. D., Brywe, K. G., & Isgaard, J. (2006). Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *The Scientific World Journal*, 6, 53-80. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.22>
- Abreu, P., Vitzel, K. F., Monteiro, I. C. C. R., Lima, T. I., Queiroz, A. N., Leal-Cardoso, J. H., ... & Ceccatto, V. M. (2016). Effects of endurance training on reduction of plasma glucose during high intensity constant and incremental speed tests in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(11), e5226. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2016522>.
- Acosta, S. A., Tajiri, N., Shinozuka, K., Ishikawa, H., Grimmig, B., Diamond, D. M., ... Borlongan, C. V. (2013). Long-term upregulation of inflammation and suppression of cell proliferation in the brain of adult rats exposed to traumatic brain injury using the controlled cortical impact model. *PloS One*, 8(1), e53376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053376>
- Adelson, P. D., Fellows-Mayle, W., Kochanek, P. M., & Dixon, C. E. (2013). Morris water maze function and histologic characterization of two age-at-injury experimental models of controlled cortical impact in the immature rat. *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 29(1), 43–53. <https://doi.org/10.1007/s00381-012-1932-4>
- Adlard, P. A., Perreau, V. M., Engesser-Cesar, C., & Cotman, C. W. (2004). The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. *Neuroscience Letters*, 363(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.03.058>
- Ajao, D. O., Pop, V., Kamper, J. E., Adami, A., Rudobek, E., Huang, L., ... Badaut, J. (2012). Traumatic Brain Injury in Young Rats Leads to Progressive Behavioral Deficits Coincident with Altered Tissue Properties in Adulthood. *Journal of Neurotrauma*, 29(11), 2060–2074. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.1883>
- Akkerman, S., Blokland, A., Reneerkens, O., van Goethem, N. P., Bollen, E., Gijsselaers, H. J. M., ... Prickaerts, J. (2012). Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behavioural Brain Research*, 232(2), 335–347. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.022>
- Alkadhi, K. A. (2018). Exercise as a positive modulator of brain function. *Molecular Neurobiology*, 55(4), 3112–3130. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0516-4>
- Alomari, M. A., Khabour, O. F., Alzoubi, K. H., & Alzubi, M. A. (2013). Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. *Behavioural Brain Research*, 247, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.007>
- Amonette, W. E., & Mossberg, K. A. (2013). Ventilatory anaerobic thresholds of individuals recovering from traumatic brain injury compared with noninjured controls. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 28(5), E13-20. <https://doi.org/10.1097/HTR.0b013e31826463a1>
- Amorós-Aguilar, L., Portell-Cortés, I., Costa-Miserachs, D., Torras-Garcia, M., & Coll-Andreu, M. (2015). Traumatic brain injury in late adolescent rats: Effects on adulthood memory and anxiety. *Behavioral Neuroscience*, 129(2), 149–159. <https://doi.org/10.1037/bne0000046>

- Appelberg, K. S., Hovda, D. A., & Prins, M. L. (2009). The effects of a ketogenic diet on behavioral outcome after controlled cortical impact injury in the juvenile and adult rat. *Journal of Neurotrauma*, *26*(4), 497–506. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0664>
- Archer, T., Ricci, S., Massoni, F., Ricci, L., & Rapp-Ricciardi, M. (2016). Cognitive benefits of exercise intervention. *La Clinica Terapeutica*, *167*(6), e180–e185. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28051833>
- Babaei, P., Damirchi, A., Mehdipoor, M., & Tehrani, B. S. (2014). Long term habitual exercise is associated with lower resting level of serum BDNF. *Neuroscience Letters*, *566*, 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.02.011>
- Baek, S. S. (2016). Role of exercise on the brain. *Journal of Exercise Rehabilitation*, *12*(5), 380–385. <https://doi.org/10.12965/jer.1632808.404>
- Bajwa, N. M., Kesavan, C., & Mohan, S. (2018). Long-term consequences of Traumatic brain injury in bone metabolism. *Frontiers in Neurology*, *9*, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00115>
- Baker, L. D., Frank, L. L., Foster-Schubert, K., Green, P. S., Wilkinson, C. W., McTiernan, A., ... Craft, S. (2010). Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment. *Archives of Neurology*, *67*(1), 71–79. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.307>
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., & Bermudez-Rattoni, F. (2015). Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behavioural Brain Research*, *285*, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.049>
- Barker, G. R. I., Bird, F., Alexander, V., & Warburton, E. C. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *Journal of Neuroscience*, *27*(11), 2948–2957. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5289-06.2007>
- Bartko, S. J., Winters, B. D., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2007). Perirhinal cortex resolves feature ambiguity in configural object recognition and perceptual oddity tasks. *Learning and Memory*, *14*(12), 821–832. <https://doi.org/10.1101/lm.749207>
- Berchtold, N. C., Castello, N., & Cotman, C. W. (2010). Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*, *167*(3), 588–597. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.050>
- Berchtold, N. C., Chinn, G., Chou, M., Kesslak, J. P., & Cotman, C. W. (2005). Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience*, *133*(3), 853–861. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.026>
- Biegon, A., Fry, P. A., Paden, C. M., Alexandrovich, A., Tsenter, J., & Shohami, E. (2004). Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(14), 5117–5122. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305741101>
- Boake, C., McCauley, S. R., Levin, H. S., Pedroza, C., Contant, C. F., Song, J. X., ... & Diaz-Marchan, P. J. (2005). Diagnostic criteria for postconcussional syndrome after mild to moderate traumatic brain injury. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, *17*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1176/jnp.17.3.350>

- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., ... Mann, J. J. (2018). Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. *Cell Stem Cell*, 22(4), 589–599.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015>
- Bolz, L., Heigle, S., & Bischofberger, J. (2015). Running improves pattern separation during novel object recognition. *Brain Plasticity*, 1(1), 129–141. <https://doi.org/10.3233/BPL-150010>
- Bouilleret, V., Cardamone, L., Liu, Y. R., Fang, K., Myers, D. E., & O'Brien, T. J. (2009). Progressive brain changes on serial manganese-enhanced MRI following traumatic brain injury in the rat. *Journal of neurotrauma*, 26(11), 1999-2013. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.0943>
- Bramlett, H. M., & Dietrich, W. D. (2002). Quantitative structural changes in white and gray matter 1 year following traumatic brain injury in rats. *Acta Neuropathologica*, 103(6), 607–614. <https://doi.org/10.1007/s00401-001-0510-8>
- Brown, J., Cooper-Kuhn, C. M., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F. H., & Kuhn, H. G. (2003). Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 17(10), 2042–2046. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02647.x>
- Brown, M. W., Barker, G. R. I., Aggleton, J. P., & Warburton, E. C. (2012). What pharmacological interventions indicate concerning the role of the perirhinal cortex in recognition memory. *Neuropsychologia*, 50(13), 3122–3140. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2012.07.034>
- Budde, M. D., Janes, L., Gold, E., Turtzo, L. C., & Frank, J. A. (2011). The contribution of gliosis to diffusion tensor anisotropy and tractography following traumatic brain injury: validation in the rat using Fourier analysis of stained tissue sections. *Brain : A Journal of Neurology*, 134(Pt 8), 2248–2260. <https://doi.org/10.1093/brain/awr161>
- Budinich, C. S., Tucker, L. B., Lowe, D., Rosenberger, J. G., & McCabe, J. T. (2013). Short and long-term motor and behavioral effects of diazoxide and dimethyl sulfoxide administration in the mouse after traumatic brain injury. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 108, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.04.001>
- Campbell, J. E., Rakhshani, N., Fediuc, S., Bruni, S., & Riddell, M. C. (2009). Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training. *Journal of applied physiology*, 106(1), 66-72. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91128.2008>
- Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., & Torres-Aleman, I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(8), 2926–2933. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751445>
- Carron, S. F., Alwis, D. S., & Rajan, R. (2016). Traumatic Brain Injury and Neuronal Functionality Changes in Sensory Cortex. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10, 47, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2016.00047>
- Casarrubea, M., Roy, V., Sorbera, F., Magnusson, M. S., Santangelo, A., Arabo, A., & Crescimanno, G. (2013). Significant divergences between the temporal structure of the behavior in Wistar and in the spontaneously more anxious DA/Han strain of rats tested in elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 250, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.016>

