

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

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>

Tesis Doctoral

Neurociencias

**Tratamiento con ejercicio físico de los déficits de memoria y el
daño cerebral asociados a un traumatismo craneoencefálico:
Efectos de la demora de inicio y de la interacción con el ejercicio
previo al traumatismo.**

Tanit Sánchez Martín

Codirigida por

David Costa Miserachs

Meritxell Torras Garcia

Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias de la Salud, Instituto de
Neurociencias, Universidad Autónoma de Barcelona

Bellaterra, 2023

Tesis Doctoral

Neurociències

**Tratamiento con ejercicio físico de los déficits de memoria y el
daño cerebral asociados a un traumatismo craneoencefálico:
Efectos de la demora de inicio y de la interacción con el ejercicio
previo al traumatismo.**

Tanit Sánchez Martín

El proyecto donde se enmarca la tesis doctoral ha sido financiado por el Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad del Ministerio de Economía y Competitividad (PSI2014-55087-R).

Agradecimientos

A Rufi y Javi. Mis padres. A ellos, que me han brindado todo el cariño y el apoyo inimaginable, que han ido todo el camino conmigo de la mano. Que me han visto caer una y otra vez y me han levantado. Que me han animado y me han dado fuerzas para continuar cuando no veía el final. Gracias por estar siempre a mi lado y enseñarme que en la vida nunca hay nada tan importante, y que vivir es y debe ser mi único objetivo. Os quiero

A Violeta, eres la persona más fuerte y hermosa que conozco, solo un quinto de mi vida no posee un recuerdo sin ti, mi amiga, mi hermana. ¿Recuerdas todos los sueños que teníamos de pequeñas? No sé en qué momento pasamos de jugar en el patio del recreo a ser adultas, pero es toda una vida, nuestra vida. No hay mejor camino que el que hemos seguido, y no habrá otro mejor que el que seguimos formando juntas. Gracias por volar conmigo, a tu lado no tengo, ni tendré nunca miedo a las alturas.

A Marina, cuando te conocí tuve un flechazo similar al que se produce entre las personas que se enamoran, supe de inmediato que eras especial. No me equivoque, a día de hoy aquí sigues, en mi vida, y no sabes lo afortunada que me siento. Mirarte es ver la vida con otros ojos, tu filosofía siempre alegre, tu voz en los conciertos o en el día a día, tu carisma y tu energía siempre clara. Gracias por enseñarme tanto, seguiremos saltando al vacío en cada paso.

A David, mi compañero de vida y gran amigo. Llegaste casi al final, pero has dejado una huella imborrable. Posees la transparencia y la virtud de la simpleza, gracias por hacer que todo sea más fácil, tranquilo y hermoso. Por seguir juntando soledades. Te quiero.

Dani, mi gran amigo, el ser energético con el que he atesorado las mejores charlas sobre la existencia y el devenir del ser. La luz y la templanza propias de un guerrero. La fortaleza de un titán y la vulnerabilidad de un niño. Eres un ser mágico. Porque como diría Don Juan "La confianza de un guerrero no es la confianza del hombre común". Gracias por sentir juntos el camino.

A Paolina, Gastón y Simone, mi querida Santa Rosa, nunca me sentí en Barcelona tanto en casa como cuando viví con vosotros. La positividad y energía de mi niña Paolina que me sorprendía cada día, la tranquilidad y dulzura de mi querido Gastón, y por supuesto, Simone, gracias por poseer siempre la cualidad de generar algo hermoso. Nunca olvidaré todo lo que vivimos los 4, nuestras charlas, nuestro fluir con la vida de manera hermosa y tranquila. Sois parte de mí y os llevaré siempre en un huequito de mi ser.

A mi bonita Maravillas, eres la personita más llena de vida y fuerza que conozco. Nos volvimos a encontrar hace cuatro años en Barcelona después de habernos conocido brevemente en Madrid, y no sabes lo agradecida que estoy de esta casualidad de la vida. Por más lunas llenas y risas a tu lado.

A Elisa y Robert, pocas personas han llegado a mi vida tan de repente y se han quedado tan insertadas en mi ser como vosotros. Sois un ejemplo a seguir en la vida.

A Julia y Blanca. Fuisteis casi desde el principio mi conexión a tierra en Barcelona. Julia mi catalana favorita, con tu preciosa sonrisa siempre en la cara, tus abrazos y espontaneidad, solo tú puede hacer que un día gris se convierta en primavera. Blanca, la más sabia de todas mis amigas, siempre con su carisma ilustrado luchando contra el sistema, eres única.

A Julieta, gracias por enseñarme lo que es la fortaleza y la constancia. Eres de las personas más luchadoras que he conocido en mi vida. Por más momentos juntas y charlas sobre la vida.

A Giulia, Jara y Ana. Sois un Santa Rosa diferente pero no por ello menos importante. Gracias por vuestra intensidad, me dais la vida.

A mis directores. David gracias por tu paciencia, por brindarme tu conocimiento y por estar siempre que lo necesitaba. No todos los momentos han sido fáciles, pero me has enseñado a ser más resiliente y afrontar las cosas con más serenidad. A Meritxell, gracias por tu apoyo, comprensión y empatía. Siempre has sido accesible y me has proporcionado ayuda cuando lo he necesitado. Gracias a ambos por vuestra dedicación y esfuerzo.

A Karlos y Cristina. Gracias por hacerme la vida más fácil en el laboratorio. Siempre dispuestos a ayudar.

A Laura, Sol y Divka. Fuisteis las primeras amigas que tuve en Barcelona, siempre recordare esos primeros años. Hoy nuestros caminos se han alejado, pero no por ello quiero dejar pasar la oportunidad de agradeceros todo lo que viví con vosotras. Laura, siempre serás una persona muy especial para mí, gracias por abrirme las puertas de tu mundo desde el primer día. Sol, gracias por estar siempre, por iluminarme con tu conocimiento y por las bonitas charlas que tenemos, eres sin duda una persona increíble. Divka, gracias por las risas y los buenos momentos, de las personas más diligentes que he conocido nunca. Gracias a las tres por todo lo que fuimos en esos días de tesis y vida.

Gracias a toda la gente de mi departamento. Pilar, Laura, Gemma, Neus, Laia, Ángel... Por todos los momentos y las risas. Y por supuesto a todos los alumnos de prácticas que me han ayudado en estos años con mi trabajo.

Gracias a todas las personas que de alguna u otra forma me han acompañado en este duro proceso que es la tesis doctoral, pero que a su vez tanto me ha enseñado. Ha sido un camino difícil y arduo que finalmente culmina para poder comenzar algo nuevo.

Y, por último, visibilizar las condiciones de los estudiantes de doctorado que en muchas ocasiones realizamos toda la tesis doctoral sin ningún tipo de retribución económica, generando una fuerte presión emocional que en muchos casos se deriva en problemas como ansiedad y depresión.

“Hay una grieta en todo; solo así entra la luz”

Leonard Cohen

Índice

1. PLANTEAMIENTO GENERAL	3
2. DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO	9
2.1 Definición de Daño Cerebral Traumático (TBI) y Datos Epidemiológicos	9
2.2 Clasificación del TBI	10
2.3 Modelos Animales de TBI	13
2.4 Fisiopatología del TBI	17
2.4.1 Procesos Excitotóxicos y Estrés Oxidativo	17
2.4.2 La Respuesta Inflamatoria: Papel de la Microglía y de la Astrogliá	19
3. EJERCICIO FÍSICO	21
3.1 Definición	21
3.2 Modelos Animales de Ejercicio Físico	22
3.3 Ejercicio Físico y Funciones Cognitivas	23
3.3.1 Ejercicio en Sujetos Sanos y Prevención de los Déficits Asociados a un TBI	23
3.3.2 Efectos del Ejercicio Físico como Tratamiento de los Déficits Cognitivos Asociados al Daño Cerebral Traumático	27
3.4 Parámetros Relevantes del Ejercicio Físico en Relación a sus Efectos sobre la Cognición	29
3.4.1 La Intensidad del Ejercicio Físico	29
3.4.2 Inicio del Ejercicio Físico tras el TBI: Inicio Temprano vs Demorado	32
3.5 Mecanismos de Acción del Ejercicio Físico	33
4. MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS: ESTRUCTURAS CEREBRALES IMPLICADAS	39
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
6. TRABAJO EXPERIMENTAL	49
6.1 Material y Métodos	49
6.1.1 Ética y Bienestar Animal	49
6.1.2 Sujetos	49
6.1.3 Administración de Analgésicos por Ingestión Voluntaria	50
6.1.4 Intervención Quirúrgica	50
6.1.5 Ejercicio en Rueda de Actividad	52
6.1.6 Tarea de Memoria de Reconocimiento de Objetos	53
6.1.7 Histología	56
6.1.8 Cronograma del Experimento	66
6.1.9 Análisis Estadísticos	66
7. RESULTADOS	71
7.1 Evolución del Peso de los Animales	71

7.2	Evolución del Ejercicio Físico: Distancia y Tiempo	72
7.3	Memoria de Reconocimiento de Objetos	75
7.3.1	Habitación	75
7.3.2	Neofobia	76
7.3.3	Adquisición	77
7.3.4	Sesión de Retención 1	78
7.3.5	Sesión de Retención 2	79
7.4	Datos Histológicos	80
7.4.1	Evaluación Macroscópica de la Lesión	80
7.4.2	Densidad Neuronal	81
7.4.3	Activación Microglial	86
7.5	Tabla Resumen de Resultados	92
8.	DISCUSIÓN	97
8.1	Efectos del TBI	98
8.2	Efecto del Ejercicio Previo al TBI	100
8.3	Efecto del Ejercicio Posterior al TBI (Inicio Temprano vs Demorado)	102
8.4	Interacción entre Ejercicio Previo y Demora de Inicio del Tratamiento	104
8.5	¿Efectos Neuroprotectores o Neuroreparadores?	106
9.	CONCLUSIONES	113
10.	REFERENCIAS	117

Abreviaturas

AMPA Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ANOVA Análisis de varianza

BDNF Brain-derived neurotrophic factor

BHE Barrera hematoencefálica

CCI Controlled cortical impact

CREB Cyclic AMP response element-binding protein

DAMPs Damage associated molecular patterns

FPI Fluid percussion injury

FSC Flujo sanguíneo cerebral

GD Giro dentado

GFAP Glial fibrillary acid protein

HGF Hepatocyte growth factor

Iba1 Ionized calcium-adaptor 1

IGF-1 Insulin growth factor-1

IL Interleukin

IFN- γ Interferon- γ

LPS lipopolysaccharide

MRO Memoria de reconocimiento de objetos

NeuN Neuronal nuclear protein

NGF Nerve growth factor

NMDA Receptor N-metil-D-aspartat

PRhc Corteza perirrinal

TBI Traumatic brain injury

TNF- α Tumor necrosis factor-alfa

TNF- β Tumor necrosis factor-beta

TLR Toll like-receptor

TrkB Tropomyosin receptor kinase B

RAs Astrocytes reactivos

ROS Reactive oxygen species

SNC Sistema nervioso central

VEGF Vascular endothelial growth factor

WDI Weight drop model

PLANTEAMIENTO GENERAL

1. PLANTEAMIENTO GENERAL

El TBI puede definirse como una alteración en la función del cerebro u otra evidencia patológica cerebral similar causada por fuerzas externas al organismo (Menon et al., 2010). Se estima que cada año casi 69 millones de personas en el mundo sufrirán un TBI, que en su mayoría, será de severidad leve (81%) o moderada (11%) (Dewan et al., 2019). El TBI se considera una de las mayores causas de discapacidad y muerte, sobre todo en la población joven, y supone aproximadamente un 30% de las muertes por lesiones cerebrales (Pervez et al., 2018). Además, las estimaciones indican que una gran proporción de los supervivientes sufrirán secuelas cognitivas a largo plazo como problemas de atención, control ejecutivo, memoria a largo plazo o aprendizaje, deteriorando su calidad de vida (Delmonico et al., 2021; Gorgoraptis et al., 2019; Pavlovic et al., 2019). Es destacable que la cronificación de los síntomas producidos por el TBI se ha relacionado con el desarrollo de diferentes enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Ramos-Cejudo et al., 2018) o de Parkinson (Delic et al., 2020). Por tanto, tras un TBI, las personas pueden sufrir diferentes secuelas tanto a corto como a largo plazo influyendo negativamente en su calidad de vida y, por ello, es necesario desarrollar tratamientos que no solo se centren en la fase aguda disminuyendo la mortalidad, sino también más a largo plazo disminuyendo las secuelas asociadas.

En esta línea, estudios con animales indican que el ejercicio físico puede ser un buen candidato a considerar. El ejercicio físico ha mostrado ser capaz de reducir los déficits cognitivos asociados al daño cerebral de moderado a severo (Jacotte-Simancas et al., 2015; Martínez-Drudis et al., 2021; Y. Zhang et al., 2022) observándose de manera subyacente a esta mejora un aumento de la proliferación celular y de la neurogénesis (Amorós-Aguilar et al., 2020; Fernandes et al., 2017; Griesbach et al., 2004, 2007, 2009; Jacotte-Simancas et al., 2015) como una atenuación de la pérdida de neuronas maduras y de la respuesta inflamatoria en el hipocampo (Amorós-Aguilar et al., 2020). Sin embargo, los parámetros óptimos de aplicación, como el momento de inicio del tratamiento, siguen siendo controvertidos a día de hoy.

De manera general, aquellos estudios en animales en los que el ejercicio físico se inicia de manera demorada, a partir de 4 días postlesión, muestran que este tratamiento es capaz de reducir los déficits cognitivos asociados al TBI (Amorós-Aguilar et al., 2020; Griesbach et al., 2004, 2009; Ko et al., 2018). Sin embargo, aquellos estudios que inician el ejercicio de manera temprana, 1 o 2 días después de la lesión, tienden a mostrar resultados contradictorios, pues mientras unos observan efectos beneficiosos (Chen et al., 2013; Chio et al., 2017; Kim et al., 2010), otros reportan un incremento de los déficits asociados al TBI (Griesbach et al., 2004;

Hicks et al., 1998; Taguchi et al., 2019). Si bien esta disparidad en los resultados puede deberse, en parte, a variaciones en las metodologías utilizadas, la naturaleza de los procesos que ocurren tras un TBI podría ser clave.

La fisiopatología del TBI es bifásica. Inicialmente se produce un daño primario por las fuerzas mecánicas generadas por el impacto sobre el cráneo que se asocia con una pérdida de tejido, hematomas, cambios en el flujo sanguíneo, pérdida de la integridad celular, etc. A consecuencia de este daño primario, se genera un daño secundario que incluye diferentes procesos como estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad, neuroinflamación, degeneración de los axones y muerte por apoptosis (Ng & Lee, 2019). Considerando que el ejercicio físico ha demostrado ser capaz de reducir el daño secundario, es concebible proponer que cuanto antes se pueda iniciar después de la lesión, mejor será el pronóstico a largo plazo. En cambio, se ha propuesto (Griesbach, 2011) que la disfunción mitocondrial que se produce en los primeros momentos tras el traumatismo y su impacto sobre el metabolismo cerebral (Lamade et al., 2020) podrían verse agravados por la introducción muy temprana del ejercicio físico que está asociado a un incremento de la demanda energética.

En este sentido, estudios con animales han mostrado que el ejercicio previo al traumatismo puede aliviar la disrupción metabólica causada por la lesión (Gu et al., 2014; Soltani et al., 2020), además de reducir la neuroinflamación, los procesos de excitotoxicidad, el estrés oxidativo y los déficits de memoria asociados al TBI (Chio et al., 2017; Mota et al., 2012; Taylor et al., 2015; Zhao et al., 2015). Por tanto, si el ejercicio previo a la lesión puede reducir el impacto inicial sobre el metabolismo cerebral, es plausible que interaccione con el ejercicio posterior al traumatismo permitiendo por un lado un inicio temprano del mismo y, por otro, una potenciación de sus efectos beneficiosos cuando el inicio es demorado.

MARCO TEÓRICO

2. DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO

2.1 Definición de Daño Cerebral Traumático (TBI) y Datos Epidemiológicos

El centro de control y prevención de enfermedades de los EE. UU. define el TBI como la disrupción en la funcionalidad cerebral normal producida por un golpe (de leve a grave), una sacudida o una lesión penetrante en la cavidad craneal (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2023). De manera más específica, se puede definir como una condición aguda, repentina e inesperada producida por fuerzas externas al organismo, que genera una alteración tanto en la estructura como en el funcionamiento normal del cerebro, dando lugar a déficits a nivel motor, emocional y cognitivo, que pueden alargarse durante meses e incluso años perjudicando seriamente la calidad de vida del paciente (Gardner & Zafonte, 2016; Menon et al., 2010; Pervez et al., 2018). El TBI se encuentra entre los tipo de lesión más grave debido principalmente a la alta tasa de mortalidad asociada y a las secuelas a largo plazo que desarrollan los supervivientes (Taylor et al., 2017).