- Cassilhas, R. C., Lee, K. S., Fernandes, J., Oliveira, M. G. M., Tufik, S., Meeusen, R., & De Mello, M. T. (2012). Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. *Neuroscience*, *202*, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.029>
- Cătălin, B., Cupido, A., Iancău, M., Albu, C. V., & Kirchhoff, F. (2013). Microglia: first responders in the central nervous system. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, *54*(3), 467–472. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24068392>
- Catavero, C., Bao, H., & Song, J. (2018). Neural mechanisms underlying GABAergic regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Cell and Tissue Research*, *371*(1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2668-y>
- Chen, A. J.W., & D'Esposito, M. (2010). Traumatic brain injury: from bench to bedside to society. *Neuron*, *66*(1), 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.004>
- Chen, M. F., Huang, T. Y., Kuo, Y. M., Yu, L., Chen, H. ing, & Jen, C. J. (2013). Early postinjury exercise reverses memory deficits and retards the progression of closed-head injury in mice. *Journal of Physiology*, *591*(4), 985–1000. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.241125>
- Chen, S., Pickard, J. D., & Harris, N. G. (2003). Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Experimental Neurology*, *182*(1), 87–102.
- Chen, W. W., Zhang, X., & Huang, W. J. (2016). Role of physical exercise in Alzheimer's disease. *Biomedical reports*, *4*(4), 403–407. <https://doi.org/10.3892/br.2016.607>
- Chennaoui, M., Drogou, C., & Gomez-Merino, D. (2008). Effects of physical training on IL-1beta, IL-6 and IL-1ra concentrations in various brain areas of the rat. *European Cytokine Network*, *19*(1), 8–14. <https://doi.org/10.1684/ecn.2008.0115>
- Chin, L. M., Keyser, R. E., Dsurney, J., & Chan, L. (2015). Improved cognitive performance following aerobic exercise training in people with traumatic brain injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, *96*(4), 754–759. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2014.11.009>
- Chiu, C., Liao, Y., Yang, L., Wang, J., Tweedie, D., Hanuma, K., ... Branch, T. G. (2016). Neuroinflammation in an animal model of TBI. *Journal Neuroscience Methods*, *272*, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.06.018>
- Clark, R. E., & Martin, S. J. (2005). Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *15*(5), 593–598. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.08.014>
- Clark, R. E., Zola, S. M., & Squire, L. R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(23), 8853–8860
- Clayton, N. S., Salwiczek, L. H., & Dickinson, A. (2007). Episodic memory. *Current Biology*, *17*(6), R189–R191. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.011>
- Cobianchi, S., Arbat-Plana, A., M Lopez-Alvarez, V., & Navarro, X. (2017). Neuroprotective effects of exercise treatments after injury: the dual role of neurotrophic factors. *Current neuropharmacology*, *15*(4), 495–518. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666160330105132>

- Cohen, S. J., & Stackman, R. W. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, *285*, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>
- Corps, K. N., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2015). Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurology*, *72*(3), 355–362. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3558>
- Corrigan, F., Mander, K. A., Leonard, A. V., & Vink, R. (2016). Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0738-9>
- Cotman, C. W., Berchtold, N. C., & Christie, L. A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in Neurosciences*, *30*(9), 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.011>
- Cotman, C. W., & Engesser-Cesar, C. (2002). Exercise enhances and protects brain function. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, *30*(2), 75–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991541>
- Crane, A. T., Fink, K. D., & Smith, J. S. (2012). The effects of acute voluntary wheel running on recovery of function following medial frontal cortical contusions in rats. *Restorative Neurology and Neuroscience*, *30*(4), 325–333. <https://doi.org/10.3233/RNN-2012-120232>
- Cristofori, I., & Levin, H. S. (2015). Traumatic brain injury and cognition. *Handbook of Clinical Neurology*, *128*, 579–611. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63521-1.00037-6>
- Cruz, A. P., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *49*(1), 171–176. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7816869>
- Damiano, D. L., Zampieri, C., Ge, J., Acevedo, A., & Durney, J. (2016). Effects of a rapid-resisted elliptical training program on motor, cognitive and neurobehavioral functioning in adults with chronic traumatic brain injury. *Experimental Brain Research*, *234*(8), 2245–2252. <https://doi.org/10.1007/s00221-016-4630-8>
- Davis, J. C., Bryan, S., Marra, C. A., Sharma, D., Chan, A., Beattie, B. L., ... & Liu-Ambrose, T. (2013). An economic evaluation of resistance training and aerobic training versus balance and toning exercises in older adults with mild cognitive impairment. *PLoS One*, *8*(5), e63031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063031>
- de Almeida, A. A., Gomes da Silva, S., Fernandes, J., Peixinho-Pena, L. F., Scorza, F. A., Cavalheiro, E. A., & Arida, R. M. (2013). Differential effects of exercise intensities in hippocampal BDNF, inflammatory cytokines and cell proliferation in rats during the postnatal brain development. *Neuroscience Letters*, *553*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.08.015>
- de Sousa, A. F., Medeiros, A. R., Benitez-Flores, S., Del Rosso, S., Stults-Kolehmainen, M., & Boullosa, D. A. (2018). Improvements in Attention and Cardiac Autonomic Modulation After a 2-Weeks Sprint Interval Training Program: A Fidelity Approach. *Frontiers in physiology*, *9*, 241, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00241>

- Ding, Q., Vaynman, S., Akhavan, M., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2006). Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience*, *140*(3), 823–833. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.084>
- Ding, Q., Ying, Z., & Gómez-Pinilla, F. (2011). Exercise influences hippocampal plasticity by modulating brain-derived neurotrophic factor processing. *Neuroscience*, *192*, 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.032>
- Dinoff, A., Herrmann, N., Swardfager, W., & Lanctôt, K. L. (2017). The effect of acute exercise on blood concentrations of brain-derived neurotrophic factor in healthy adults: a meta-analysis. *European Journal of Neuroscience*, *46*(1), 1635–1646. <https://doi.org/10.1111/ejn.13603>
- Donat, C. K., Scott, G., Gentleman, S. M., & Sastre, M. (2017). Microglial activation in traumatic brain injury. *Frontiers in aging neuroscience*, *9*, 208. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00208>
- Doser, K., Poulsen, I., Wuensch, A., & Norup, A. (2017). Psychological outcome after severe traumatic brain injury in adolescents and young adults: The chronic phase. *Brain Injury*, *32*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/02699052.2017.1363408>
- Duzel, E., Van Praag, H., & Sendtner, M. (2016). Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? *Brain*, *139*(3), 662–673. <https://doi.org/10.1093/brain/awv407>
- Erickson, K. I., Voss, M. W., Prakash, S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., ... Kramer, A. F. (2011). Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *PNAS*, *108*(7), 3017–3022. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015950108>
- Farmer, J., Zhao, X., van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H., & Christie, B. R. (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*(1), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.029>
- Fellows, I. (2012). Deducer: a data analysis GUI for R. *Journal of statistical Software*, *49*(8), 1–15.
- Foltran, R. B., & Diaz, S. L. (2016). BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *Journal of Neurochemistry*, *138*(2), 204–221. <https://doi.org/10.1111/jnc.13658>
- Gaetz, M. (2004). The neurophysiology of brain injury. *Clinical Neurophysiology*, *115*(1), 4–18. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(03\)00258-X](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(03)00258-X)
- Gao, X., & Chen, J. (2013). Moderate traumatic brain injury promotes neural precursor proliferation without increasing neurogenesis in the adult hippocampus. *Experimental Neurology*, *239*(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.09.012>
- García-Capdevila, S., Portell-Cortés, I., Torras-Garcia, M., Coll-Andreu, M., & Costa-Miserachs, D. (2009). Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behavioural Brain Research*, *202*(2), 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.020>

- Girgis, F., Pace, J., Sweet, J., & Miller, J. P. (2016). Hippocampal neurophysiologic changes after mild traumatic brain injury and potential neuromodulation treatment approaches. *Frontiers in systems neuroscience*, *10*, 8, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2016.00008>
- Glushakova, O. Y., Johnson, D., & Hayes, R. L. (2014). Delayed increases in microvascular pathology after experimental traumatic brain injury are associated with prolonged inflammation, blood–brain barrier disruption, and progressive white matter damage. *Journal of neurotrauma*, *31*(13), 1180-1193. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3080>
- Goh, J., & Ladiges, W. (2015). Voluntary wheel running in mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, *5*(4), 283–290. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo140295>
- Gold, C. A., & Budson, A. E. (2008). Memory loss in Alzheimer’s disease: implications for development of therapeutics. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *8*(12), 1879–1891. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.12.1879>
- Gomez-Pinilla, F., Vaynman, S., & Ying, Z. (2008). Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *The European Journal of Neuroscience*, *28*(11), 2278–2287. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06524.x>
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell*, *167*(4), 897-914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>
- Greenwood, B. N., Foley, T. E., Day, H. E. W., Campisi, J., Hammack, S. H., Campeau, S., ... Fleshner, M. (2003). Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(7), 2889–2898. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684476>
- Griesbach, G. S., Gomez-Pinilla, F., & Hovda, D. A. (2004). The upregulation of plasticity-related proteins following TBI is disrupted with acute voluntary exercise. *Brain Research*, *1016*(2), 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.04.079>
- Griesbach, G. S., Gómez-Pinilla, F., & Hovda, D. A. (2007). Time window for voluntary exercise–induced increases in hippocampal neuroplasticity molecules after traumatic brain injury is severity dependent. *Journal of neurotrauma*, *24*(7), 1161-1171. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.0255>
- Griesbach, G. S., & Hovda, D. A. (2015). *Cellular and molecular neuronal plasticity. Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 128). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63521-1.00042-X>
- Griesbach, G. S., Hovda, D. A., Molteni, R., & Gomez-Pinilla, F. (2002). Alterations in BDNF and synapsin I within the occipital cortex and hippocampus after mild traumatic brain injury in the developing rat: reflections of injury-induced neuroplasticity. *Journal of neurotrauma*, *19*(7), 803-814. <https://doi.org/10.1089/08977150260190401>
- Griesbach, G. S., Hovda, D. A., Molteni, R., Wu, A., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Voluntary exercise following traumatic brain injury: Brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. *Neuroscience*, *125*(1), 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.030>

- Griesbach, G. S., Hovda, D. A., Tio, D. L., & Taylor, A. N. (2011). Heightening of the stress response during the first weeks after a mild traumatic brain injury. *Neuroscience*, *178*, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.028>
- Griesbach, G. S., Tio, D. L., Vincelli, J., McArthur, D. L., & Taylor, A. N. (2012). Differential effects of voluntary and forced exercise on stress responses after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, *29*(7), 1426–1433. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.2229>
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae*, *7*(25), 42–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085943>
- Hamm, R. J. (1992). Cognitive deficits following traumatic brain injury produced by controlled cortical impact. *J. Neurotrauma*, *9*(1), 11–20. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.1992.9.11>
- Hammond, R. S., Tull, L. E., & Stackman, R. W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.005>
- Hoffmann, C., & Weigert, C. (2018). Skeletal muscle as an endocrine organ: the role of myokines in exercise adaptations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(11), a029793. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029793>
- Hollamby, A., Davelaar, E. J., & Cadar, D. (2017). Increased physical fitness is associated with higher executive functioning in people with dementia. *Frontiers in Public Health*, *5*(346), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00346>
- Hopkins, M. E., Nitecki, R., & Bucci, D. J. (2011). Physical exercise during adolescence versus adulthood: Differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, *194*, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.071>
- Hoskison, M. M., Moore, A. N., Hu, B., Orsi, S., Kobori, N., & Dash, P. K. (2009). Persistent working memory dysfunction following traumatic brain injury: evidence for a time-dependent mechanism. *Neuroscience*, *159*(2), 483–491. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.050>
- Hötting, K., & Röder, B. (2013). Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *37*(9), 2243–2257. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.005>
- Huh, J. W., Widing, A. G., & Raghupathi, R. (2008). Midline brain injury in the immature rat induces sustained cognitive deficits, bihemispheric axonal injury and neurodegeneration. *Experimental Neurology*, *213*(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.05.009>
- Huh, J. Y. (2018). The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism. *Archives of Pharmacal Research*, *41*(1), 14–29. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0994-y>
- Hylin, M. J., Kerr, A. L., & Holden, R. (2017). Understanding the mechanisms of recovery and/or compensation following injury. *Neural Plasticity*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/7125057>
- Iaccarino, M. A., Bhatnagar, S., & Zafonte, R. (2015). *Rehabilitation after traumatic brain injury. Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 127). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52892-6.00026-X>