Existen grandes variaciones en las tasas de incidencia y mortalidad del TBI entre diferentes países y poblaciones (Brazinova et al., 2021). En cuanto al número de casos totales, se estima que anualmente 69 millones de personas sufren un TBI en el mundo, siendo EE. UU. y Canadá seguidos de los países europeos los que presentan una mayor incidencia (Figura 1).

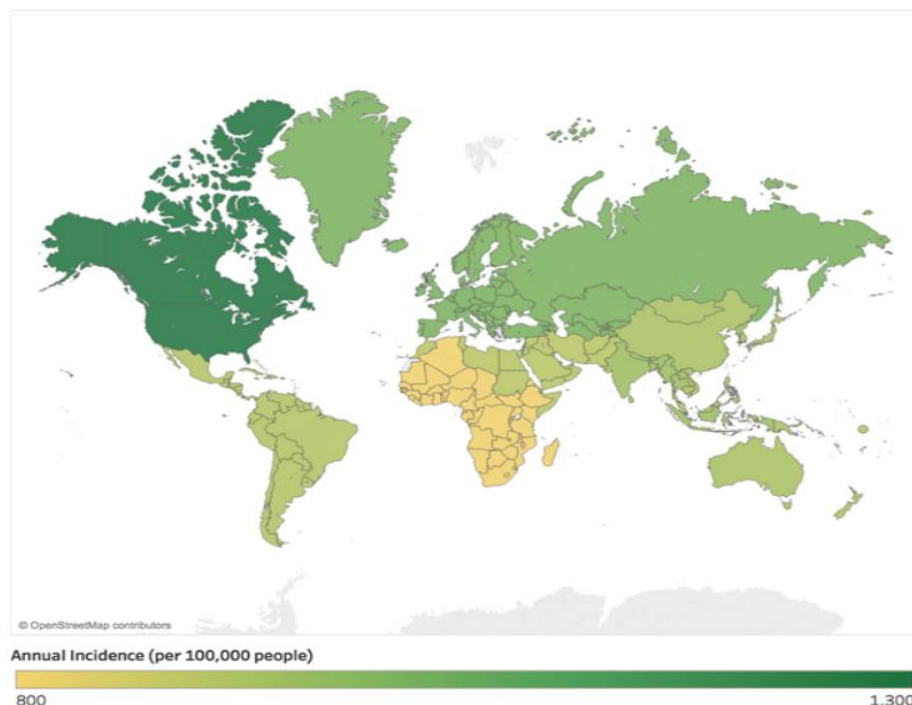


Figura 1. Incidencia mundial del TBI (casos por cada 100.00 habitantes) por países según la OMS (Dewan et al., 2019).

Se debe tener en cuenta que la menor incidencia en países subdesarrollados podría deberse a factores como el acceso a la sanidad, los recursos económicos o las diferencias metodológicas estipuladas a la hora de valorar la incidencia de un TBI, que podrían suponer una infraestimación del número de casos en estos países (Dewan et al., 2019). La mortalidad de un TBI severo es elevada (> 30%) y, aproximadamente, el 60% de los supervivientes sufren consecuencias de por vida que afectan a su bienestar (Maas et al., 2017). Además, el TBI genera un importante impacto económico, tanto por el coste directo debido a las muertes, hospitalizaciones y tratamientos, como por el coste indirecto asociado a las bajas laborales que, en muchos casos, se alargan durante meses (Faul & Coronado, 2015).

2.2 Clasificación del TBI

El TBI se puede clasificar en función de diversos criterios: por la etiología de la lesión, por sus características patológicas, por su clasificación clínica o por su fisiopatología (Saatman et al., 2008).

Según la etiología de la lesión se puede dividir en tres tipos: lesiones abiertas, cerradas o mixtas (Figura 2).

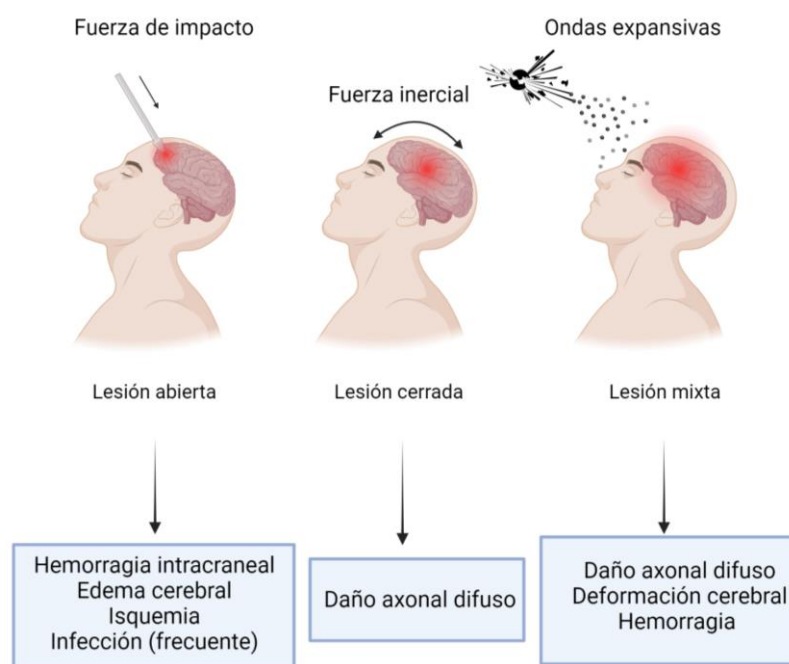


Figura 2. Representación de los tres tipos de lesiones según su etiología (fuerza de impacto, fuerza inercial o por ondas expansivas). Creado con BioRender.com

En las lesiones abiertas, la cabeza es impactada o impacta contra un objeto que penetra dentro de la cavidad craneal y que puede llegar a atravesar tanto la duramadre como el parénquima cerebral. Los daños asociados a este tipo de lesión son principalmente: la

hemorragia intracraneal, el edema cerebral y la isquemia, siendo común la infección por la exposición del tejido al exterior (Capizzi et al., 2020; Young et al., 2015). Las lesiones cerradas sin penetración de un objeto en la cavidad craneal y, por tanto, sin exposición del tejido, se producen como consecuencia de fuerzas inerciales que comprometen la integridad y funcionalidad cerebral. Este tipo de lesión suele asociarse al daño axonal difuso (Blennow et al., 2016; Bruns & Hauser, 2003; Najem et al., 2018). Por último, las lesiones mixtas se producen por las ondas de presión rápidas que se generan tras una explosión. La gran cantidad de energía que se transmite al cráneo unido a la posible salida de metralla genera la aparición tanto de lesiones cerradas como abiertas. Se caracterizan principalmente por producir una gran deformación cerebral, hemorragia y daño axonal difuso (Young et al., 2015).

En base a sus características patológicas, el TBI se divide en daño focal y daño difuso. El daño cerebral focal es producido por las fuerzas de colisión que actúan sobre la cavidad craneal y dan como resultado la compresión del tejido contra el cráneo en el sitio del impacto o bien en el lugar opuesto. Se caracteriza por hematomas subdurales y epidurales, contusiones y hemorragia (Andriessen et al., 2010; McGinn & Povlishock, 2016). Tanto los hematomas subdurales como epidurales son el resultado de la deformación mecánica del tejido y de la disrupción vascular cerebral, dando lugar a un aumento de la presión intracraneal y a la compresión cerebral consecuente (Andriessen et al., 2010). Las contusiones son lesiones hemorrágicas que comienzan dentro de la corteza (comúnmente en las crestas de las circunvoluciones cerebrales) y que en las formas de TBI más graves avanzan hacia la sustancia blanca subcortical. La presencia de hemorragia en las contusiones está asociada a la generación de edema y a cambios isquémicos que conducen a la destrucción de tejido, necrosis neuronal y a la aparición de cavidades rodeadas de una amplia activación glial (McGinn & Povlishock, 2016). En lesiones abiertas, el daño focal se produce en el lugar donde el tejido está en contacto con el objeto penetrante mientras que, en las lesiones cerradas, el daño focal se genera por el contacto del tejido cerebral con las rugosidades de la cavidad ósea (Povlishock & Katz, 2005). Por otro lado, el daño difuso es más disperso y no está relacionado a un foco específico de daño tisular (McGinn & Povlishock, 2016). Este daño se genera por la distorsión (estiramiento, torsión) del tejido asociado a fuerzas de aceleración-desaceleración que producen daño axonal, vascular y neuroinflamación (Andriessen et al., 2010; Nortje & Menon, 2004). El daño axonal difuso puede verse agravado a su vez por el aumento de la presión intracraneal, la disminución del FSC y la hipoxia (Povlishock & Katz, 2005).

Según la clasificación clínica, el TBI suele dividirse en función de su gravedad. Históricamente, esta se ha evaluado con la escala de coma de Glasgow (GCS), que se rige principalmente por el estado de consciencia del paciente (Teasdale & Jennett, 1974). La GCS examina

principalmente las respuestas motoras y verbales del paciente y el movimiento ocular tras el traumatismo (Gardner & Zafonte, 2016). Según las puntuaciones obtenidas, el TBI se divide en diferentes grados de severidad: grave (3-8), moderado (9-12) o leve (13-18), siendo el leve el que muestra una mayor incidencia y conforma hasta el 80% del total de casos de personas con un TBI (Gardner & Zafonte, 2016). Junto con la GCS, otras medidas muy utilizadas para valorar la severidad del TBI son la duración de la pérdida de consciencia, la amnesia postraumática y los resultados obtenidos a través de las pruebas de resonancia magnética funcional (Capizzi et al., 2020) (Tabla 1).

	GSC (≤ 24 h)	Pérdida de consciencia	Alteraciones de la consciencia	Amnesia postraumática
LEVE (80 %)	13-15	0-30 min	< 24 h	<1 día- 1 día
MODERADO (10 %)	9-12	> 30 min < 24 h	> 24 h	>1 día- < 7 días
GRAVE (10 %)	3-8	> 24 h	> 24 h	> 7 días

Tabla 1. Clasificación del TBI según su gravedad, adaptación de (Capizzi et al., 2020). GCS: Glasgow Coma Scale. Creado con BioRender.com

Según la fisiopatología del TBI se suele distinguir entre el daño primario y el secundario (Figura 3).

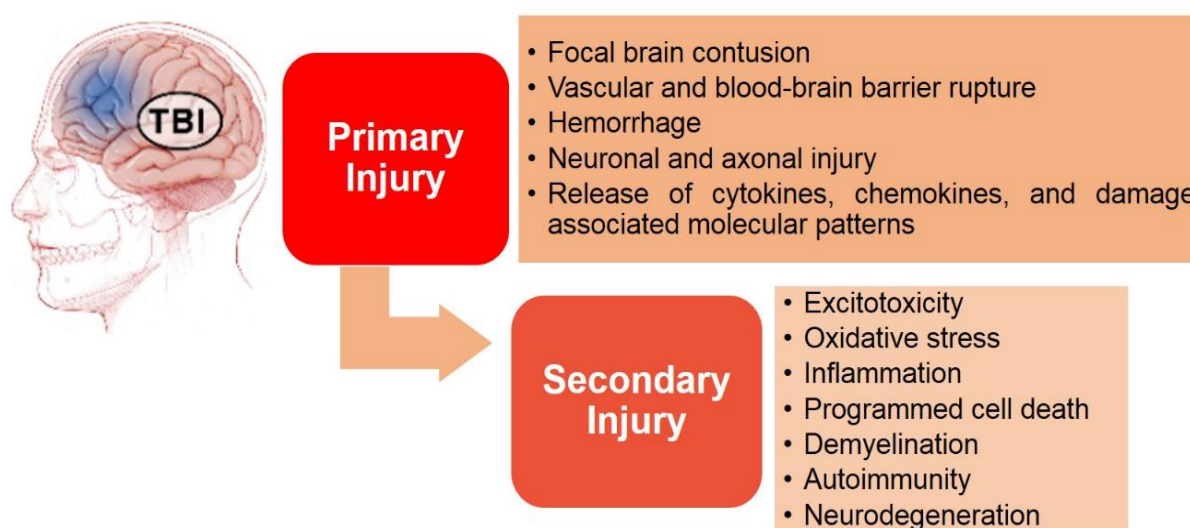


Figura 3. Según su fisiopatología se distingue entre el daño primario, que se produce directamente por la fuerza mecánica que genera la lesión, y el daño secundario, consecuencia del primario. Aunque se estudien de manera separada ambos procesos conforman un continuo difícilmente separable en el tiempo (Modificado de Jarrahi et al., 2020).

El daño primario se inicia en el mismo momento de producirse el traumatismo y es consecuencia directa de la deformación del tejido cerebral. Incluye laceraciones, contusiones, hemorragias, fracturas, daño neuronal y axonal, además de la liberación de diferentes citoquinas y patrones moleculares asociados al daño (Jarrahi et al., 2020; Ng & Lee, 2019; O'Connor et al., 2011). El daño secundario es consecuencia de este primer daño y da lugar a la activación de diferentes eventos fisiopatológicos, entre los que se incluye la isquemia, el edema, la inflamación, procesos de excitotoxicidad y estrés oxidativo con la consecuente pérdida de la función celular, muerte por apoptosis y neurodegeneración (Jarrahi et al., 2020; O'Connor et al., 2011).

2.3 Modelos Animales de TBI

Como mencionamos anteriormente, el TBI es una condición adquirida y compleja que genera situaciones muy heterogéneas en la clínica, siendo difícil la creación de modelos animales de daño cerebral traumático que reproduzcan todo el espectro de cambios que se observa en humanos (Capizzi et al., 2020; O'Connor et al., 2011). A su vez, las diferencias tanto anatómicas como funcionales entre el cerebro humano y el de otros animales hace complicada la extrapolación de los resultados al ámbito clínico (Ma et al., 2019; Risling et al., 2019). Sin embargo, los modelos animales son una poderosa herramienta para poder estudiar el TBI de manera controlada, rigurosa y eficiente (Risling et al., 2019). A continuación, expondremos los modelos más utilizados actualmente para generar un TBI en animales.

Modelo de impacto por caída libre de un peso

El modelo de WDI es considerado el primer modelo animal de TBI. Utiliza la fuerza gravitatoria ejercida sobre un peso en caída libre desde una altura predeterminada para generar una lesión cerebral focal (Feeney et al., 1981; Najem et al., 2018). Existen dos versiones de este modelo, una en la que se realiza una craneotomía para dejar la duramadre expuesta y otra en la que se deja el cráneo intacto (Morales et al., 2005). La severidad de la lesión está asociada tanto a la cantidad de peso utilizado como a la altura desde donde se deja caer. Además, el ángulo del impacto y las fracturas de cráneo resultantes pueden influir en las características de la lesión (Chiu et al., 2016). Las lesiones suelen presentar hemorragias en las primeras horas tras el daño y suelen progresar en las primeras 24 h hasta dar lugar a cavidades necróticas (Feeney et al., 1981). La evaluación histológica muestra pérdida de células corticales directamente debajo de la zona de impacto y en regiones cercanas al lugar de la lesión, como el hipocampo (Tang et al., 1997). Además, se asocia con deficiencias cognitivas tanto a largo como a corto plazo (Khalin et al., 2016).

Este modelo fue descrito por primera vez por Feeney como un modelo de daño focalizado (Feeney et al., 1981). Posteriormente, se han realizado adaptaciones, como la realizada por Marmarou, que incorpora un disco metálico sobre la cavidad craneal para disipar la fuerza del impacto y evitar fracturas óseas debidas a la caída del objeto (Marmarou et al., 1994) (Figura 4). Con el modelo de Marmarou se consigue replicar el daño axonal difuso y el posterior edema cerebral que se observa tras un TBI producido por caídas y accidentes de tráfico (Viano et al., 2012; Wang et al., 2010).