- Ibrahim, S., Hu, W., Wang, X., Gao, X., He, C., & Chen, J. (2016). Traumatic brain injury causes aberrant migration of adult-born neurons in the hippocampus. *Scientific reports*, *6*, 21793. 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep21793>
- Imai, Y., Iwata, I., Ito, D., Ohsawa, K., & Kohsaka, S. (1996). A novel gene in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochemical and biophysical research communications*, *224*(3), 855-862. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1996.1112>
- Immonen, R. J., Kharatishvili, I., Niskanen, J.-P., Gröhn, H., Pitkänen, A., & Gröhn, O. H. J. (2009). Distinct MRI pattern in lesional and perilesional area after traumatic brain injury in rat--11 months follow-up. *Experimental Neurology*, *215*(1), 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.09.009>
- Inoue, K., Okamoto, M., Shibato, J., Lee, M. C., Matsui, T., Rakwal, R., & Soya, H. (2015). Long-term mild, rather than intense, exercise enhances adult hippocampal neurogenesis and greatly changes the transcriptomic profile of the hippocampus. *PLoS ONE*, *10*(6), 1-25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128720>
- Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., & Fukuuchi, Y. (2001). Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke*, *32*(5), 1208-1215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11340235>
- Jacotte-Simancas, A., Costa-Miserachs, D., Coll-Andreu, M., Torras-Garcia, M., Borlongan, C. V., & Portell-Cortés, I. (2015). Effects of voluntary physical exercise, citicoline, and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis, and neuroprotection after traumatic brain injury in rats. *Journal of neurotrauma*, *32*(10), 739-751. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3502>
- Jassam, Y. N., Izzy, S., Whalen, M., McGavern, D. B., & El Khoury, J. (2017). Neuroimmunology of traumatic brain injury: Time for a paradigm shift. *Neuron*, *95*(6), 1246-1265. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.010>
- Jeon, Y. K., & Ha, C. H. (2017). The effect of exercise intensity on brain derived neurotrophic factor and memory in adolescents. *Environmental Health and Preventive Medicine*, *22*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s12199-017-0643-6>
- Johnson, V. E., Stewart, J. E., Begbie, F. D., Trojanowski, J. Q., Smith, D. H., & Stewart, W. (2013). Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain: A Journal of Neurology*, *136*(1), 28-42. <https://doi.org/10.1093/brain/aws322>
- Jurado-Berbel, P., Costa-Miserachs, D., Torras-Garcia, M., Coll-Andreu, M., & Portell-Cortés, I. (2010). Standard object recognition memory and "what" and "where" components: Improvement by post-training epinephrine in highly habituated rats. *Behavioural brain research*, *207*(1), 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.036>
- Kemper, J. E., Pop, V., Fukuda, A. M., Ajao, D. O., Hartman, R. E., & Badaut, J. (2013). Juvenile traumatic brain injury evolves into a chronic brain disorder: behavioral and histological changes over 6 months. *Experimental Neurology*, *250*, 8-19. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.09.016>
- Karve, I. P., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2015). The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British Journal of Pharmacology*, *173*(4), 692-702. <https://doi.org/10.1111/bph.13125>

- Kasturi, B. S., & Stein, D. (2009). Traumatic brain injury causes long-term reduction in serum Growth Hormone and persistent astrocytosis in the cortical-hypothalamo-pituitary axis of adult male rats. *Journal of Neurotrauma*, 090330061141047. <https://doi.org/10.1089/neu.2008-0751>
- Ke, Z., Yip, S. P., Li, L., Zheng, X.-X., & Tong, K.-Y. (2011). The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PloS One*, 6(2), e16643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016643>
- Kealy, J., & Commins, S. (2011). The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Progress in Neurobiology*, 93(4), 522–548. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.03.002>
- Kim, Y.-M., Ji, E.-S., Yoon, S.-J., & Yoon, J.-H. (2013). Sudden detraining deteriorates swimming training-induced enhancement of short-term and spatial learning memories in mice. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 9(2), 243. <https://doi.org/10.12965/jer.130006>
- Kinoshita, K. (2016). Traumatic brain injury: Pathophysiology for neurocritical care. *Journal of Intensive Care*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40560-016-0138-3>
- Ko, I.-G., Kim, S.-E., Hwang, L., Jin, J.-J., Kim, C.-J., Kim, B.-K., & Kim, H. (2018). Late starting treadmill exercise improves spatial learning ability through suppressing CREP/BDNF/TrkB signaling pathway following traumatic brain injury in rats. *Journal of exercise rehabilitation*, 14(3), 327. <https://doi.org/10.12965/jer.1836248.124>
- Kokiko-Cochran, O. N., & Godbout, J. P. (2018). The inflammatory continuum of traumatic brain injury and alzheimer's disease. *Frontiers in Immunology*, 9, 672. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00672>
- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., & Moryś, J. (2018). BDNF: A key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(3), 579–593. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>
- Kreber, L. A., & Griesbach, G. S. (2016). The interplay between neuropathology and activity based rehabilitation after traumatic brain injury. *Brain Research*, 1640, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.016>
- Kreber, L. A., Griesbach, G. S., & Ashley, M. J. (2016). Detection of growth hormone deficiency in adults with chronic traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 33(17), 1607–1613. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4127>
- Krishna, G., Agrawal, R., Zhuang, Y., Ying, Z., Paydar, A., Harris, N. G., ... Gomez-Pinilla, F. (2017). 7,8-Dihydroxyflavone facilitates the action exercise to restore plasticity and functionality: Implications for early brain trauma recovery. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(6), 1204–1213. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.03.007>
- Krishnamurthy K, Laskowitz DT. 2016. Cellular and Molecular Mechanisms of Secondary Neuronal Injury following Traumatic Brain Injury. In: Laskowitz D, Grant G, editors. *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis Group.

- Kurowski, B. G., Hugentobler, J., Quatman-Yates, C., Taylor, J., Gubanich, P. J., Altaye, M., & Wade, S. L. (2017). Aerobic exercise for adolescents with prolonged symptoms after mild traumatic brain injury: An exploratory randomized clinical trial. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation, 32*(2), 79–89. <https://doi.org/10.1097/HTR.0000000000000238>
- Lal, A., Kolakowsky-Hayner, S. A., Ghajar, J., & Balamane, M. (2018). The effect of physical exercise after a concussion: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Sports Medicine, 46*(3), 743–752. <https://doi.org/10.1177/0363546517706137>
- Leasure, J. L., & Decker, L. (2009). Social isolation prevents exercise-induced proliferation of hippocampal progenitor cells in female rats. *Hippocampus, 19*(10), 907–912. <https://doi.org/10.1002/hipo.20563>
- Leasure, J. L., & Jones, M. (2008). Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience, 156*(3), 456–465. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.041>
- Li, F., Geng, X., Khan, H., Pendy Jr, J. T., Peng, C., Li, X., ... & Ding, Y. (2017). Exacerbation of brain injury by post-stroke exercise is contingent upon exercise initiation timing. *Frontiers in cellular neuroscience, 11*, 311, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00311>
- Li, F., Shi, W., Zhao, E. Y., Geng, X., Li, X., Peng, C., ... Ding, Y. (2017). Enhanced apoptosis from early physical exercise rehabilitation following ischemic stroke. *Journal of Neuroscience Research, 95*(4), 1017–1024. <https://doi.org/10.1002/jnr.23890>
- Liu, P. Z., & Nusslock, R. (2018). Exercise-mediated neurogenesis in the hippocampus via BDNF. *Frontiers in Neuroscience, 12*(52), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00052>
- Liu, Y.-F., Chen, H., Wu, C.-L., Kuo, Y.-M., Yu, L., Huang, A.-M., ... Jen, C. J. (2009). Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *The Journal of Physiology, 587*(Pt 13), 3221–3231. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.173088>
- Liu, Y. R., Cardamone, L., Hogan, R. E., Gregoire, M.-C., Williams, J. P., Hicks, R. J., ... Boullieret, V. (2010). Progressive metabolic and structural cerebral perturbations after traumatic brain injury: an in vivo imaging study in the rat. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine, 51*(11), 1788–1795. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.078626>
- Loane, D. J., & Kumar, A. (2016). Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Experimental Neurology, 275*, 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.08.018>
- Loane, D. J., Kumar, A., Stoica, B. A., Cabatbat, R., & Faden, A. I. (2014). Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 73*(1), 14–29. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000021>
- Lorón-Sánchez, A., Torras-García, M., Coll-Andreu, M., Costa-Miserachs, D., & Portell-Cortés, I. (2016). Posttraining epinephrine reverses memory deficits produced by traumatic brain injury in rats. *Scientifica, 2016*, 9151490. <https://doi.org/10.1155/2016/9151490>

- Lozano, D., Gonzales-Portillo, G. S., Acosta, S., de la Pena, I., Tajiri, N., Kaneko, Y., & Borlongan, C. V. (2015). Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: Etiology, Clinical consequences, And therapeutic opportunities. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *11*, 97–106. <https://doi.org/10.2147/NDT.S65815>
- Luine, V. (2015). Recognition memory tasks in neuroendocrine research. *Behavioural Brain Research*, *285*, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.04.032>
- Luo, C. X., Jiang, J., Zhou, Q. G., Zhu, X. J., Wang, W., Zhang, Z. J., ... Zhu, D. Y. (2007). Voluntary exercise-induced neurogenesis in the postischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *Journal of Neuroscience Research*, *85*(8), 1637–1646. <https://doi.org/10.1002/jnr.21317>
- Ma, C.-L., Ma, X.-T., Wang, J.-J., Liu, H., Chen, Y.-F., & Yang, Y. (2017). Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. *Behavioural Brain Research*, *317*, 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.067>
- Ma, D. K., Bonaguidi, M. A., Ming, G.-L., & Song, H. (2009). Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Research*, *19*(6), 672–682. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.56>
- Madathil, S.K., Saatman, K.E. 2015. IGF-1/IGF-R Signaling in Traumatic Brain Injury: Impact on Cell Survival, Neurogenesis, and Behavioral Outcome. In: Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Majdan, M., Plancikova, D., Brazinova, A., Rusnak, M., Nieboer, D., Feigin, V., & Maas, A. (2016). Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis. *The Lancet Public Health*, *1*(2), e76–e83. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(16\)30017-2](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(16)30017-2)
- Mandolesi, L., Polverino, A., Montuori, S., Foti, F., Ferraioli, G., Sorrentino, P., & Sorrentino, G. (2018). Effects of physical exercise on cognitive functioning and wellbeing: Biological and psychological benefits. *Frontiers in Psychology*, *9*, 509. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00509>
- Manikas, V., Babl, F. E., Hearps, S., Dooley, J., & Anderson, V. (2017). Impact of exercise on clinical symptom report and neurocognition after concussion in children and adolescents. *Journal of Neurotrauma*, *34*(11), 1932–1938. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4762>
- Mannix, R., Berglass, J., Berkner, J., Moleus, P., Qiu, J., Jantzie, L. L., ... Robinson, S. (2014). Sex differences in the effect of progesterone after controlled cortical impact in adolescent mice: a preliminary study. *Journal of Neurosurgery*, *121*(6), 1337–1341. <https://doi.org/10.3171/2014.8.JNS14715>
- Marosi, K., & Mattson, M. P. (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *25*(2), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.10.006>
- Masel, B. E., & Urban, R. (2015). Chronic endocrinopathies in traumatic brain injury disease. *Journal of Neurotrauma*, *32*(23), 1902–1910. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3526>
- McAllister, T. W. (2011). Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *13*(3), 287–300. <https://doi.org/DOI>

- McCormick, C. M., & Mathews, I. Z. (2010). Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 34(5), 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.09.019>
- Medaglia, J. D. (2017). Functional neuroimaging in traumatic brain injury: From nodes to networks. *Frontiers in Neurology*, 8(407), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00407>
- Mehan, N. D., & Strauss, K. I. (2012). Combined age- and trauma-related proteomic changes in rat neocortex: a basis for brain vulnerability. *Neurobiology of Aging*, 33(9), 1857–1873. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.029>
- Miller, A. H., Haroon, E., & Felger, J. C. (2017). Therapeutic Implications of Brain-Immune Interactions: Treatment in Translation. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 334–359. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.167>
- Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(12), 850–860. <https://doi.org/10.1038/nrn2738>
- Miranda, M., & Bekinschtein, P. (2018). Plasticity mechanisms of memory consolidation and reconsolidation in the Perirhinal Cortex. *Neuroscience*, 370, 46–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.002>
- Miranda, M., Kent, B. A., Morici, J. F., Gallo, F., Weisstaub, N. V., Saksida, L. M., ... & Bekinschtein, P. (2017). Molecular mechanisms in perirhinal cortex selectively necessary for discrimination of overlapping memories, but independent of memory persistence. *eNeuro*, 4(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0293-17.2017>
- Molteni, R., Ying, Z., & Gómez-Pinilla, F. (2002). Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *European Journal of Neuroscience*, 16(6), 1107–1116. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02158.x>
- Mondon, C. E., Dolkas, C. B., Sims, C., & Reaven, G. M. (1985). *Spontaneous running activity in male rats: effect of age*. *Journal of Applied Physiology*, 58(5), 1553-1557.
- Moon, H. Y., Becke, A., Berron, D., Becker, B., Sah, N., Benoni, G., ... van Praag, H. (2016). Running-induced systemic cathepsin B secretion is associated with memory function. *Cell Metabolism*, 24(2), 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.025>
- Morris, T., Gomes Osman, J., Tormos Muñoz, J. M., Costa Miserachs, D., & Pascual Leone, A. (2016). The role of physical exercise in cognitive recovery after traumatic brain injury: A systematic review. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 34(6), 977–988. <https://doi.org/10.3233/RNN-160687>
- Morris, T. P., Costa-Miserachs, D., Rodriguez-Rajo, P., Finestres, J., Bernabeu, M., Gomes-Osman, J., ... Tormos-Muñoz, J. M. (2018). Feasibility of aerobic exercise in the subacute phase of recovery from traumatic brain injury. *Journal of Neurologic Physical Therapy*, 1. <https://doi.org/10.1097/NPT.0000000000000239>
- Mossberg, K. A., Amonette, W. E., & Masel, B. E. (2010). Endurance training and cardiorespiratory conditioning after traumatic brain injury. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 25(3), 173–183. <https://doi.org/10.1097/HTR.0b013e3181dc98ff>