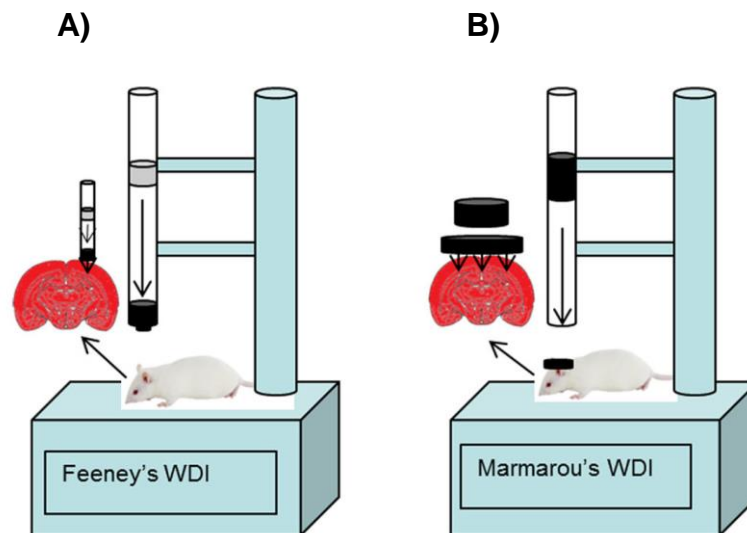


Figura 4. A) Modelo por caída de peso de Feeney. B) Modelo por caída de peso de Marmarou. (Ma, Xiaotang et al., 2019).

Las ventajas de este modelo son su sencillez de realización y que reproduce fielmente el daño asociado a una contusión (Morales et al., 2005). Como principales desventajas se encuentran la posibilidad de fragmentación del cráneo y, en el modelo de Feeney, la posibilidad de que se produzca un rebote de la pesa sobre la cavidad craneal tras el primer impacto (Feeney et al., 1981).

Modelo de impacto cortical controlado

Este modelo, que se caracteriza por generar lesiones focalizadas, fue desarrollado a finales de los años 80 y a día de hoy sigue siendo uno de los modelos de TBI más utilizados (Osier & Dixon, 2016). El dispositivo utilizado para realizar un CCI se compone de un cilindro neumático de recorrido restringido, unido a un pistón con una punta de diámetro variable según la especie animal (Lighthall, 1988). En primer lugar, se realiza una craneotomía para dejar expuesta la duramadre, que será donde impactará la punta del pistón una vez sea activado el dispositivo. La gravedad de la lesión dependerá de la duración, la profundidad y la velocidad con la que baje el cilindro neumático (Cherian et al., 1994), produciendo una lesión focalizada controlada con precisión (Ma et al., 2019). Además, el uso de un marco

estereotáxico permite controlar la ubicación de la lesión (Dean et al., 2017). Por tanto, la posibilidad de poder ajustar todos estos factores hace que el modelo de CCI posea un alto nivel de precisión y reproducibilidad (Figura 5).



Figura 5. Dispositivo de impacto cortical controlado (Ma et al., 2019).

El modelo de CCI logra replicar buena parte de los daños asociados a un TBI humano, como son la pérdida de tejido, el hematoma subdural agudo, la lesión axonal, la disrupción de la BHE y el edema, así como el progreso de diferentes eventos fisiopatológicos como la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial y el daño neuronal (Acosta, Diamond, et al., 2013; Edward Dixon et al., 1991; Lighthall, 1988; Yu et al., 2009). A pesar de que el CCI es considerado fundamentalmente un modelo de daño cerebral focal, diferentes estudios indican que los cambios fisiopatológicos se extienden a otras regiones, incluso del hemisferio contralateral (Harris et al., 2016; Pischitta et al., 2018; Turtzo et al., 2013). Además, el modelo de CCI logra reproducir buena parte de los déficits cognitivos asociados al TBI, como los déficits de memoria (Amorós-Aguilar et al., 2015).

Las ventajas de este modelo radican principalmente en su alto grado de control de los parámetros biomecánicos (velocidad, tiempo y profundidad) del impacto, la aplicabilidad del modelo en diferentes especies y que no genera daño por rebote (Dean et al., 2017).

Modelo de daño por explosión

En este modelo el animal se expone a la onda expansiva de una explosión. Para ello, es colocado dentro de un cilindro que presenta un extremo cerrado en contacto con un detonador. Los parámetros utilizados para controlar la severidad de la lesión incluyen la presión máxima, la duración y la forma del pulso (Risling et al., 2019) (Figura 6).

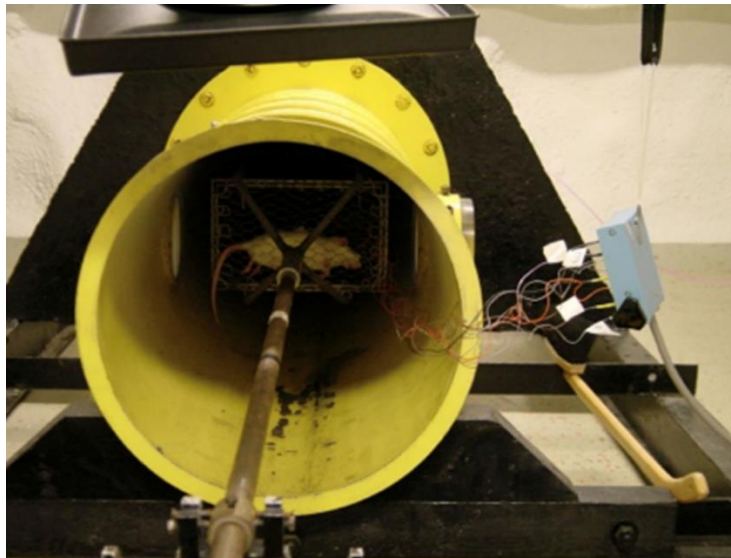


Figura 6. Dispositivo para reproducir un daño por explosión (Risling et al., 2019).

Este modelo produce daño cerebral difuso, neuroinflamación y pérdida neuronal, asociándose con una pérdida de memoria a corto plazo (Matsuura et al., 2021).

Modelo por perfusión de fluido

En un principio, el modelo por FPI (Figura 7) se desarrolló para generar lesiones focales, sin embargo, en muchos casos la energía liberada en el impacto está asociada con daño axonal difuso. Por ello, está catalogado como un diseño cerebral traumático mixto (Hicks et al., 1996).

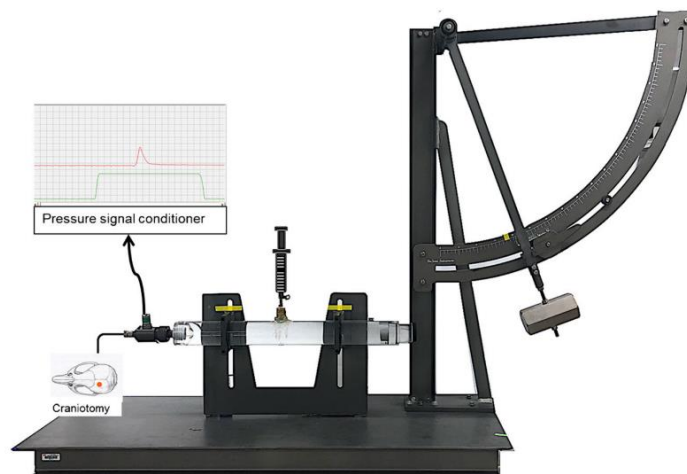


Figura 7. Dispositivo para lesiones por perfusión de fluidos (Ma et al., 2019).

El dispositivo utilizado en este modelo consta de un péndulo que, al ser activado, golpea un pistón que se encuentra en el extremo de un depósito de líquido que es impulsado a una presión constante, a través de un circuito cerrado, directamente sobre la duramadre

(Thompson et al., 2005). El pulso de presión del fluido determina la gravedad de la lesión. Un mayor pulso de presión generará un mayor desplazamiento del tejido y una mayor deformación cerebral (Dixon et al., 1987).

El modelo por FPI genera daño neuronal en zonas localizadas y el posterior progreso del daño a zonas más distantes de la lesión. Se asocia con daño axonal difuso, neuroinflamación y edema en el parénquima cerebral (Alder et al., 2011; Spain et al., 2010). Además, logra reproducir la degeneración de regiones especialmente vulnerables al daño como el hipocampo, el tálamo, el estriado y la amígdala (Hicks et al., 1996; Thompson et al., 2005), pudiendo con ello estudiar la relación entre la pérdida de funcionalidad de estas regiones y los déficits cognitivos asociados (Alder et al., 2011; Morales et al., 2005; Spain et al., 2010).

La principal ventaja de este modelo es su gran fiabilidad, ya que, a pesar de las sutiles variaciones en los parámetros de lesión entre laboratorios, los resultados obtenidos en cuanto a los cambios histológicos, fisiológicos, metabólicos y de comportamiento son siempre similares (Thompson et al., 2005).

2.4 Fisiopatología del TBI

La fisiopatología del TBI es un proceso complejo que engloba diferentes cambios moleculares y celulares que se desencadenan como consecuencia del traumatismo.

2.4.1 Procesos Excitotóxicos y Estrés Oxidativo

Una de las principales consecuencias de una lesión traumática es el daño en la vasculatura cerebral. La ruptura de los vasos sanguíneos por las fuerzas mecánicas del trauma compromete de manera importante el sistema vascular cerebral produciéndose una pérdida de la autorregulación cerebrovascular (Salehi et al., 2017). El FSC se reduce inmediatamente tras un TBI (Soustiel et al., 2005) y, dependiendo de la gravedad y la extensión de la lesión, esta reducción se puede prolongar en el tiempo con consecuencias fatales para el paciente (Bonne et al., 2003).

La regulación del FSC es esencial para el mantenimiento de la función cerebral normal. En condiciones normales, el flujo sanguíneo es de $45\text{-}50\text{ ml } 100\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$ y su mantenimiento alrededor de este valor es fundamental para la homeostasis cerebral. Para ello, el cerebro tiene mecanismos para adecuar el FSC al consumo de oxígeno cerebral (acoplamiento flujo/consumo). Sin embargo, ante un TBI, el organismo puede perder esta capacidad de regulación y, con ello, sufrir una reducción del FSC (Soustiel et al., 2005). Cuando está reducción sitúa el FSC por debajo de $45\text{-}50\text{ ml } 100\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$, el aporte de oxígeno a los tejidos

va disminuyendo. Una de las principales consecuencias de la falta de oxígeno es el fallo energético por la paralización del ciclo de Krebs y la consecuente disminución de la producción de ATP. Esta disminución reduce el funcionamiento de las bombas iónicas y produce una reducción repentina de los gradientes de iones transmembrana (despolarización anóxica), generando una liberación de glutamato (Allen et al., 2005). Además, al no poder obtener energía mediante la vía aeróbica, el organismo trata de conseguir energía mediante la metabolización anaeróbica de la glucosa, generando un aumento y acumulación en el torrente sanguíneo de ácido láctico, el cual causa acidosis y edema (Zetterberg et al., 2013). Junto con estos mecanismos, la propia fuerza mecánica que genera el estiramiento de las neuronas y de sus axones, también produce una despolarización de la membrana lo que aumenta todavía más la concentración de glutamato extracelular (Krishnamurthy & Laskowitz, 2016; Wang et al., 2016). La mayor disponibilidad a largo plazo de este neurotransmisor genera una sobreestimulación de los receptores glutamatérgicos, especialmente de los receptores NMDA y AMPA, lo que supone una entrada masiva de Ca^{2+} al espacio intracelular. Esta entrada de Ca^{2+} genera la activación de diferentes enzimas catabólicas como las fosfolipasas (produciendo daño en las membranas celulares y mitocondriales), las proteasas (generando daño en el citoesqueleto) y las endonucleasas (produciendo fragmentación del ADN), generando una respuesta molecular conocida como excitotoxicidad que puede llevar a la muerte celular (O'Leary & Nichol, 2018; Wang et al., 2016; Zetterberg et al., 2013). El aumento sostenido de la entrada de Ca^{2+} y el deficiente funcionamiento de las bombas iónicas pueden llegar a superar la capacidad de la célula para regular los niveles de Ca^{2+} . El incremento de este ion activa la cadena de respiración celular y, en consecuencia, se produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive oxygen species*) y de nitrógeno (Ansari et al., 2008; Rueda et al., 2016).

Las ROS son radicales libres con un alto poder oxidativo y normalmente son eliminadas en las neuronas por los antioxidantes. Sin embargo, el exceso de producción de las ROS tras un TBI, genera un desequilibrio entre las ROS y los antioxidantes dando lugar a la peroxidación de lípidos, a la carbonización de proteínas y a la oxidación del ADN, produciendo cambios en la permeabilidad y fluidez de las membranas celulares (Rueda et al., 2016) (Figura 8). Por otro lado, los aldehídos reactivos procedentes de la peroxidación lipídica, aumentan la permeabilidad de la BHE, provocan cambios en el citoesqueleto neuronal y alteran el transporte de glucosa a través de las membranas, produciendo una exacerbación del daño secundario asociado al TBI (Mustafa et al., 2010).

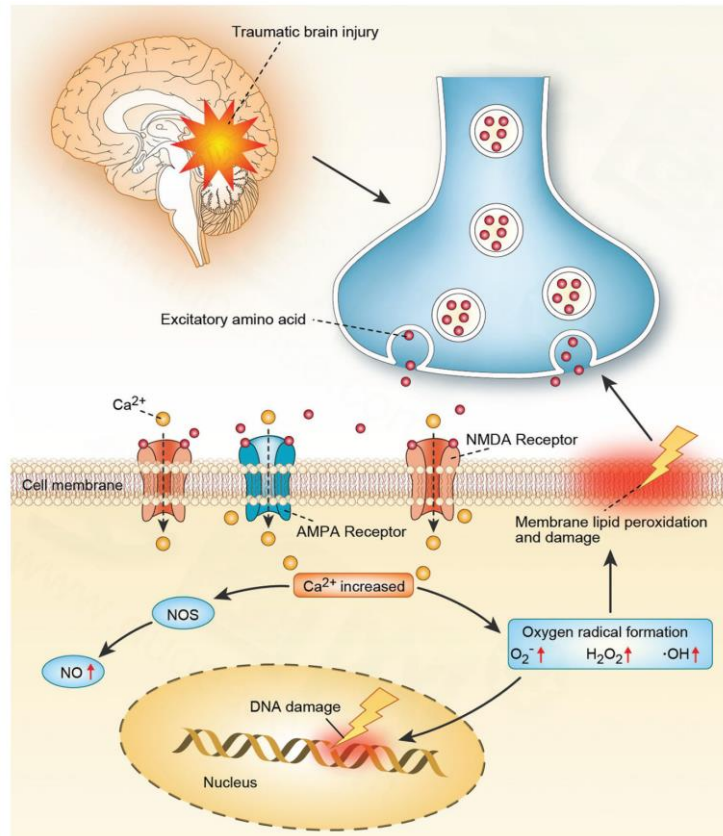


Figura 8: El daño primario genera una despolarización de la membrana que conlleva la liberación indiscriminada de aminoácidos excitatorios activando los receptores NMDA y AMPA. La activación de estos receptores produce la entrada de Ca^{2+} al interior celular promoviendo la producción de ROS. La presencia de estos radicales libres genera un ambiente inestable que puede provocar daño en las membranas celulares y en el ADN. Además, el influjo de Ca^{2+} incrementa la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa que se halla involucrada en la generación de óxido nítrico. El óxido nítrico puede participar en la peroxidación lipídica y en las reacciones de las ROS en células adyacentes, promoviendo la liberación de más aminoácidos excitatorios (Wang et al., 2016).

2.4.2 La Respuesta Inflamatoria: Papel de la Microglía y de la Astroglía

La neuroinflamación es una respuesta fisiológica innata que ayuda a proteger al organismo de una infección o lesión. Sin embargo, tras un TBI se produce una respuesta inflamatoria extendida en el tiempo que puede generar una disfunción neuronal (Vedantam et al., 2021). Esta respuesta inflamatoria está mediada por células del propio sistema nervioso central como la microglía y los astrocitos, y por células del sistema inmune como los leucocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos) que se infiltran dentro del SNC al verse debilitada la BHE (Shields et al., 2020).

Las células dañadas por el traumatismo liberan patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, *Damage associated molecular patterns*) que se convierten en potentes estímulos inflamatorios (Z. Zhang et al., 2011). Los DAMPs son reconocidos por los receptores TLR de las células microgliales y astrocitos alrededor de la zona dañada, activando diferentes vías de señalización. Como resultado, se produce la transcripción de genes que codifican diferentes citoquinas pro y antiinflamatorias, y una activación de más células gliales que amplifican la

respuesta inflamatoria (Ladak et al., 2019). En función del predominio de las señales pro o antiinflamatorias en el entorno, las células de microglía tendrán un estado de activación con perfil M1, M2 o mixto. Ante la presencia de moléculas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-13, la microglía adquiere una conformación M2, liberando citoquinas antiinflamatorias, como el TNF- β , y factores neurotróficos como el VEGF, IGF-1, NGF, HGF o el BDNF, promoviendo la neuroreparación, la neurogénesis (Chiu et al., 2016; Donat et al., 2017), y la fagocitosis de restos de células muertas (Karve et al., 2016). En cambio, ante el predominio de moléculas proinflamatorias como el LPS y el IFN- γ , la microglía adopta la conformación M1 produciendo la liberación de gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como las IL-1 β e IL-2, el TNF- α y de diferentes quimioquinas como la CCL2, CXCL9 y CXCL10 (Loane & Kumar, 2016). Esta conformación proinflamatoria aumenta los niveles de agentes oxidantes (ROS, *Reactive oxygen species*) que, sumados a los producidos por el daño mitocondrial, aumentan el estrés oxidativo y con ello la neurodegeneración (Loane & Kumar, 2016) (Figura 9).