- Mossberg, K. A., Masel, B. E., Gilkison, C. R., & Urban, R. J. (2008). Aerobic capacity and growth hormone deficiency after traumatic brain injury. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *93*(7), 2581–2587. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0368>
- Motta-Teixeira, L. C., Takada, S. H., Machado-Nils, A. V., Nogueira, M. I., & Xavier, G. F. (2016). Spatial learning and neurogenesis: Effects of cessation of wheel running and survival of novel neurons by engagement in cognitive tasks. *Hippocampus*, *26*(6), 794–803. <https://doi.org/10.1002/hipo.22560>
- Murínová, J., Hlaváčová, N., Chmelová, M., & Riečanský, I. (2017). The evidence for altered BDNF expression in the brain of rats reared or housed in social isolation: A Systematic Review. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *11*, 101. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00101>
- Mychasiuk, R., Farran, A., & Esser, M. J. (2014). Assessment of an experimental rodent model of pediatric mild traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, *31*(8), 749–757. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3132>
- Naylor, A. S., Persson, A. I., Eriksson, P. S., Jonsdottir, I. H., & Thorlin, T. (2005). Extended voluntary running inhibits exercise-induced adult hippocampal progenitor proliferation in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Neurophysiology*, *93*(5), 2406–2414. <https://doi.org/10.1152/jn.01085.2004>
- Nguemeni, C., McDonald, M. W., Jeffers, M. S., Livingston-Thomas, J., Lagace, D., & Corbett, D. (2018). Short- and long-term exposure to low and high dose running produce differential effects on hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, *369*, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.026>
- Nieto-Estévez, V., Defterali, Ç., & Vicario-Abejón, C. (2016). IGF-I: A key growth factor that regulates neurogenesis and synaptogenesis from embryonic to adult stages of the brain. *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 52. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00052>
- Nishijima, T., Kamidozono, Y., Ishiizumi, A., Amemiya, S., & Kita, I. (2017). Negative rebound in hippocampal neurogenesis following exercise cessation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00397.2016>
- Nishijima, T., Llorens-Martín, M., Tejeda, G. S., Inoue, K., Yamamura, Y., Soya, H., ... Torres-Alemán, I. (2013). Cessation of voluntary wheel running increases anxiety-like behavior and impairs adult hippocampal neurogenesis in mice. *Behavioural Brain Research*, *245*, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.009>
- O'Connor, W. T., Smyth, A., & Gilchrist, M. D. (2011). Animal models of traumatic brain injury: A critical evaluation. *Pharmacology and Therapeutics*, *130*(2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.001>
- Osier, N., & Dixon, C. E. (2016). The controlled cortical impact model of experimental brain trauma: overview, research applications, and protocol. In *Injury Models of the Central Nervous System* (pp. 177–192). Humana Press, New York, NY.
- Osier, N., & Dixon, C. E. (2017). Mini review of controlled cortical impact: A well-suited device for concussion research. *Brain Sciences*, *7*(7). <https://doi.org/10.3390/brainsci7070088>

- Overall, R. W., Walker, T. L., Fischer, T. J., Brandt, M. D., & Kempermann, G. (2016). Different mechanisms must be considered to explain the increase in hippocampal neural precursor cell proliferation by physical activity *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 362. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00362>
- Park, M.-S., Oh, H.-A., Ko, I.-G., Kim, S.-E., Kim, S.-H., Kim, C.-J., ... Kim, H. (2014). Influence of mild traumatic brain injury during pediatric stage on short-term memory and hippocampal apoptosis in adult rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*, *10*(3), 148–154. <https://doi.org/10.12965/jer.140109>
- Paterno, R., Folweiler, K. A., & Cohen, A. S. (2017). Pathophysiology and treatment of memory dysfunction after traumatic brain injury. *Current neurology and neuroscience reports*, *17*(7), 52. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0762-x>
- Paterno, R., Metheny, H., & Cohen, A. S. (2018). Memory deficit in an object location task after mild TBI is associated with impaired early object exploration and both are restored by branched chain amino acid dietary therapy. *Journal of neurotrauma*, *35*(17), 2117-2124. <https://doi.org/doi:10.1089/neu.2017.5170> .
- Paxinos, G & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Sixth edit). Elsevier Academic Press.
- Pedersen, B. K. (2009). Edward F. Adolph Distinguished Lecture: Muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. *Journal of Applied Physiology*, *107*(4), 1006–1014. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00734.2009>
- Pedersen, B. K. (2017). Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Investigation*, *47*(8), 600–611. <https://doi.org/10.1111/eci.12781>
- Peeters, W., van den Brande, R., Polinder, S., Brazinova, A., Steyerberg, E. W., Lingsma, H. F., & Maas, A. I. R. (2015). Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochirurgica*, *157*(10), 1683–1696. <https://doi.org/10.1007/s00701-015-2512-7>
- Pervez, M., Kitagawa, R. S., & Chang, T. R. (2018). Definition of traumatic brain injury, neurosurgery, trauma orthopedics, neuroimaging, psychology, and psychiatry in mild traumatic brain injury. *Neuroimaging clinics of North America*, *28*(1), 1-13.. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2017.09.010>
- Phillips, C., Baktir, M. A., Srivatsan, M., & Salehi, A. (2014). Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00170>
- Piao, C.-S., Stoica, B. a, Wu, J., Sabirzhanov, B., Zhao, Z., Cabatbat, R., ... Faden, A. I. (2013). Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury. *Neurobiology of Disease*, *54*, 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.017>
- Pierce, J. E., Smith, D. H., Trojanowski, J. Q., & McIntosh, T. K. (1998). Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. *Neuroscience*, *87*(2), 359–369.
- Pin-Barre, C., Constans, A., Brisswalter, J., Pellegrino, C., & Laurin, J. (2017). Effects of high-versus moderate-intensity training on neuroplasticity and functional recovery after focal ischemia. *Stroke*, *48*(10), 2855-2864. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017962>

- Plümpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., ... Kempermann, G. (2006). Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neuroscience*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-77>
- Pöttker, B., Stöber, F., Hummel, R., Angenstein, F., Radyushkin, K., Goldschmidt, J., & Schäfer, M. K. E. (2017). Traumatic brain injury causes long-term behavioral changes related to region-specific increases of cerebral blood flow. *Brain Structure and Function*, 222(9), 4005–4021. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1452-9>
- Price L, Wilson C, Grant G (2016). Blood–Brain Barrier Pathophysiology following Traumatic Brain Injury. In: Laskowitz D, Grant G, editors. *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis Group; 2016. Chapter 4.
- Prieto, R., Gutierrez-Gonzalez, R., Pascual, J. M., Roda, J. M., Cerdan, S., Matias-Guiu, J., & Barcia, J. A. (2009). Experimental models of traumatic brain injury. *Neurocirugia (Asturias, Spain)*, 20(3), 225–244. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19575127>
- Prins, M. L., Hales, A., Reger, M., Giza, C. C., & Hovda, D. A. (2010). Repeat traumatic brain injury in the juvenile rat is associated with increased axonal injury and cognitive impairments. *Developmental Neuroscience*, 32(5–6), 510–518. <https://doi.org/10.1159/000316800>
- Radak, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., ... Goto, S. (2006). The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochemistry International*, 49(4), 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.02.004>
- Rao, V. L. R., Dogan, A., Bowen, K. K., Todd, K. G., & Dempsey, R. J. (2001). Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1 exacerbates hippocampal neuronal damage following traumatic injury to rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 13(1), 119–128. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2001.01367.x>
- Rhodes, J. S., van Praag, H., Jeffrey, S., Girard, I., Mitchell, G. S., Garland, T., & Gage, F. H. (2003). Exercise increases hippocampal neurogenesis to high levels but does not improve spatial learning in mice bred for increased voluntary wheel running. *Behavioral Neuroscience*, 117(5), 1006–1016. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.5.1006>
- Roozenbeek, B., Maas, A. I. R., & Menon, D. K. (2013a). Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*, 9(4), 231–236. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.22>
- Roozenbeek, B., Maas, A. I. R., & Menon, D. K. (2013b). Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*, 9(4), 231–236. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.22>
- Russell, K. C., Arenth, P. M., Scanlon, J. M., Kessler, L. J., & Ricker, J. H. (2011). A functional magnetic resonance imaging investigation of episodic memory after traumatic brain injury. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 33(5), 538–547. <https://doi.org/10.1080/13803395.2010.537253>
- Russo, M. V., & McGavern, D. B. (2016). Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science*, 353(6301), 783–785. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6260>

- Ryan, S. M., & Nolan, Y. M. (2016). Neuroinflammation negatively affects adult hippocampal neurogenesis and cognition: Can exercise compensate? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *61*, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.12.004>
- Sajja, V. S., Hlavac, N., & VandeVord, P. J. (2016). Role of glia in memory deficits following traumatic brain injury: biomarkers of glia dysfunction. *Frontiers in integrative neuroscience*, *10*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnint.2016.00007>
- Sans, A., Colomé, R., López-Sala, A., & Boix, C. (2009). Neuropsychological aspects of acquired diffuse brain injury in paediatric childhood. *Revista de neurologia*, *48*, S23-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19280569>
- Saul, M. L., Tylee, D., Becoats, K. T., Guerrero, B. G., Sweeney, P., Helmreich, D. L., & Fudge, J. L. (2012). Long-term behavioral consequences of stress exposure in adolescent versus young adult rats. *Behavioural Brain Research*, *229*(1), 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.022>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological- image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682.
- Schneider, M. (2013). Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell and Tissue Research*, *354*(1), 99–106. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1581-2>
- Sell, S. L., Johnson, K., DeWitt, D. S., & Prough, D. S. (2017). Persistent behavioral deficits in rats after parasagittal fluid percussion injury. *Journal of Neurotrauma*, *34*(5), 1086–1096. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4616>
- Sengupta, P. (2013). The laboratory rat: Relating Its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*, *4*(6), 624–630. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23930179>
- Shen, J., Huber, M., Zhao, E. Y., Peng, C., Li, F., Li, X., ... Ding, Y. (2016). Early rehabilitation aggravates brain damage after stroke via enhanced activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX). *Brain Research*, *1648*, 266–276. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.001>
- Shen, X., Li, A., Zhang, Y., Dong, X., Shan, T., Wu, Y., ... & Hu, Y. (2013). The effect of different intensities of treadmill exercise on cognitive function deficit following a severe controlled cortical impact in rats. *International journal of molecular sciences*, *14*(11), 21598-21612. <https://doi.org/10.3390/ijms141121598>
- Shih, P. C., Yang, Y. R., & Wang, R. Y. (2013). Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One*, *8*(10), e78163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078163>
- Shimada, H., Hamakawa, M., Ishida, A., Tamakoshi, K., Nakashima, H., & Ishida, K. (2013). Low-speed treadmill running exercise improves memory function after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Behavioural Brain Research*, *243*, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.018>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Tinevez, J. Y. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 676.

- Simon, D. W., Mcgeachy, M., Bayir, H., Clark, R. S. B., Loane, D. J., & Kochanek, P. M. (2018). Neuroinflammation in the evolution of secondary injury, repair, and chronic neurodegeneration after traumatic brain injury, *13*(3), 171–191. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2017.13>. Neuroinflammation
- Sisk, C. L., & Zehr, J. L. (2005). Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *26*(3–4), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.10.003>
- So, J. H., Huang, C., Ge, M., Cai, G., Zhang, L., Lu, Y., & Mu, Y. (2017). Intense exercise promotes adult hippocampal neurogenesis but not spatial discrimination. *Frontiers in cellular neuroscience*, *11*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00013>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., ... Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, *555*(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Spielman, L. J., Little, J. P., & Klegeris, A. (2016). Physical activity and exercise attenuate neuroinflammation in neurological diseases. *Brain Research Bulletin*, *125*, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.012>
- Squire, L. R., Wixted, J. T., & Clark, R. E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(11), 872–883. <https://doi.org/10.1038/nrn2154>
- Steensberg, A., Fischer, C. P., Keller, C., Møller, K., & Pedersen, B. K. (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *285*(2), E433-7. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00074.2003>
- Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R. L., Osada, T., Febbraio, M. A., & Pedersen, B. K. (2002). IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *283*(6), E1272-E1278. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00255.2002>
- Stimpson, N. J., Davison, G., & Javadi, A.-H. (2018). Joggin' the Noggin: Towards a Physiological Understanding of Exercise-Induced Cognitive Benefits. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *88*, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.03.018>
- Sun, D., Daniels, T. E., Rolfe, A., Waters, M., & Hamm, R. (2015). Inhibition of injury-induced cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus impairs spontaneous cognitive recovery after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, *32*(7), 495–505. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3545>
- Sun, L., Li, X., Wang, F., Zhang, J., Wang, D., Yuan, L., ... Qi, J. (2017). High-intensity treadmill running impairs cognitive behavior and hippocampal synaptic plasticity of rats via activation of inflammatory response. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(8), 1611–1620. <https://doi.org/10.1002/jnr.23996>
- Taib, T., Leconte, C., Van Steenwinckel, J., Cho, A. H., Palmier, B., Torsello, E., ... Besson, V. C. (2017). Neuroinflammation, myelin and behavior: Temporal patterns following mild traumatic brain injury in mice. *PloS One*, *12*(9), e0184811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184811>