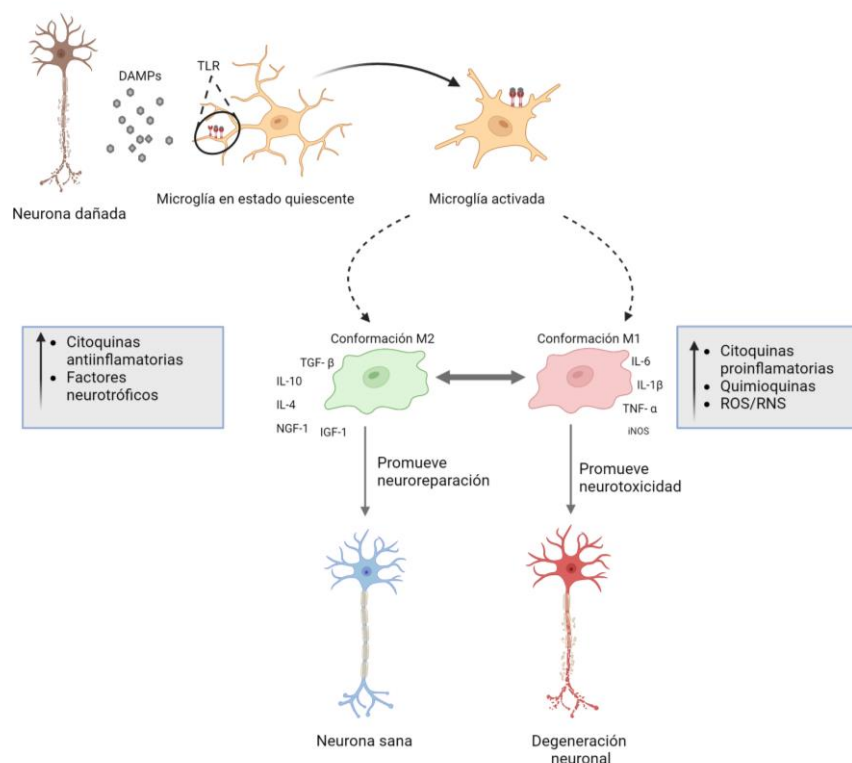


Figura 9. Respuesta y activación microglial ante un TBI. Después de un traumatismo, las células dañadas liberan los DAMPs que se unen a la familia de receptores TLR expresados en la microglía y los astrocitos. En el SNC las células de microglía son las primeras en reaccionar ante un daño. La microglía activada tiene dos estado, M1 (proinflamatorio) M2 (antiinflamatorio) o mixto. Creado con BioRender.com

La liberación de citoquinas proinflamatorias también puede inducir la liberación de glutamato por parte de la microglía, potenciando el efecto excitotóxico y exacerbando el daño secundario (Takaki et al., 2012).

Algunos estudios han demostrado que la microglía puede mantener un perfil proinflamatorio durante semanas e incluso meses después de desaparecer los efectos agudos de la lesión, lo que puede llevar a cambios degenerativos progresivos y a una morbilidad crónica del paciente, junto con una mayor vulnerabilidad a un daño posterior (Witcher et al., 2015).

Aunque las células de microglía son las primeras células gliales que responden ante un proceso inflamatorio por su alta sensibilidad a los cambios en el microambiente circundante, los astrocitos también juegan un papel importante (Michinaga & Koyama, 2021). En condiciones normales, los astrocitos se ocupan de mantener la homeostasis iónica, el control del flujo sanguíneo en el SNC, dan soporte estructural a las neuronas y proporcionan la separación entre el SNC y el sistema vascular mediante la barrera de glía limitante (Sofroniew, 2015). Además, poseen un papel muy importante de soporte funcional a las neuronas ya que reciclan el exceso de neurotransmisores que se halla en el espacio sináptico y que, de no retirarse, puede tener un efecto perjudicial sobre la neurona, como en el caso del exceso de glutamato (Zou et al., 2010). Ante un daño tisular, los astrocitos sufren una astrogliosis reactiva hipertrófica que incluye cambios moleculares, estructurales y funcionales (Burda et al., 2016; Zhou et al., 2020). Los astrocitos activados pueden mostrar secuencialmente dos tipos de fenotipos histológicos, primero convirtiéndose en RAs y más adelante en astrocitos conformadores de cicatrices (Hara et al., 2017). Ambas conformaciones están asociadas a una mayor expresión de diferentes proteínas como son la GFAP o la nestina (proteína fibrosa), entre otras, siendo la alta expresión de GFAP y la aparición de hipertrofia celular los criterios necesarios para definir la presencia de los RAs (Liddelow et al., 2017). De forma similar a la microglía, los RAs pueden presentar dos conformaciones con perfiles opuestos. Por un lado, existe una conformación neurotóxica (A1), inducida por la liberación de diferentes citoquinas proinflamatorias por parte de la microglía reactiva, y una conformación neuroprotectora (A2) relacionada con la liberación de diferentes neurotrofinas y la absorción del exceso de glutamato (Fan & Huo, 2021; Liddelow et al., 2017; Myer et al., 2006). Los efectos neurotóxicos asociados a la activación de los astrocitos se deben no sólo a la acción de los astrocitos RAs con conformación A1, sino también a la secreción de citoquinas por parte de las cicatrices gliales en las zonas aledañas al daño (O'Shea et al., 2017).

3. EJERCICIO FÍSICO

3.1 Definición

La actividad física se define como cualquier movimiento corporal que se produce por la acción muscular esquelética y que conduce al consumo de energía (Caspersen et al., 1985). A nivel evolutivo, la actividad física ha demostrado ser un factor importante para la supervivencia del

ser humano. La necesidad de movimiento parece estar programada en nuestros genes siendo probable que el genoma humano haya evolucionado para poder soportar un aumento de las demandas metabólicas asociadas con la caza y la búsqueda de alimento (Neel, 1999). Por ejercicio físico se entiende la actividad física que está planificada, estructurada, es repetitiva y tiene como objetivo final o intermedio la mejora o el mantenimiento de la condición física (Caspersen et al., 1985). El impacto positivo que el ejercicio puede generar a nivel físico ha sido ampliamente estudiado, y desde la década de los noventa se ha observado una relación entre el ejercicio físico y la neuroplasticidad. En 1995, Neeper et al., publicaron una pequeña nota en la revista Nature en la que indicaban, por primera vez, que el ejercicio físico podía incrementar la expresión de BDNF en zonas del cerebro de las ratas, como el hipocampo y la corteza. Los autores asociaron el ejercicio físico con una potenciación de la neuroplasticidad (Neeper et al., 1995), sentando así las bases de posteriores investigaciones.

3.2 Modelos Animales de Ejercicio Físico

En los estudios con animales, principalmente roedores, normalmente se utilizan dos paradigmas de ejercicio: el forzado y el voluntario (Alkadhi, 2018).

Modelos de ejercicio voluntario

En los estudios con roedores se suelen utilizar ruedas de actividad a las que los animales tienen acceso ilimitado o limitado a unas horas del día. Estas ruedas suelen incorporar un sistema de registro de los valores de ejercicio, como la distancia recorrida y el tiempo de ejercicio del animal (De Bono et al., 2006). Este modelo está ampliamente descrito en roedores, que muestran un patrón de actividad espontánea que varía a lo largo del tiempo con un pico de actividad a las 4-5 semanas desde su inicio y que suele mantenerse hasta las 7-8 semanas. A partir de este momento, se observa una disminución progresiva en la distancia y la duración de la carrera de actividad espontánea hasta caer por debajo de los 3 km diarios a partir de los 7-8 meses de edad (Mondon et al., 1985). También se ha observado que el momento del día es un factor importante, siendo en las horas de oscuridad cuando se produce una mayor actividad, especialmente entre la primera y la tercera hora (Mondon et al., 1985). La principal ventaja del uso de ejercicio voluntario en comparación con el forzado es que se relaciona con una menor respuesta de estrés de los animales ya que frecuentemente en los modelos forzados se utilizan pequeños estímulos aversivos para hacer que los animales corran, por ejemplo, en una tapiz rodante (Griesbach et al., 2012). Por otro lado, hay que tener en cuenta que, para poder registrar la cantidad de ejercicio de cada animal, suelen estabularse individualmente, si bien en los últimos años se ha introducido la utilización de chips que permiten realizar un registro individual evitando así la estabulación individual.

Modelos de ejercicio forzado

El ejercicio forzado se suele realizar mediante tapiz rodante, rueda motorizada o natación forzada, y permite controlar por parte del experimentador los diferentes parámetros del ejercicio (Murínová et al., 2017). El método más utilizado es la tapiz rodante, donde se fuerza al animal a correr durante un tiempo, a una velocidad y con un ángulo de inclinación determinados. Los animales pasan por un periodo de adaptación al tapiz donde la intensidad se aumenta progresivamente hasta llegar a los parámetros establecidos previamente (Abreu et al., 2016; de Bono et al., 2006). En cambio, en la natación forzada solamente se puede controlar el tiempo que el animal pasa en el agua (Murínová et al., 2017). Como hemos comentado, la ventaja de los modelos de ejercicio forzado es que permiten ajustar con precisión la intensidad y/o la duración de la actividad física. Sin embargo, en algunas ocasiones se suele utilizar un pequeño choque eléctrico para evitar que el animal deje de hacer ejercicio, lo que puede generar una mayor respuesta de estrés (Griesbach et al., 2012).

3.3 Ejercicio Físico y Funciones Cognitivas

3.3.1 *Ejercicio en Sujetos Sanos y Prevención de los Déficits Asociados a un TBI*

Existe una amplia evidencia en estudios en animales que indica que el ejercicio físico es capaz de mejorar diferentes funciones cognitivas, especialmente el aprendizaje y la memoria espacial en tareas dependientes del hipocampo como el laberinto acuático de Morris. En este tipo de tareas, los animales deben aprender la localización de una plataforma que se halla sumergida, en función de la configuración espacial de diferentes estímulos ambientales (Cassilhas et al., 2016). Diferentes estudios han indicado que el ejercicio forzado tiene un efecto positivo en la ejecución de esta tarea (Ang et al., 2006; Asl et al., 2008; Fordyce & Wehner, 1993; Qi et al., 2020; Uysal et al., 2005). Es el caso del siguiente estudio (Ang et al., 2006) realizado en ratas utilizando la versión de un día de la prueba del laberinto acuático de Morris tras un periodo de 12 semanas de ejercicio forzado en tapiz rodante. Esta prueba consta de tres bloques de cuatro ensayos separados por 30 min entre bloques y de una prueba de retención 30 min después del último bloque de ensayos, donde el animal se somete a un solo ensayo de 60 s. Los resultados indicaron que, en comparación con los animales sedentarios, los animales del grupo de ejercicio mostraron una reducción del tiempo necesario para la adquisición de la tarea espacial y que, en la sesión de retención, pasaron un porcentaje de tiempo mayor en el cuadrante donde se situaba la plataforma durante los ensayos de adquisición. Sin embargo, algunos trabajos que han utilizado el ejercicio forzado han indicado que este tipo de ejercicio no es capaz de promover el aprendizaje espacial (Leasure & Jones, 2008; Ni et al., 2011). Cabe destacar que la intensidad podría ser un factor importante a la

hora de observar este efecto beneficioso del ejercicio forzado sobre el aprendizaje espacial. Así, Bluestein et al., (2006) observaron que los animales con ejercicio forzado de alta intensidad realizaron un mayor recorrido para encontrar la plataforma que aquellos que habían realizado un ejercicio de intensidad baja, por tanto, el ejercicio de alta intensidad deteriora la realización de esta prueba y no fomenta el aprendizaje espacial. Este aspecto será tratado con más detalle en el apartado 3.4.1.

En relación al ejercicio voluntario, la mayoría de estudios también indican efectos beneficiosos sobre el aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris, aun cuando la duración del ejercicio varíe desde unos pocos días hasta meses. Por ejemplo, en un estudio de Vaynman et al. (2004), el tratamiento de 7 días de ejercicio voluntario redujo la latencia a encontrar la plataforma en la adquisición y aumentó el tiempo, en la prueba de retención, en el cuadrante donde previamente se hallaba la plataforma. Además, el grupo de ejercicio presentó un aumento de los niveles de BDNF y CREB asociados a la plasticidad. Efectos similares sobre el aprendizaje y la memoria espaciales también se obtuvieron tras 28 días (Liu et al., 2009) o tras 2 meses de ejercicio voluntario (Molteni et al., 2004).

Otra de las pruebas utilizadas para valorar el efecto del ejercicio sobre tareas dependientes del hipocampo es el laberinto radial o su versión acuática. Estas pruebas se realizan en un laberinto elevado en forma de estrella con un determinado número brazos (generalmente 8), en el que los animales deben aprender la localización de un reforzador en función de la configuración espacial de señales externas al laberinto. Una buena ejecución de la tarea se caracteriza por visitar solo los brazos reforzados y recordar si ya han sido visitados para no repetirlos. Estudios con ejercicio forzado han observado efectos beneficiosos (Alomari et al., 2013; Khabour et al., 2013; Sampedro-Piquero et al., 2013). Así, el ejercicio físico realizado mediante un procedimiento de natación forzada donde cada animal realizaba un entrenamiento en el que se debía nadar y descansar 5 min alternativamente durante 60 min al día (5 días/semana) por un periodo de 6 semanas, redujo el número de errores durante la fase de adquisición y durante las sesiones de retención (tanto a los 30 min, como a las 5 y 24 h), indicando que el ejercicio forzado mejoró el aprendizaje espacial e incrementó la memoria tanto a corto, como a medio y largo plazo (Alomari et al., 2013). Similares resultados se encontraron en otro trabajo realizado con ejercicio forzado en el tapiz rodante, donde aquellos animales que formaban parte del grupo con protocolo de ejercicio mejoraron el rendimiento en la tarea del laberinto acuático radial de 4 brazos, mostrando un porcentaje mayor de entradas en los brazos correctos que el grupo sedentario (Sampedro-Piquero et al., 2013). Estos efectos beneficiosos también se han observado en animales de edad avanzada (Tunca et al., 2021; Vanzella, Neves, et al., 2017; Vanzella, Sanches, et al., 2017). En trabajos con

ejercicio voluntario, también se observaron efectos beneficiosos tras 3 (Schweitzer et al., 2006) o 6 semanas de tratamiento (Khabour et al., 2010).

Para valorar la memoria y el aprendizaje no espaciales existen otras pruebas como son el paradigma de evitación pasiva y la prueba de memoria de reconocimiento de objetos. La MRO se basa en la tendencia espontánea de los roedores por explorar aquello que es novedoso, y evalúa la capacidad del animal para recordar si un objeto ha sido presentado previamente. La versión estándar de esta tarea no tiene un fuerte componente espacial relacionándose principalmente con la PRhc (Winters et al., 2008). Sin embargo, es posible hacer modificaciones para aumentar la implicación del hipocampo, ya sea modificando la configuración del espacio en el que se realiza la tarea para aumentar la carga espacial (Clarke et al., 2010) o aumentando la demora entre la adquisición y la prueba de retención (Cohen & Stackman, 2015). Diferentes experimentos han puesto de manifiesto que el ejercicio físico tanto voluntario como forzado puede mejorar la ejecución de los animales en esta tarea. Por ejemplo, Hopkins & Bucci (2010) observaron una facilitación de la MRO en un grupo de animales con 4 semanas de ejercicio voluntario. Resultados similares se obtuvieron en un trabajo realizado en nuestro laboratorio donde los animales tras 6 semanas de ejercicio voluntario moderado mejoraron la retención tanto 24 como 72 h tras la adquisición de la tarea de MRO (García-Capdevila et al., 2009). Estos efectos beneficiosos del ejercicio voluntario sobre tareas no espaciales también se observan en animales adolescentes, en los que el efecto parece ser incluso más duradero que en los animales adultos (Hopkins et al., 2011). Finalmente, los animales de edad avanzada (ratas de 24 meses) también se benefician de este tipo de tratamiento como muestra el trabajo de Kim et al. (2010) en el que 6 semanas de ejercicio forzado mejoraron una tarea de evitación pasiva, además de potenciar la neurogénesis en el GD del hipocampo.

Los resultados en humanos siguen la línea de lo observado en animales. Así, el ejercicio físico ha demostrado potenciar en niños, adolescentes y adultos, funciones cognitivas como la función ejecutiva, la atención, el aprendizaje y la memoria (Chang et al., 2009; Chang et al., 2012; Hopkins et al., 2012). Generalmente la mayoría de estudios con ejercicio físico son de intervención, donde un grupo de sujetos sedentarios inicia un régimen de ejercicio físico, principalmente aeróbico, que puede constar de una sola sesión (agudo) o varias sesiones a lo largo de un periodo más largo de tiempo (crónico). En general, los trabajos realizados con intervenciones agudas muestran que una sola sesión de ejercicio tiene efectos beneficiosos sobre el aprendizaje y la memoria (de Diego-Moreno et al., 2022) y las funciones ejecutivas como la atención o la memoria de trabajo (de Diego-Moreno et al., 2022; Griffin et al., 2011). Sin embargo, algunos estudios indican que los efectos de una sola sesión de ejercicio se desvanecen rápidamente al finalizar el mismo. Por ejemplo, los trabajos de Audiffren et al.

(2008) realizados en adultos jóvenes, muestran que un protocolo de una sola sesión de ejercicio físico en bicicleta estática al 90% del VO_2max (VO_2max , tasa máxima de consumo de oxígeno que un individuo puede alcanzar durante el ejercicio exhaustivo) disminuyó el tiempo de reacción en una tarea con estímulos auditivos y mejoró los procesos ejecutivos en una tarea de generación aleatoria de números (Audiffren et al., 2009), pero estos efectos cesaron muy rápidamente tras finalizar el ejercicio físico. El ejercicio crónico también ha mostrado ser un buen protocolo para mejorar diferentes funciones cognitivas, como la memoria, la función ejecutiva o la velocidad de procesamiento entre otras (Holzschneider et al., 2012; Hötting et al., 2012; Rogge et al., 2017; Smith et al., 2010). Además, diversos trabajos muestran que incluso en sujetos moderadamente activos (de 1 a 3 sesiones por semana), aumentar la frecuencia de ejercicio mejora las funciones ejecutivas, especialmente la flexibilidad cognitiva (Masley et al., 2009) y la navegación espacial (Basso et al., 2022).

Los estudios transversales analizan la existencia de una relación entre la condición física y las funciones cognitivas evaluando las diferencias existentes entre personas que realizan ejercicio y aquellas que son sedentarias. Diferentes estudios indican un mejor rendimiento cognitivo en que aquellos sujetos con una mejor condición física y, en algunos casos, un mayor volumen de las regiones cerebrales implicadas. Por ejemplo, Chaddock et al. (2010) mostraron que niños/as con una alta condición física tenían mejores resultados en tareas que requerían mayor control ejecutivo y en tareas de memoria (Chaddock et al., 2012) y, además, tenían un mayor volumen de las regiones cerebrales implicadas en dichas tareas. En jóvenes y adultos los resultados siguen la misma línea, donde una mejor condición física se asocia con un mejor control ejecutivo (Kamijo & Takeda, 2009, 2010) e inteligencia global (Åberg et al., 2009).

Junto con estos efectos beneficiosos sobre las funciones cognitivas en sujetos sanos, el ejercicio físico regular parece que tiene un efecto protector ante un eventual traumatismo craneoencefálico. Diferentes estudios en animales han mostrado que la realización de ejercicio previo a un daño cerebral puede proteger contra el deterioro funcional y cognitivo asociado al daño. Por ejemplo, 6 semanas de ejercicio voluntario en rueda de actividad atenuaron el deterioro cognitivo (laberinto radial acuático) y motor observado 7 días tras un TBI en ratones. Los resultados también mostraron un aumento de los valores de VEGF-A y EPO (eritropoyetina), moléculas con un efecto neuroprotector, en regiones responsables del movimiento (corteza sensoriomotora) y la memoria (hipocampo) a las 24 h, pero no a los 3 y 7 días tras un traumatismo (Taylor et al., 2015). El ejercicio forzado también puede ejercer un efecto neuroprotector ante una lesión traumática. Así, Gu et al (2014), mostraron que 3 semanas de ejercicio voluntario previo al traumatismo mejoraban el aprendizaje y la memoria espacial (laberinto de Morris) de los animales lesionados, evaluados 15 días tras el

traumatismo. Además, se observó un aumento de los niveles de moléculas relacionadas con la plasticidad (BDNF y sinapsinas) y una reducción de las alteraciones metabólicas producidas por el TBI. Resultados similares se han obtenido con protocolos de ejercicio forzado y MRO (Fiorin et al., 2016) o laberinto de Barnes (Soltani et al., 2020). Algunos de estos efectos protectores podrían mantenerse a largo plazo (Kopczynski et al., 2023).

No conocemos trabajos publicados que evalúen, en humanos, si mantener una vida físicamente activa protege ante los efectos perjudiciales sobre el rendimiento cognitivo de un eventual TBI. Sin embargo, sí que existen algunos estudios con pacientes que han sufrido un accidente cerebrovascular. Un estudio realizado en 1111 adultos de 70 años de media con daño cerebral leve o moderado mostró que realizar ejercicio regular moderado (2-3 veces por semana) o suave (andar unas 4 h a la semana) antes del derrame se asociaba con una mejor función cognitiva evaluada poco después de la lesión (Reinholdsson et al., 2022). En otro estudio se recogió información sobre la actividad física realizada en los 7 días previos al daño en una muestra de 642 adultos (69 años de mediana). Los resultados mostraron que niveles elevados de ejercicio físico se asociaban a un mejor rendimiento en una tarea usada habitualmente para la detección de disfunciones cognitivas (SDMT, test de símbolos y dígitos) 1 y 6 meses tras el ictus, pero no en la evaluación de la función cognitiva general a través del Mini-Mental State Examination (Damsbo et al., 2020).

Por tanto, de manera general los resultados indican que, si bien haber realizado ejercicio físico antes del impacto puede proteger contra el deterioro cognitivo producido por el traumatismo, aspectos como la intensidad y la cantidad de ejercicio pueden influir en la recuperación cognitiva tras la lesión.

3.3.2 Efectos del Ejercicio Físico como Tratamiento de los Déficits Cognitivos

Asociados al Daño Cerebral Traumático

En estudios con ejercicio voluntario posterior al traumatismo se ha podido comprobar la capacidad de este tratamiento para revertir o al menos reducir los déficits de memoria tras un TBI. Trabajos realizados con ratas en nuestro laboratorio, mostraron que el ejercicio voluntario en rueda de actividad redujo los déficits de MRO generados por un CCI, tanto en la versión estándar de la prueba (Amorós-Aguilar et al., 2020; Jacotte-Simancas et al., 2015), como en las versiones que permiten evaluar componentes de memoria episódica como la memoria de orden temporal (“cuando”) y la memoria de ubicación de los objetos (“donde”) (Martínez-Drudis et al., 2021). Trabajos en otros laboratorios también han mostrado que el ejercicio voluntario es capaz de reducir los déficits de aprendizaje y memoria espaciales asociados a

un TBI, evaluados a través de diferentes pruebas conductuales (Griesbach et al., 2009; Krishna et al., 2017; Piao et al., 2013; Wu et al., 2013).

Estudios con ejercicio forzado también han indicado buenos resultados en la reducción de los déficits cognitivos asociados a un TBI. Así, un trabajo en ratones mostró que el ejercicio forzado moderado fue capaz de mejorar la ejecución de los animales con lesión (CCI) en el laberinto de Barnes, que es una tarea de memoria espacial dependiente del hipocampo (Karelina et al., 2021). Resultados similares se obtuvieron utilizando otro modelo animal de TBI (FPI) y otras tareas de aprendizaje y memoria como el evitación pasiva y el Y-maze (Chou et al., 2018). Sin embargo, en relación al ejercicio forzado algunos estudios han indicado resultados desfavorables (Griesbach et al., 2012, 2014; Taguchi et al., 2019). En esta línea Taguchi et al. (2019) indicaron que animales con TBI que fueron sometidos a un protocolo de ejercicio forzado en tapiz rodante, mostraron un incremento de marcadores proinflamatorios y una mayor afectación motora (Taguchi et al., 2019). Las diferencias observadas entre estudios pueden ser debidas al momento de inicio del ejercicio, pues mientras en los primeros estudios el ejercicio se iniciaba con 4 días de demora tras la lesión, en el estudio del ejercicio se iniciaba tan solo 24 h tras el daño cerebral.

Como se ha explicado anteriormente, el TBI se caracteriza por el daño primario producido por el propio traumatismo, que da lugar a una serie de cambios asociados con la progresión del daño secundario y la posible aparición de diferentes déficits cognitivos y/o sensoriomotores que pueden afectar a la calidad de vida de la persona (Ng & Lee, 2019). En humanos, diferentes estudios avalan que el ejercicio físico puede mejorar la sintomatología observada tras una contusión cerebral, como el dolor de cabeza, el mareo, la fatiga, el insomnio, la irritabilidad o la ansiedad (Lal et al., 2018), así como las complicaciones secundarias asociadas al estilo de vida sedentario que suele ser habitual en los pacientes con TBI (Mossberg et al., 2010). Si bien no hay muchos estudios clínicos que evalúen los efectos del ejercicio sobre las funciones cognitivas y los daños neurales asociados con un TBI, cada vez hay más trabajos que sugieren que el ejercicio puede ser una buena estrategia terapéutica para la recuperación cognitiva de pacientes con una lesión cerebral (Morris et al., 2016; Sharma et al., 2020). Por ejemplo, Chin et al. (2015) mostraron que un régimen de ejercicio físico de intensidad alta (30 min/3 veces al día/12 semanas) mejoró la ejecución en tareas que requerían control ejecutivo en población adulta con TBI. En otro trabajo (Imhoff et al., 2016), adolescentes con TBI realizaron, 7 días después de finalizar los síntomas postcontusionales, un programa de rehabilitación domiciliaria personalizado que incluía entrenamiento aeróbico progresivo, ejercicios de coordinación y de equilibrio. Los resultados indicaron que el programa de rehabilitación no solo mejoró aspectos como la coordinación y el equilibrio, sino que los participantes mostraron un mejor rendimiento en pruebas que evaluaban la memoria

episódica verbal, la memoria de trabajo y los procesos de atención. Resultados parecidos se han observado al evaluar el aprendizaje verbal y auditivo (Grealy et al., 1999) y la velocidad de procesamiento y la inteligencia (Gordon et al., 1998).

Cabe destacar que no todos los estudios muestran estos efectos beneficiosos a nivel cognitivo. Por ejemplo, en un trabajo realizado en niños/as y adolescentes que habían sufrido un daño cerebral, una sesión de ejercicio físico extenuante (durante 8 min), realizada el día 2 y el día 10 desde que los participantes autoinformaran de la resolución completa de los síntomas tras la contusión, empeoró tanto la velocidad de procesamiento como la toma de decisiones. Este empeoramiento era mayor en la segunda sesión de evaluación (10 días desde la ausencia de síntomas). Los autores sugieren que este efecto negativo durante la segunda sesión podría relacionarse con la incorporación al curso escolar que podría haber aumentado la demanda ambiental y perjudicar en los resultados. Los autores también apuntan que el autoinforme sobre la sintomatología podría no haber sido suficientemente preciso y que, por tanto, la recuperación no fue la suficiente (Manikas et al., 2017). En la misma línea, un estudio en el que se utilizó una intervención combinaba de ejercicio físico y técnicas de autoafirmación (IntenSati) obtuvo mejoras en los síntomas depresivos, el estado de ánimo y la calidad de vida de los participantes, pero no sobre la función cognitiva (Lee et al., 2014).

3.4 Parámetros Relevantes del Ejercicio Físico en Relación a sus Efectos sobre la Cognición

Como se ha mostrado en el apartado anterior, en términos generales el ejercicio físico tras el traumatismo parece mejorar los déficits cognitivos asociados al TBI, aunque existen algunos resultados contradictorios. Aspectos del tratamiento, como el momento de inicio, la duración o la intensidad del mismo puedan estar en la base de estas diferencias tal y como sugieren los estudios con animales.

3.4.1 La Intensidad del Ejercicio Físico

Como se ha comentado anteriormente, la ventaja principal del ejercicio forzado es que permite evaluar los efectos de diferentes “dosis” sobre los procesos cognitivos ya que se pueden ajustar parámetros como la intensidad y la duración del tratamiento. Los estudios realizados en animales sanos muestran que una intensidad moderada puede tener un efecto beneficioso sobre los procesos de aprendizaje y memoria, mientras que una intensidad demasiado elevada puede deteriorarlos. Así, en un estudio realizado por Blustein et al. (2006) los animales que eran entrenados con un protocolo de ejercicio de alta intensidad (25 m/min durante 25 min/día) recorrieron mayores distancias que los entrenados con un protocolo de

baja intensidad (20-22 m/min durante 25 min/día) hasta encontrar la plataforma sumergida, indicando un deterioro de la adquisición del aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris. Resultados similares se obtuvieron en otro trabajo realizado también en ratas en el que se evaluaron diferentes intensidades de ejercicio basándose en el índice de lactato en sangre (Inoue et al., 2015). En este estudio se observó que el ejercicio moderado no afectó al ritmo de aprendizaje, pero sí que mejoró la memoria de la tarea en comparación al grupo sedentario. Además, los niveles de corticosterona en sangre no se vieron alterados. En cambio, el grupo de alta intensidad no logró mejorar ni el aprendizaje ni la memoria espacial y sí que mostró niveles de corticosterona elevados e hipertrofia adrenal. Cabe destacar que incluso en aquellos trabajos en los que el ejercicio de alta intensidad tuvo un efecto positivo, éste fue menor que el asociado a intensidades moderadas. Así, un experimento (So et al., 2017) realizado en ratones con dos pautas de ejercicio (moderada y elevada según los niveles de lactato en sangre) indicaron que los animales con pauta de ejercicio moderado mostraron mayores niveles de neurotrofinas y mejor ejecución en una tarea de discriminación visual. Si bien ambas condiciones de ejercicio promovían la neurogénesis, fue el grupo con la pauta moderada la que más la potenció, al promover la proliferación, supervivencia, diferenciación y la migración, a diferencia de la pauta de alta intensidad que solo promovió significativamente la diferenciación y la migración.

Estudios realizados en animales también indican que la intensidad del ejercicio podría ser clave para explicar los efectos de este tratamiento en humanos sanos. Así, el ejercicio de muy baja intensidad ha mostrado no ser suficiente para generar buenos resultados, mientras que las pautas de intensidad moderada suelen producir efectos beneficiosos sobre la cognición como la disminución de la ansiedad (Pedersen & Saltin, 2015; Ploughman, 2008). En cambio, pautas de ejercicio de alta intensidad producen un deterioro en tareas de aprendizaje y memoria espaciales (Kennard & Woodruff-Pak, 2012) o en tareas visoespaciales, además de aumentar los niveles de cortisol (Bermejo et al., 2022). Esto parece indicar que el efecto del ejercicio físico sobre la función cognitiva se ajusta a una curva de U invertida. Sin embargo, algunos trabajos también describen efectos positivos en protocolos con alta intensidad. Por ejemplo, tanto una sesión de ejercicio de intensidad moderada como una de intensidad elevada mejoraron la función ejecutiva en sujetos sanos, sin embargo, dicho efecto fue más duradero cuando la intensidad fue elevada (Tsukamoto et al., 2016). Similares resultados fueron reportados en una investigación realizada en estudiantes sanos donde se comparaba el efecto sobre la función cognitiva de dos protocolos de ejercicio regular, uno de intensidad elevada y otro de intensidad moderada. Los resultados indicaron que la pauta de intensidad elevada mejoró los resultados en el test de memoria visoespacial y en la retención a las 48 h del test de memoria declarativa en comparación al grupo de intensidad moderada, sin bien

estas diferencias desaparecían en el test de memoria a los 7 días (Ballester-Ferrer et al., 2022).