- Tan, C. O., Meehan, W. P., Iverson, G. L., & Taylor, J. A. (2014). Cerebrovascular regulation, exercise, and mild traumatic brain injury. *Neurology*, 10-1212. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000944>
- Tanimizu, T., Kono, K., & Kida, S. (2017). Brain networks activated to form object recognition memory. *Brain Research Bulletin*, 141, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.05.017>
- Tarumi, T., & Zhang, R. (2014). Cerebral hemodynamics of the aging brain: risk of Alzheimer disease and benefit of aerobic exercise. *Frontiers in Physiology*, 5, 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00006>
- Taylor, A. N., Rahman, S. U., Sanders, N. C., Tio, D. L., Prolo, P., & Sutton, R. L. (2008). Injury severity differentially affects short- and long-term neuroendocrine outcomes of traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 25(4), 311–323. <https://doi.org/10.1089/neu.2007.0486>
- Thurman, D. J. (2016). The epidemiology of traumatic brain injury in children and youths: A review of research since 1990. *Journal of Child Neurology*, 31(1), 20–27. <https://doi.org/10.1177/0883073814544363>
- Titus, D. J., Wilson, N. M., Freund, J. E., Carballosa, M. M., Sikah, K. E., Furones, C., ... & Atkins, C. M. (2016). Chronic cognitive dysfunction after traumatic brain injury is improved with a phosphodiesterase 4B inhibitor. *Journal of Neuroscience*, 36(27), 7095-7108.. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3212-15.2016>
- Toda, T., & Gage, F. H. (2017). adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell and tissue research*, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2735-4>
- Trejo, J. L., Carro, E., & Torres-Aleman, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 21(5), 1628-1634.
- Tsukamoto, H., Suga, T., Takenaka, S., Tanaka, D., Takeuchi, T., Hamaoka, T., ... Hashimoto, T. (2016). Greater impact of acute high-intensity interval exercise on post-exercise executive function compared to moderate-intensity continuous exercise. *Physiology and Behavior*, 155, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.12.021>
- Turtzo, L. C., Budde, M. D., Gold, E. M., Lewis, B. K., Janes, L., Yarnell, A., ... Frank, J. A. (2012). The evolution of traumatic brain injury in a rat focal contusion model. *NMR in Biomedicine*. <https://doi.org/10.1002/nbm.2886>
- Turtzo, L., Lescher, J., Janes, L., Dean, D. D., Budde, M. D., & Frank, J. A. (2014). Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 82. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-82>
- Vanderbeken, I., & Kerckhofs, E. (2017). A systematic review of the effect of physical exercise on cognition in stroke and traumatic brain injury patients. *NeuroRehabilitation*, 40(1), 33–48. <https://doi.org/10.3233/NRE-161388>
- Vann, S. D., & Albasser, M. M. (2011). Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(3), 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.02.002>
- Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*, 20(10), 2580–2590. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03720.x>

- Vidoni, E. D., Johnson, D. K., Morris, J. K., Van Sciver, A., Greer, C. S., Billinger, S. A., ... Burns, J. M. (2015). Dose-response of aerobic exercise on cognition: A community-based, pilot randomized controlled trial. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131647>
- Vink, R. (2017). Large animal models of traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Research*, *96*(4), 527–535. <https://doi.org/10.1002/jnr.24079>
- Vivar, C., & van Praag, H. (2017). Running changes the brain: the long and the short of it. *Physiology*, *32*(6), 410–424. <https://doi.org/10.1152/physiol.00017.2017>
- Voss, M. W., Vivar, C., Kramer, A. F., & van Praag, H. (2013). Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends in Cognitive Sciences*, *17*(10), 525–544. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.08.001>
- Wagner, A. K., Postal, B. A., Darrach, S. D., Chen, X., & Khan, A. S. (2007). Deficits in novelty exploration after controlled cortical impact. *Journal of Neurotrauma*, *24*(8), 1308–1320. <https://doi.org/10.1089/neu.2007.0274>
- Walker, P. A., Harting, M. T., Baumgartner, J. E., Fletcher, S., Strobel, N., & Cox, C. S. (2009). Modern approaches to pediatric brain injury therapy. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, *67*(Supplement), S120–S127. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181ad323a>
- Wammes, J. D., Good, T. J., & Fernandes, M. A. (2017). Autobiographical and episodic memory deficits in mild traumatic brain injury. *Brain and Cognition*, *111*, 112–126. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2016.11.004>
- Wang, G., Zhang, J., Hu, X., Zhang, L., Mao, L., Jiang, X., ... & Chen, J. (2013). Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *33*(12), 1864–1874. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.146>
- Wang, X., Gao, X., Michalski, S., Zhao, S., & Chen, J. (2016). Traumatic brain injury severity affects neurogenesis in adult mouse hippocampus. *Journal of Neurotrauma*, *33*(8), 721–733. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4097>
- Wang, Y., & Qin, Z. (2010). Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*, *15*(11), 1382–1402. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0481-0>
- Warburton, E. C., & Brown, M. W. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behavioural Brain Research*, *285*, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.050>
- Washington, P. M., Forcelli, P. A., Wilkins, T., Zapple, D. N., Parsadonian, M., & Burns, M. P. (2012). The effect of injury severity on behavior: a phenotypic study of cognitive and emotional deficits after mild, moderate, and severe controlled cortical impact injury in mice. *Journal of Neurotrauma*, *29*(13), 2283–2296. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2456>
- Werner, C., & Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *British Journal of Anaesthesia*, *99*(1), 4–9. <https://doi.org/10.1093/bja/aem131>
- Wilson, L., Stewart, W., Dams-O'Connor, K., Diaz-Arrastia, R., Horton, L., Menon, D. K., & Polinder, S. (2017). The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury. *The Lancet Neurology*, *16*(10), 813–825. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30279-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30279-X)

- Winters, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(5), 1055–1070. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.004>
- Wixted, J. T., Mickes, L., & Squire, L. R. (2010). Measuring recollection and familiarity in the medial temporal lobe. *Hippocampus*, 20(11), 1195–1205. <https://doi.org/10.1002/hipo.20854>
- Wogensen, E., Malá, H., & Mogensen, J. (2015). The effects of exercise on cognitive recovery after acquired brain injury in animal models: a systematic review. *Neural plasticity*, 2015. <https://dx.doi.org/10.1155/2015/830871>
- Wrann, C. D., White, J. P., Salogiannis, J., Laznik-Bogoslavski, D., Wu, J., Ma, D., ... Spiegelman, B. M. (2013). Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 pathway. *Cell Metabolism*, 18(5), 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.008>
- Wu, A., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2013). Exercise facilitates the action of dietary DHA on functional recovery after brain trauma. *Neuroscience*, 248, 655–663. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.041>
- Xu, H., Wang, Z., Li, J., Wu, H., Peng, Y., Fan, L., ... Chen, G. (2017). The polarization states of microglia in TBI: A new paradigm for pharmacological intervention. *Neural Plasticity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5405104>
- Zhang, H., Han, M., Zhang, X., Sun, X., & Ling, F. (2014). The effect and mechanism of growth hormone replacement on cognitive function in rats with traumatic brain injury. *PLoS One*, 9(9), e108518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108518>
- Zhao, Z., Loane, D. J., Murray, M. G., Stoica, B. A., & Faden, A. I. (2012). Comparing the predictive value of multiple cognitive, affective, and motor tasks after rodent traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 29(15), 2475–2489. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2511>