Por tanto, tanto en animales como humanos sanos, la intensidad moderada parece ser la pauta óptima para potenciar diferentes funciones cognitivas. Ahora bien, la cantidad e intensidad de ejercicio que beneficiaría a sujetos sanos y la cantidad e intensidad de ejercicio que podría generar un efecto positivo en sujetos con alguna patología, por ejemplo, un TBI, podrían ser diferentes. En este sentido, se ha indicado que, tras un daño cerebral, los pacientes suelen mostrar un menor rendimiento aeróbico asociado a una menor capacidad cardiovascular y pulmonar, aumentando la fatiga ante ejercicios de resistencia en comparación a sujetos sedentarios sin lesión (Mossberg et al., 2007). A pesar de estas diferencias, estudios en animales con TBI también parecen sugerir que el ejercicio de intensidad moderada sería el óptimo para la recuperación funcional y cognitiva tras un daño del SNC. Así, Karelina et al. (2021) con un modelo de CCI en ratones, mostraron que 10 días de ejercicio de intensidad moderada tuvo un mayor efecto beneficioso sobre la memoria evaluada en un laberinto de Barnes que un protocolo de baja intensidad. Por otro lado, la intensidad elevada puede llegar a ser perjudicial. En un estudio realizado en ratas con daño isquémico, se constató que solo aquellas que habían realizado un protocolo de ejercicio más suave mostraban un mejor rendimiento en memoria espacial y mayor nivel de BDNF que el grupo sedentario, mientras que el grupo que realizaba un protocolo de alta intensidad no solo no mostraba un aumento de BDNF ni una mejor ejecución en las pruebas conductuales, sino que mostró un mayor nivel de corticosterona que indicaría, una mayor respuesta de estrés (Shih et al., 2013).

Si bien, de manera general, la literatura indica consistentemente que los pacientes tienden a estar casi inactivos durante la rehabilitación hospitalaria (Ramsey et al., 2018), la intensidad del ejercicio físico también ha sido objeto de estudio en el ámbito asistencial. En este sentido, se ha relacionado una baja actividad física tras un TBI con una peor calidad de vida y una mayor dependencia (Archer et al., 2012; Nelson et al., 2007). En cambio, un mayor fitness cardiorrespiratorio se ha relacionado con la mejora en las funciones cognitivas (Chin et al., 2015; Morris et al., 2019). Si consideramos también, como vimos anteriormente, que en sujetos sanos se ha observado una correlación positiva entre la capacidad cardiorrespiratoria y una mejor puntuación en la evaluación cognitiva (Åberg et al., 2009; Griffin et al., 2011), podría sugerirse que cierto grado de intensidad de ejercicio es necesario para generar una respuesta fisiológica que podría relacionarse positivamente con un mejor rendimiento cognitivo. Si bien se considera que existe un límite en esta relación. Así en este trabajo, mostraron que el aumento del régimen de ejercicio de 2 a 4 h/día (5 días por semana durante

6 meses) en pacientes con un daño cerebral, no supuso una mayor mejora ni en independencia, ni en el autocuidado y ni en las funciones cognitivas (Zhu et al., 2007).

Por tanto, en términos generales el ejercicio moderado parece ser la pauta más adecuada para obtener mejores resultados, tanto en sujetos sanos como con daño cerebral.

3.4.2 Inicio del Ejercicio Físico tras el TBI: Inicio Temprano vs Demorado

Como ya se ha comentado, tras un traumatismo se ponen en marcha una serie de procesos fisiopatológicos que pueden prolongarse incluso años y que generan el daño secundario. Esto hace que la demora en el inicio de un tratamiento posterior al traumatismo pueda ser un parámetro crítico, aunque no ha sido suficientemente estudiado. Griesbach et al. (2004), realizaron un estudio en el que comparaban un inicio temprano (día 0) del ejercicio físico postraumático con un inicio demorado (día 14) sobre el aprendizaje y la memoria espacial y diversos marcadores de plasticidad sináptica. Los resultados mostraron que sólo el ejercicio de inicio demorado facilitó el aprendizaje y la memoria espaciales, y aumentó los niveles de BDNF en el hipocampo. Por tanto, la administración temprana podría haber interferido con la respuesta molecular del ejercicio, afectando la recuperación cognitiva tras un daño cerebral. En la misma línea, Piao et al. (2013) realizaron un estudio en ratones en el que evaluaron 5 semanas de ejercicio voluntario iniciado 1 o 5 semanas después de un CCI. Los resultados indicaron que solo el grupo que inició el ejercicio 5 semanas después del TBI mostró una recuperación cognitiva evaluada a través del laberinto acuático de Morris y la tarea de MRO, un menor tamaño de la lesión, una reducción de la activación microglial, una potenciación de la neurogénesis y un incremento de marcadores asociados a la plasticidad sináptica (IGF-1, BDNF y CREB). También se ha puesto de manifiesto que una sola sesión de ejercicio físico realizada 3 días después del traumatismo, pero no a los 7 o 14 días, deteriora la memoria en una tarea espacial en el laberinto de Barnes (Yoon & Kim, 2018). A pesar de que estos experimentos sugieren que un inicio temprano puede no ser beneficioso, existe al menos un trabajo en el que el tratamiento iniciado 2 días tras el traumatismo, pero no iniciado a los 9 días, puede mejorar una tarea de memoria espacial (Chen et al., 2013).

Aunque estas discrepancias podrían deberse a variaciones en las metodologías utilizadas, como el tipo de ejercicio o los parámetros del ejercicio físico, se ha sugerido que el daño mitocondrial y el impacto sobre el metabolismo cerebral que se producen en las primeras horas y días tras el impacto generan una crisis energética que podría ser agravada por el ejercicio físico iniciado en la fase aguda postraumatismo, ya que este tratamiento va asociado a un aumento en la demanda energética (Griesbach, 2011; Lamade et al., 2020).

3.5 Mecanismos de Acción del Ejercicio Físico

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar los efectos del ejercicio sobre la función cognitiva. En este apartado, resumiremos los más significativos.

Neuroplasticidad

Los efectos beneficiosos del ejercicio físico sobre la cognición se han relacionado con el aumento de diversas proteínas asociadas con la plasticidad sináptica. Entre estas, el BDNF es la que se ha asociado más ampliamente con el ejercicio. El BDNF promueve diferentes aspectos del desarrollo cerebral, incluida la supervivencia de las neuronas, la diferenciación, la migración, la arborización dendrítica y la sinaptogénesis (Greenberg et al., 2009; Park & Poo, 2013) y se ha demostrado que es esencial en diferentes procesos ligados al aprendizaje y la memoria, como la inducción y el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (Bramham & Messaoudi, 2005) y la neurogénesis (Liu & Nusslock, 2018). Como el resto de neurotrofinas, el BDNF se sintetiza a partir de un precursor (proBDNF) que contiene en su extremo amino terminal (N-terminal) péptidos de señalización seguidos por la región pro que, después de la escisión, produce la forma madura del BDNF (BDNFm) (Seidah et al., 1996). El proBDNF tiene afinidad por los receptores p75NTR, expresados en poblaciones neuronales, específicamente en células apoptóticas, dando como resultado final la apoptosis neuronal y la depresión sináptica, y cuya expresión se ve incrementada ante eventos patológicos como un daño cerebral (Ding et al., 2011; Liu & Nusslock, 2018). El BDNFm tiene afinidad por los receptores TrkB, expresados principalmente en las neuronas glutamatérgicas del hipocampo, tanto a nivel pre como postsináptico, y se relaciona con la neuroplasticidad (Meldolesi, 2017). Cuando se une a su receptor a nivel presináptico promueve la liberación de glutamato al aumentar el número de vesículas acopladas a las zonas activas en las sinapsis excitatorias del hipocampo (Tyler & Pozzo-Miller, 2001). La unión al receptor TrkB postsináptico provoca la dimerización y la posterior fosforilación del receptor, activando cascadas de señalización, entre las que se encuentran la vía MAPK/ERK, la PL3K/Akt y la PLCγ (Kowiański et al., 2018). Estas tres vías están asociadas principalmente con la plasticidad sináptica, la supervivencia celular y el crecimiento y densidad dendríticas. Además, la vía MAPK/ERK está asociada con la activación del factor de transcripción CREB que, además de activar diferentes genes que codifican proteínas relacionadas con la plasticidad neuronal (Bramham & Wells, 2007), induce la transcripción del gen *Bdnf* (Kowiański et al., 2018).

Diferentes estudios han indicado que el BDNF podría ser un mediador de los efectos del ejercicio sobre la plasticidad sináptica. En este sentido, la realización de ejercicio físico puede aumentar la síntesis de BDNF, principalmente en el hipocampo, y este aumento se ha relacionado con diferentes mejoras cognitivas (Lafenêtre et al., 2010; Maass et al., 2016;

Santos et al., 2020). El BDNF es producido y liberado tanto en el SNC como en el periférico. A nivel periférico, el BDNF es producido y liberado al torrente sanguíneo por las células del músculo esquelético, y viaja a través del organismo ejerciendo un efecto directo sobre órganos como el hígado, el páncreas, el tejido adiposo y los propios músculos esqueléticos, que son importantes en la homeostasis de la glucosa (Hanyu et al., 2003; Mousavi et al., 2004; Nakagawa et al., 2000; Tsuchida et al., 2001). Además, al poder atravesar la BHE, llega hasta el cerebro donde favorece su propia síntesis a través de la activación de CREB (Kowiański et al., 2018). De esta manera, el BDNF periférico parece tener un papel importante en la regulación del metabolismo energético y puede potenciar su síntesis en el SNC. A nivel cerebral, el ejercicio físico estimula la expresión del gen *Fndc5* en el hipocampo a través del coactivador de la transcripción PGC-1 α , aumentando la expresión del gen *Bdnf* (Wrann et al., 2013). Además, el tratamiento con ejercicio físico produce una regulación al alza de los receptores TrkB en el hipocampo y otras estructuras que se ha relacionado con unos mejores resultados en pruebas de aprendizaje y memoria (Liu et al., 2009). Así, el bloqueo de estos receptores atenúa la mejora de la adquisición y la retención asociada al ejercicio físico en una tarea de aprendizaje espacial (Vaynman et al., 2004). En modelos animales de daño cerebral, la mejora cognitiva asociada al ejercicio también se ha relacionado con un incremento en la expresión de BDNF en el hipocampo (Griesbach et al., 2009).

Por tanto, estos resultados indican que el ejercicio podría mejorar o restaurar funciones cognitivas, principalmente aprendizaje y memoria, a través de la regulación al alza de la vía BDNF-TrkB. Los resultados de los estudios en humanos sanos parecen también señalar al BDNF como mediador de los efectos del ejercicio físico. Se ha constatado que tras la realización de una única sesión de ejercicio aeróbico se produce un aumento de los niveles de BDNF en plasma y cerebro (Rasmussen et al., 2009), relacionándose este incremento con una mejor ejecución en las pruebas de aprendizaje y memoria (Håkansson et al., 2017; Winter et al., 2007).

Junto con el BDNF, otras neurotrofinas como el IGF-1 y el VEGF se han asociado con el efecto beneficioso que ejerce el ejercicio sobre la estructura y la función cerebral. Los niveles de ambos factores de crecimiento aumentan en respuesta al ejercicio (Fabel et al., 2003; Speisman et al., 2013) y suponen un aumento en la neurogénesis hipocampal que se relaciona con una mejora en los procesos de aprendizaje y memoria (Fabel et al., 2003; Speisman et al., 2013).

Neurogénesis

El proceso por el cual una célula madre da lugar a una nueva neurona se denomina neurogénesis, y está ampliamente aceptado que, en determinadas regiones del cerebro de los mamíferos, este proceso continúa a lo largo de los años hasta la edad adulta (Cope & Gould, 2019). Las regiones donde se siguen generando nuevas neuronas en la edad adulta son: la zona subventricular del ventrículo lateral y la zona subgranular (ZSG) del GD (Deng et al., 2010; Van Praag et al., 2002). La neurogénesis se inicia con la división asimétrica de las células madre de glía radial. El término de división asimétrica se refiere a que la división de la célula madre resulta en la generación de progenitores con potencial de especialización hacia un linaje celular definido, mientras que la división simétrica generará dos células hijas idénticas a ella. La división asimétrica de las células madre da lugar a las células progenitoras con capacidad de autorrenovarse y generar neuronas o astrocitos (Bonaguidi et al., 2011; Suh et al., 2007). Estas células progenitoras, denominadas amplificadoras por su alta capacidad de proliferación, darán lugar a los neuroblastos que migrarán posteriormente de la ZSG a la capa granular donde comenzarán su diferenciación a neuronas inmaduras granulares (Gonçalves et al., 2016; Toda & Gage, 2018). Estas células inmaduras pasarán por un extenso proceso de maduración que incluye el crecimiento de axones y dendritas, así como la formación de conexiones sinápticas para convertirse en neuronas granulares maduras e integradas en el circuito del hipocampo (Christian et al., 2014) (Figura 10).

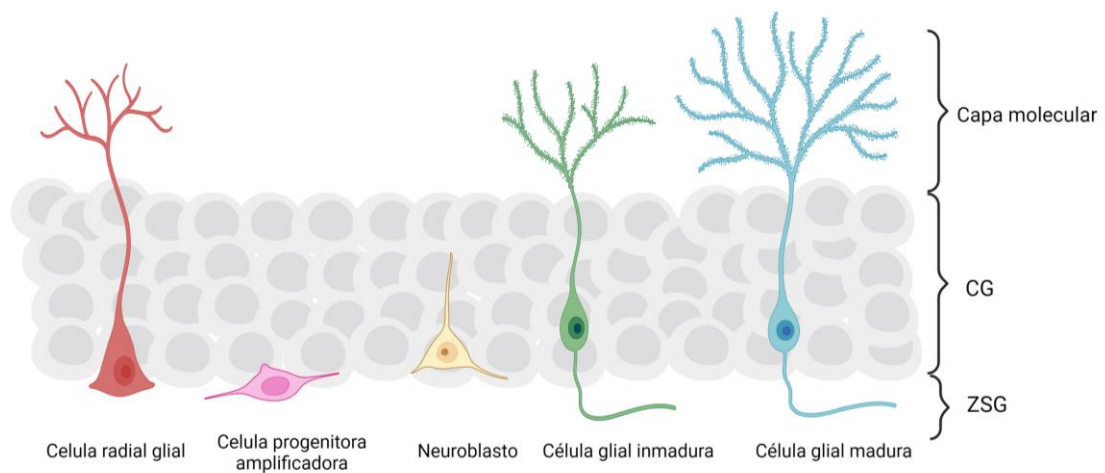


Figura 10. Diferentes estadios en el proceso de neurogénesis adulta en el GD del hipocampo. Las células madre gliales residentes en la ZSG dan lugar a las células progenitoras amplificadoras que generan los neuroblastos. Estos neuroblastos migran de la ZSG a la CG (capa granular) donde comienzan un proceso de diferenciación convirtiéndose en neuronas granulares inmaduras. Estas neuronas poseen un solo árbol dendrítico que se expande hacia la capa molecular y un axón que se extiende desde el hilus hacia las capas CA2 y CA3, para posteriormente convertirse en neuronas granulares que maduras. Creado con BioRender.com

La neurogénesis y la integración de estas nuevas neuronas dentro del circuito hipocampal parece tener un impacto sobre la función cerebral, principalmente en los procesos de

aprendizaje y memoria (Deng et al., 2010). En este proceso de integración, las nuevas neuronas granulares comienzan a extender sus axones, conocidos como fibras musgosas o *Mossy fibers*, hacia las neuronas piramidales de las capas CA3 y CA2 del hipocampo a través del hilus (Bonaguidi et al., 2011; C. Zhao et al., 2006). Estas neuronas inmaduras reciben inputs gabaérgicos de interneuronas del GD a los que responden de forma excitatoria de manera transitoria, fomentando su supervivencia (Ge et al., 2006; Pallotto & Deprez, 2014). Además, también reciben inputs glutamatérgicos desde la corteza entorrinal (Deshpande et al., 2013; Vivar et al., 2012) (Figura 11). Esta capacidad para reaccionar al GABA de manera excitatoria sugiere que las nuevas neuronas inmaduras tienen más probabilidad de activarse que las neuronas maduras que se hallan fuertemente inhibidas, haciendo que el circuito neural que conforman sea más sensible a estímulos, contribuyendo a la mejora de las funciones dependientes del hipocampo, como la el aprendizaje y la memoria (Ma et al., 2017).

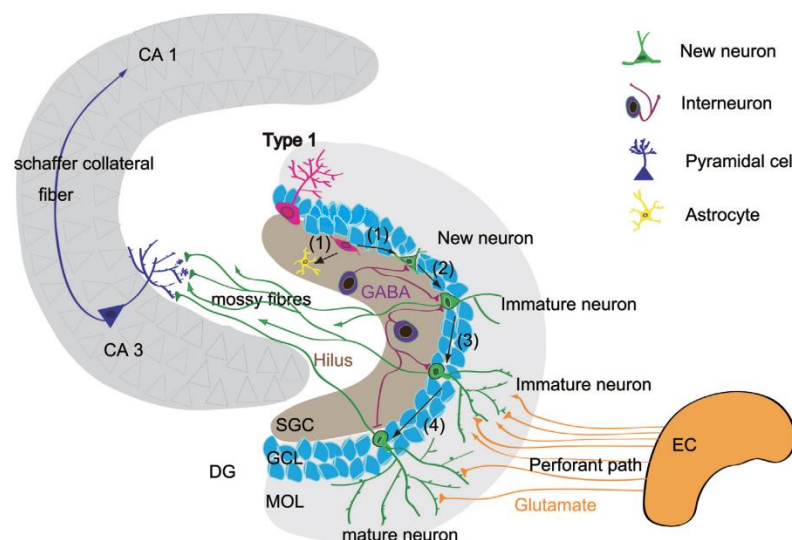


Figura 11. Neurogénesis hipocampal adulta e integración de las nuevas neuronas. (1) Célula progenitora que puede dar lugar a astrocitos o a neuronas granulares. (2) Migración de los neuroblastos a SGZ y generación de una nueva neurona inmadura. (3) Las neuronas inmaduras granulares poseen un solo árbol dendrítico que se expande hacia la capa molecular y un axón que se expande (fibras musgosas) a través del hilus hacia CA2 y CA3 (4). Las diferentes modificaciones estructurales de las neuritas, debidas a la acción de las neuronas GABAérgicas en un principio, y a los outputs glutamatérgicos provenientes de la corteza entorrinal, dan como resultado la maduración final de la neuronas. SGC, capa subgranular; GCL, capa granular; MOL, capa molecular; EC, corteza entorrinal. Figura adaptada de Ma et al. (2017).

Los mecanismos subyacentes por los que el ejercicio físico parece potenciar la neurogénesis en ciertas zonas del cerebro adulto son muy diversos y como hemos comentado parecen estar relacionados con diversas neurotrofinas. Un aspecto relevante parece ser el aumento de factores de crecimiento relacionadas con el sistema vascular, ya que la vasculatura parece ser de vital importancia para que las células progenitoras puedan proliferar en la SGZ (Kim et al., 2021). Diferentes estudios han indicado que factores de crecimiento como el GDF11 y el VEGF inducen cambios en la vasculatura, potenciando la angiogénesis en el caso del VEGF

y remodelando la vasculatura en el caso del GDF11, que incrementan la neurogénesis adulta (Katsimpardi et al., 2014). Además, el BDNF y otros factores de crecimiento también juegan un papel importante en este proceso. El ejercicio físico parece promover la expresión de BDNF (Wrann et al., 2013), IGF-1 (Trejo et al., 2001), y FGF-2 (Gustafsson & Kraus, 2001) en el GD, siendo estos factores clave en las diferentes etapas de la neurogénesis (Figura 12).

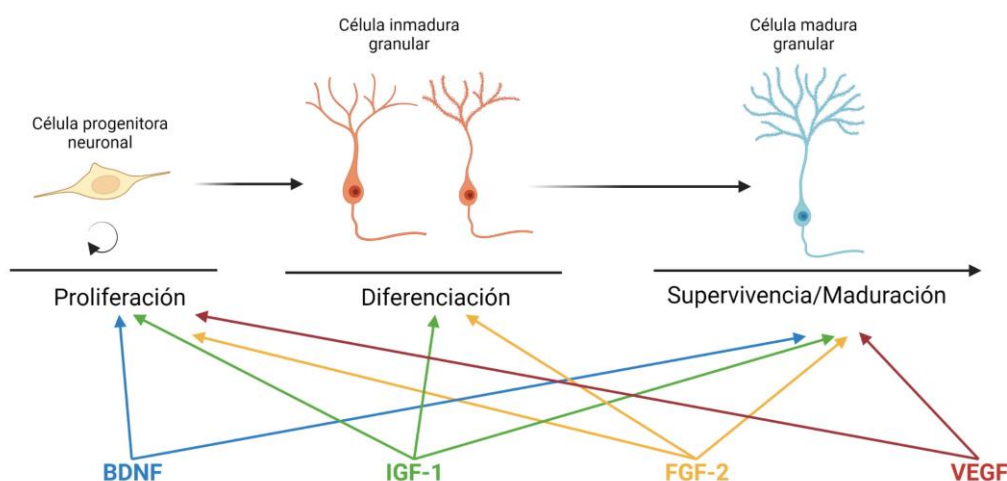


Figura 12. Estadios de la neurogénesis adulta en el hipocampo y los diferentes factores neurotróficos asociados. Creado con BioRender.com

El ejercicio físico también puede influir en los diferentes estadios por los cuales una célula madre genera una nueva neurona madura, a través de la modulación de diversos neurotransmisores (Riquelme et al., 2008). Por ejemplo, como ya se ha comentado, el GABA parece ser clave en la maduración de las nuevas neuronas granulares y su posterior integración sináptica en el GD (Ge et al., 2006; Pallotto & Deprez, 2014). En este sentido, se ha puesto de manifiesto que el ejercicio físico aumenta la liberación de este neurotransmisor e incrementa la expresión de las isoformas 65 y 67 del gen que codifica la enzima GAD (Glutamate decarboxylase) en el hipocampo, potenciando con ello el aprendizaje y la memoria espacial (Sinaei et al., 2021). Por su parte, la serotonina también juega un rol importante en los mecanismos por los que el ejercicio induce la neurogénesis adulta. Algunos estudios han indicado que la estimulación del receptor serotoninérgico 5-HT₃ es clave en la respuesta neurogénica que produce el ejercicio en el GD, observando una pérdida de esta respuesta asociada al ejercicio físico ante un déficit de este receptor (Kondo et al., 2015).

Acción antiinflamatoria

Como expusimos con anterioridad, el TBI se caracteriza por desarrollar una potente respuesta inflamatoria que se relaciona con neurodegeneración cerebral y la aparición de diferentes déficits cognitivos. Este proceso inflamatorio se distingue por un aumento de la activación microglial, que adquiere conformación M1 (antiinflamatoria) y M2 (proinflamatoria), y la liberación por parte de la microglía de diferentes factores como las citoquinas antiinflamatorias, proinflamatorias y las mioquinas (Figura 13).

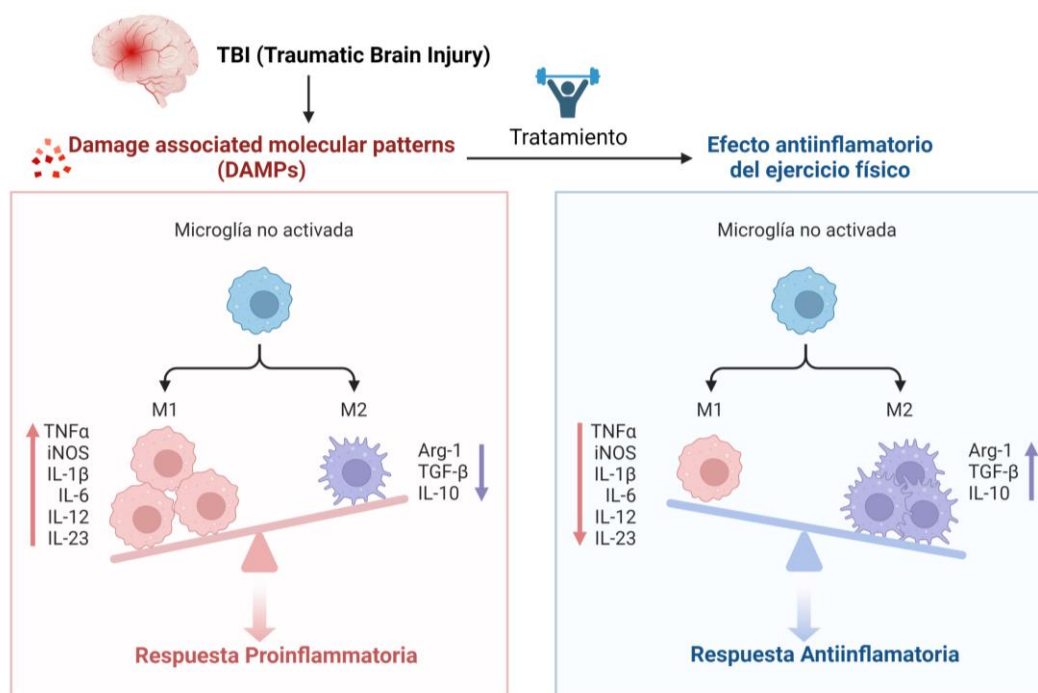


Figura 13. Activación de la respuesta inflamatoria por el TBI y modulación de dicha respuesta por parte del ejercicio físico. Después de producirse un TBI se genera un aumento de diferentes factores inflamatorios relacionados principalmente a la activación microglial de conformación M2, que como expusimos con anterioridad se asocia con una respuesta antiinflamatoria. Sin embargo, el ejercicio físico parece modular esta respuesta al equilibrar el balance entre los factores proinflamatorios y antiinflamatorios, disminuyendo la respuesta inflamatoria exacerbada asociada al TBI. Creado con BioRender.com

Diferentes estudios en roedores han sugerido que el ejercicio físico puede modular la respuesta inflamatoria asociada al TBI promoviendo la liberación de citoquinas antiinflamatorias y reduciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias (Chio et al., 2017; Piao et al., 2013). Por ejemplo, se ha evidenciado una disminución de la glía reactiva en el hipocampo y la corteza, y una disminución de la muerte neuronal en ratones lesionados que realizaban ejercicio físico (Chen et al., 2013). Algunos trabajos también han indicado que este efecto antiinflamatorio podría ser uno de los mecanismos por los que la actividad física revertiría los déficits cognitivos asociados a un daño cerebral (Itoh et al., 2011; Mota et al., 2012). Entre estos estudios, podemos destacar el de Piao et al. (2013) en el que el ejercicio físico redujo significativamente los déficits cognitivos producidos por un TBI y disminuyó la

activación microglial y la liberación de citoquinas proinflamatorias, e incrementó los niveles de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10. Este efecto antiinflamatorio también se ha observado cuando el ejercicio es previo al traumatismo, como muestra este trabajo de Chio et al. (2017) en el que disminuyó los déficits neurológicos asociados, estimulando el eje antiinflamatorio HSP70/NF- κ B/IL-6/synapsin I en diferentes regiones como la corteza, el hipocampo, los núcleos estriados y el hipotálamo. Algunos trabajos sugieren que este efecto antiinflamatorio, además de reducir la muerte neuronal secundaria, promovería la eficacia de la respuesta neurogénica en el hipocampo, al reducir la inflamación y con ello aumentar la probabilidad de supervivencia de las nuevas neuronas y su integración al circuito del hipocampo (Ryan & Nolan, 2016).

4. MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS: ESTRUCTURAS CEREBRALES IMPLICADAS

La memoria de reconocimiento podría definirse como la capacidad de identificar si un evento particular se ha encontrado previamente y por tanto es fundamental a la hora de registrar eventos y para guiar nuestro comportamiento en el futuro (Warburton & Brown, 2015). Las pruebas basadas en la memoria de reconocimiento son muy usadas hoy en día en modelos animales como aproximación a las pruebas cognitivas que se utilizan en humanos para valorar la memoria episódica tras un daño cerebral, pues ambos procesos comparten parte de su sustrato neurobiológico (Chao et al., 2020; Sauvage, 2010; Sekeres et al., 2018; Wammes et al., 2017). En roedores, la memoria de reconocimiento puede ser valorada gracias a la tendencia espontánea que poseen estos animales por explorar aquello que les es novedoso (Vann & Albasser, 2011). Variantes de este tipo de tareas, modificando los objetos, su localización o su presentación temporal, permiten estudiar los diferentes componentes de la memoria episódica y sus bases neurales (Morici et al., 2015).

La tarea de reconocimiento de objetos, en su versión estándar, consiste en una fase de adquisición donde se presentan al animal dos o más objetos idénticos, seguida de uno o más test de retención tras un tiempo de demora. En estos test, se presentan dos objetos, uno nuevo y otro familiar. Dada la tendencia natural de los roedores por la novedad, la preferencia por el objeto nuevo indica un buen recuerdo (Cohen & Stackman, 2015). Existen diferentes modificaciones de esta tarea, no solo en la variación del número de retenciones o en el tiempo de demora entre las fases, sino también en la introducción de habituaciones y un test de neofobia (Antunes & Biala, 2012). Las ventajas de la MRO son que no genera un alto nivel de estrés, ya que no depende de la privación de alimento ni del uso de estímulos aversivos como descargas eléctricas, y que, al basarse en la preferencia innata de los roedores por la

novedad, no necesita de un entrenamiento previo (Antunes & Biala, 2012; Cohen & Stackman, 2015; Tanimizu et al., 2018). Diferentes estudios han relacionado la PRhc y el hipocampo, entre otras estructuras, con este tipo de tarea (Cinalli et al., 2020; Tanimizu et al., 2018; Vann & Albasser, 2011).

La corteza perirrinal

La PRhc en primates se encuentra en la parte ventromedial del lóbulo temporal, rodeando la amígdala y el hipocampo anterior y sus características citoarquitectónicas fueron descritas por primera vez por Brodmann (1909). La PRhc posee multitud de conexiones recíprocas con estructuras del lóbulo temporal medial relacionadas con la memoria como el hipocampo y la corteza entorrinal. Además, mantiene conexiones con otras regiones del propio lóbulo temporal medial (corteza parahipocampal y amígdala) y otras regiones corticales (corteza inferotemporal, la ínsula, el córtex cingulado, el surco temporal superior y córtex orbitofrontal) (Suzuki & Naya, 2014). Está ampliamente aceptado que la PRhc posee un rol importante en la MRO tanto en humanos como en roedores (Bartko et al., 2007b, 2007a; Rolls et al., 2005), principalmente para el reconocimiento de estímulos u objetos individuales que han sido presentados previamente (Barker et al., 2006). Diferentes estudios en roedores sanos han constatado que cuando un animal realiza una prueba de reconocimiento de objetos, se produce un aumento en la expresión de *c-fos* (proto-oncogén cuyo aumento está asociado con la activación neuronal) en la PRhc, hecho que no ocurre cuando el animal realiza una prueba de reconocimiento asociativo (Aggleton et al., 2012). Por otro lado, estudios de registro con primates no humanos y roedores sanos muestran que la tasa de disparo de las neuronas de la PRhc va disminuyendo a medida que los objetos novedosos se vuelven familiares (Brown & Xiang, 1998; Fahy et al., 1993; Riches et al., 1991; Thome et al., 2012) indicando su implicación en el reconocimiento de la novedad de un estímulo. En la misma línea, estudios con resonancia magnética funcional en humanos sanos han indicado que la actividad en la PRhc predice selectivamente el reconocimiento basado en la familiaridad (Davachi et al., 2003; Ranganath et al., 2004). Finalmente, estudios de lesión de la corteza perirrinal en roedores, confirman la implicación de esta estructura en la identificación de los objetos (Moses et al., 2005).

Junto con este rol en la detección de la novedad, también se ha asociado tanto a la codificación, como a la recuperación y la consolidación de la memoria (Miranda & Bekinschtein, 2018; Winters & Bussey, 2005). Se ha demostrado que el bloqueo transitorio con lidocaína de la PRhc antes de la sesión de adquisición o justo antes de la sesión de retención deterioraba la MRO independientemente de la demora entre ambas sesiones. Sin embargo, la inactivación realizada tras la sesión de adquisición solo deterioraba la retención

cuando la infusión de lidocaína se realizaba a los 20 min tras la adquisición, pero no a los 40, 60 u 80 min (Winters & Bussey, 2005). Esto refuerza la idea de que la PRhc es necesaria para la codificación y la recuperación de la información, pero también para la fase inicial de la consolidación de la memoria. Además, se ha sugerido que la implicación de la PRhc en la discriminación de los estímulos novedosos podría estar en la base del almacenamiento de información a largo plazo y ser suficiente para el reconocimiento de objetos basado en la familiaridad de los elementos (Miranda & Bekinschtein, 2018).

El hipocampo

La formación hipocampal se localiza en el interior de la parte medial del lóbulo temporal y consta del llamado cuerno de Amón (CA1, CA2 y CA3), GD y el subículum. Los principales inputs corticales que recibe provienen de la corteza entorrinal a través de la vía perforante, (Knierim, 2015). Diferentes estudios muestran la implicación del hipocampo en versiones de la MRO con componente espacial (Aggleton et al., 2012; Bird & Burgess, 2008; Moses et al., 2005; Olsen et al., 2012). Por ejemplo, Aggleton et al. (2012) indicaron un aumento de la expresión de *c-fos* en el hipocampo al realizar una tarea donde la detección de la novedad surgía de la reconfiguración del lugar que ocupaban los objetos familiares. En la misma línea, estudios de lesión han indicado una peor ejecución de la tarea cuando requería un procesamiento de la información contextual (Moses et al., 2005).

Si bien parece clara la implicación del hipocampo en la MRO con un componente espacial, su papel en la memoria de reconocimiento sin este componente no es tan clara. En algunos trabajos se ha estudiado su implicación bajo determinadas condiciones como la fuerza del recuerdo. Cinalli et al. (2020) permitieron a los animales explorar los objetos en la adquisición un tiempo menor (30 s) o mayor (38 s), generando un recuerdo débil o fuerte, respectivamente. La inactivación temporal de las neuronas de la PRhc tras la adquisición deterioró solamente la memoria débil, mientras que la inactivación de las neuronas de CA1 del hipocampo afectó solamente a la memoria fuerte. Estos resultados coincidirían con los ya comentados de Winters & Bussey (2005) y parecen indicar que inicialmente la memoria del objeto está codificada en la PRhc y que a medida que este recuerdo se intensifica, también lo hace la implicación del hipocampo. Otro parámetro que parece clave en la implicación del hipocampo en la MRO es la demora entre la fase de adquisición y el test de retención. Diversos estudios han sugerido una mayor implicación de esta estructura cuando la demora entre la adquisición y la retención es mayor, por ejemplo, su implicación sería mayor cuando la retención es a las 24 h que cuando es a las 3 h (Clarke et al., 2010; Cohen & Stackman, 2015).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Existe cierto consenso en que el ejercicio físico realizado tras un traumatismo puede ser un buen tratamiento para reducir el daño secundario que se produce tras este tipo de sucesos y, con ello, mejorar la recuperación de los déficits cognitivos asociados. El periodo inmediatamente posterior al traumatismo parece clave en el desarrollo de dicho daño secundario, por lo que poder intervenir con ejercicio físico en este momento podría reducir este proceso y aumentar el efecto neuroprotector del tratamiento. En este sentido, diversos trabajos apoyan la idea de que los efectos beneficiosos del ejercicio físico tras el TBI solo se observan cuando existe una cierta demora entre el traumatismo y el inicio del tratamiento, ya que la demanda energética del ejercicio físico sumada al desequilibrio metabólico que se produce durante los primeros días tras el impacto, impediría que el tratamiento tuviera un efecto beneficioso. Puesto que existen datos que apoyan que el ejercicio físico previo al traumatismo puede reducir las consecuencias metabólicas de la lesión, especialmente en las primeras horas o días tras el impacto, nuestra hipótesis de trabajo es que el ejercicio físico previo al impacto podría permitir la disminución de la demora de inicio del tratamiento tras el traumatismo, reduciendo el desarrollo del daño secundario desde un inicio y, con ello, los déficits cognitivos asociados al TBI.

En base a nuestra hipótesis, en este experimento hemos estudiado el efecto del momento de inicio del tratamiento (temprano/demorado) con ejercicio físico (voluntario), y la combinación de ambas pautas de ejercicio con el entrenamiento previo al traumatismo sobre los déficits de MRO, y el daño secundario, evaluado a través de la neurodegeneración y la neuroinflamación.

Por ello nuestros objetivos experimentales son determinar el efecto sobre los déficits de memoria (tarea de MRO), la neurodegeneración (volumen hipocampal y conteo de neuronas maduras) y la activación microglial asociados a un TBI, producidos por las siguientes pautas de ejercicio:

- Ejercicio físico durante los 18 días previos al traumatismo;
- Ejercicio físico iniciado 24 horas o 6 días tras el traumatismo;
- Ejercicio físico iniciado 24 horas o 6 días después del traumatismo en animales que han realizado 18 días de ejercicio físico antes del trauma cerebral.

TRABAJO EXPERIMENTAL

6. TRABAJO EXPERIMENTAL

6.1 Material y Métodos

6.1.1 Ética y Bienestar Animal

El procedimiento experimental llevado a cabo en esta investigación se ha realizado siguiendo la normativa vigente de la Unión Europea respecto a la protección de los animales empleados en la experimentación y otras finalidades científicas (2010/63/UE, de 22 de septiembre de 2010) y de acuerdo con el real decreto del Estado Español (Real Decreto 1386/2018, de 19 de noviembre de 2018) que regula los aspectos éticos de cuidado y de control de los animales para experimentación. Además, el procedimiento está aprobado por la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona y por la Generalitat de Catalunya (n.º de orden 9734-P2).

6.1.2 Sujetos

Se utilizaron un total de 84 ratas albinas macho de la cepa Sprague-Dawley (Prolabor, Barcelona). En el momento de llegada a nuestro laboratorio las ratas tenían 5 semanas de edad y permanecieron en cuarentena 7 días con la finalidad de asegurar que no presentaban problemas de salud. Tras la cuarentena, los animales fueron estabulados en jaulas individuales (52 x 28 x 18 cm) en condiciones de temperatura (20-24 °C) y humedad (40-70%) controladas y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (inicio luz: 8:00 h). Durante todo el experimento el agua era suministrada *ad libitum* y la comida limitada a 6 pellets (26 g aproximados) diarios, cantidad por encima de la recomendada para el mantenimiento de las ratas adultas. Realizamos este procedimiento de control de la comida ya que hemos comprobado en nuestro laboratorio que el acceso ilimitado al alimento genera un exceso de ingesta y tendencia a la obesidad, especialmente en animales sedentarios. En el momento de la estabulación en jaulas individuales, los animales fueron distribuidos de manera aleatoria en siete condiciones experimentales: intervención sham y condición sedentaria (grupo Sham), daño cerebral traumático y condición sedentaria (grupo TBI), y daño cerebral traumático con diferentes pautas de ejercicio físico: Pre-TBI (ejercicio previo a la lesión), TBI-early (ejercicio de inicio temprano tras el traumatismo), TBI-late (ejercicio de inicio demorado tras el traumatismo), Pre-TBI-early (ejercicio previo y ejercicio de inicio temprano tras el traumatismo) y Pre-TBI-late (ejercicio previo y ejercicio de inicio demorado tras el traumatismo). Para habituar a los animales a la manipulación por parte del investigador, se realizaban dos sesiones de handling de 5 min, una el día de la separación y estabulación en jaulas individuales y otra al día siguiente.

6.1.3 Administración de Analgésicos por Ingestión Voluntaria

Para reducir el dolor postoperatorio, se administró el analgésico buprenorfina (Buprex[®], Indivior, Irlanda) 1 h antes de la cirugía. La administración se realizaba por ingestión voluntaria con una mezcla de buprenorfina con pasta de cacao (Nutella[®], Ferrero, Italia) a una concentración de 0,2 mg/g de Nutella y una dosis de 0,4 mg/kg de peso corporal. Este procedimiento analgésico está validado en ratas (Goldkuhl et al., 2010) y explicado detalladamente por Abelson et al. (2012). Para asegurar que el día de la intervención los animales consumían en pocos minutos la pasta de cacao con el analgésico, los dos días previos a la cirugía eran habituados a la pasta de cacao. Para ello, se adhería en la pared interior de cada jaula, a unos 10 cm del techo, un trozo de cinta adhesiva sobre la que se colocaba 0,5 g de la pasta de cacao que se dejaba hasta que los animales la consumían.

6.1.4 Intervención Quirúrgica

A los 20 días de la separación, se realizó la intervención quirúrgica para generar una lesión cerebral traumática mediante un dispositivo de impacto cortical controlado (CCI) (Pittsburgh Precision Instruments, Inc, EE.UU.). Los animales eran introducidos individualmente en una caja de metacrilato (20 x 13 x 13 cm) para proceder a la inducción de la anestesia con isoflurano (Forane[®], Abbott Laboratories, SA, Madrid, España) al 5% mezclado con oxígeno (flujo de 1 l/min), durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se extraía al animal de la caja y se fijaba su cabeza al aparato de estereotaxia (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EE.UU.) que tenía una máscara para el hocico del animal por donde se le administraba la anestesia de mantenimiento durante toda la intervención (isoflurano al 2-3% y oxígeno 0,8 l/min) (Figura 14A). Antes de comenzar la intervención se comprobaba que el animal no presentara reflejo interdigital. Durante todo el proceso la temperatura del animal se mantenía constante mediante una esterilla eléctrica.

Cuando la rata estaba colocada en el aparato de estereotaxia se administraba una gota de cloruro de sodio 0.9 g (FisioVet[®] B. Braun Medical S.A. España) en cada ojo, se procedía a rasurar la parte superior de la cabeza, y se aplicaba lidocaína (Xilonibsa[®], 10 mg/ pulsación, Inibsa dental S.L.U. Barcelona, España) tópicamente antes de realizar la incisión sagital en la piel. A continuación, se sujetaba la piel mediante pinzas quirúrgicas a ambos lados de la línea media. Posteriormente, se procedía a la limpieza de la zona con suero fisiológico para visualizar Bregma. Seguidamente se realizaba una craneotomía de 5 mm de diámetro sobre el lóbulo parietal derecho dejando intacta la duramadre (coordenadas: -4,5 mm posterior a Bregma y -3 mm lateral a la línea media).

El dispositivo de CCI dispone de un brazo con un pistón neumático retráctil colocado con una inclinación de 15° respecto a la vertical y con una punta plana de 3 mm de base en su extremo. Esta punta se colocaba en el centro de la craneotomía sobre la duramadre, que se tomaba como referencia para calcular la profundidad del impacto (Figura 14B). Una vez retraído el pistón, se bajaba manualmente 2 mm y se accionaba el botón del dispositivo neumático para que la punta impactará sobre la duramadre con una velocidad de 6 m/s, una profundidad de 2 mm y con una duración de 150 ms. Un transductor (Macro Sensorss, Pennsauken, N.J, EE.UU.) conectado al dispositivo medía la velocidad y la duración del impacto para verificar los parámetros del mismo. Tras la lesión, se limpiaba el área con suero fisiológico y se suturaba la piel. Una vez finalizada la intervención, se aplicaba una solución dérmica de povidona iodada 10 g (Topionic[®], Esteve, España) antiséptica y desinfectante en la sutura, tras lo cual se retornaba el animal a su jaula y se esperaba a que se recobrara para devolverlo al estabulario. Los animales del grupo Sham pasaban por todas las fases de la intervención (anestesia, incisión, craneotomía y sutura), excepto por el impacto cortical. Durante los 3 días posteriores a la operación se realizaba un seguimiento del peso, ingesta de comida, conducta y cicatrización de la herida para detectar posible malestar en el animal. Los puntos de sutura eran retirados a los 3 o 4 días de la intervención.

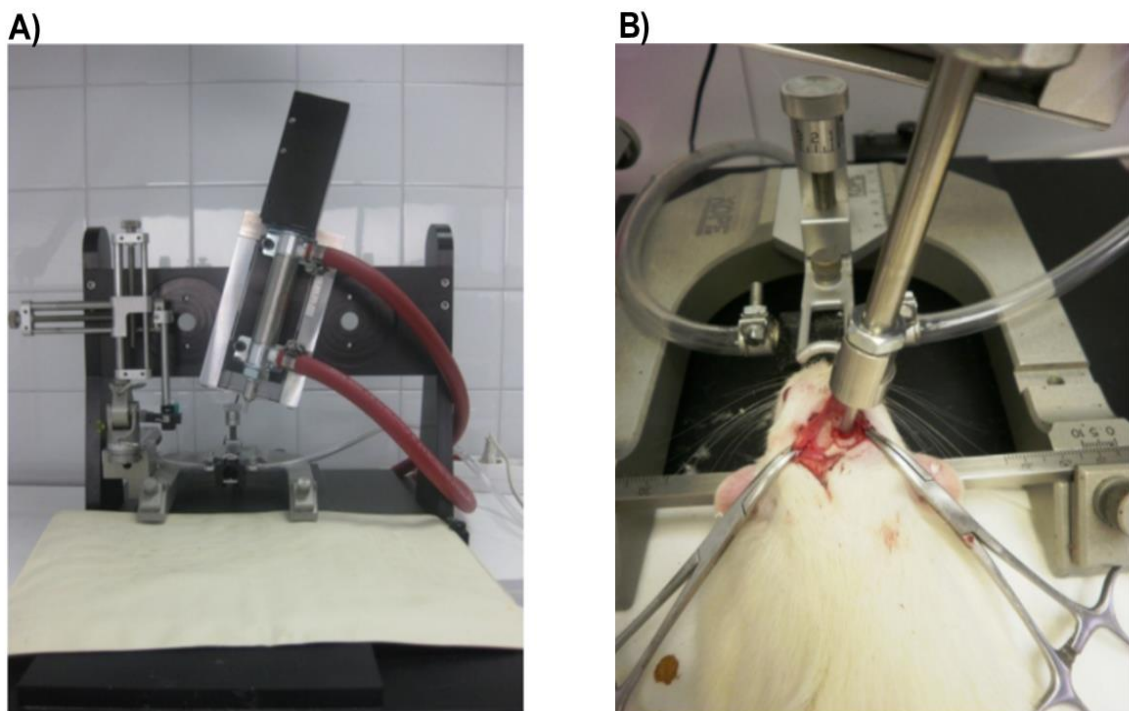


Figura 14. A) Dispositivo de impacto cortical controlado. B) Animal fijado al aparato estereotáxico y con el dispositivo de CCI preparado para realizar el impacto.

6.1.5 Ejercicio en Rueda de Actividad

Los animales que pertenecían a los grupos de ejercicio físico eran estabulados en jaulas homologadas de plástico transparente (48 x 26 x 20 cm) acopladas a una rueda de actividad de 37 cm de diámetro (Rat Wheel, ENV-042, Med Associated, Inc. EE.UU.) a la cual tenían acceso ilimitado durante el período de ejercicio (Figura 15). La rueda contaba con un cuentakilómetros (modelo 506, Sigma, Alemania) que permitía registrar diariamente la distancia recorrida y la duración del ejercicio.



Figura 15: Imagen de las jaulas de estabulación. A la derecha, con rueda de actividad y a la izquierda, sin rueda de actividad acoplada.

La pauta de ejercicio dependió del grupo experimental:

- Pre-TBI: ejercicio durante los 18 días previos al traumatismo.
- TBI-early: ejercicio postlesión de inicio temprano (24 h después del traumatismo) que se mantiene hasta el final del experimento (14 días).
- Pre-TBI-early: ejercicio durante los 18 días previos al traumatismo y ejercicio postlesión de inicio temprano (24 h después del traumatismo) que se mantiene hasta el final del experimento (14 días).
- TBI-late: ejercicio postlesión de inicio demorado (6 días después del traumatismo) que se mantiene hasta el final del experimento (9 días).
- Pre-TBI-late: ejercicio durante los 18 días previos al traumatismo y ejercicio postlesión de inicio demorado (6 días después del traumatismo) que se mantiene hasta el final del experimento (9 días).

Como se puede observar, los días de tratamiento tras la lesión difieren entre los grupos *early* y *late*. Esto se debe a la necesidad de fijar el período que transcurre entre el traumatismo y la evaluación de las variables cognitivas e histológicas, ya que nuestro objetivo es estudiar el efecto del tratamiento sobre el desarrollo del daño secundario y las secuelas asociadas. Las jaulas utilizadas en los grupos Sham y TBI, así como para los otros grupos durante las fases sedentarias, eran homologadas y de plástico transparente (52 x 28 x 18 cm).

6.1.6 Tarea de Memoria de Reconocimiento de Objetos

La prueba de MRO se basa en la tendencia espontánea de los roedores a explorar aquellos estímulos que les son novedosos (Clark et al., 2000). La prueba consistió de tres sesiones de habituación, un test de neofobia, una sesión de adquisición y dos sesiones de retención, una a las 3 h de la adquisición y la otra a las 24 h de la adquisición. Los procedimientos de la MRO se iniciaban 12 días después de la operación. La MRO se realizaba en una caja cuadrada abierta por arriba (65,5 x 65,5 x 35 cm) de madera conglomerada y forrada con melamina de color marrón oscuro. Esta caja estaba situada en el interior de una caja de aislamiento (157 x 71,5 x 71,5 cm) en cuyo techo se ubicaba una luz que proporcionaba 30 luxes de iluminación en el suelo de la caja MRO. Un extractor permitía la renovación del aire además de generar un ruido blanco constante. Todas las sesiones se registraban mediante una cámara de video (C615, Logitech) situada en el centro del techo de la caja de aislamiento y conectada a un ordenador con el programa AnyMaze (Stoelting Company, EE.UU.). Posteriormente, los vídeos se visionaban para contabilizar el tiempo de exploración a cada objeto con el programa Object Recognition Task (Versión 2, 2008; Manon Schaap, Maastricht University, Holanda).

Los objetos utilizados para la MRO fueron los siguientes: en la sesión de neofobia se utilizaba una construcción a base de piezas de Lego[®], en las sesiones de adquisición y retención se utilizaron diferentes objetos, una construcción de piezas de Lego[®], una lata y un colgador (Figura 16). Todos los objetos eran de dimensiones similares y se había comprobado en experimentos previos que no existía preferencia espontánea por ninguno de ellos (Amorós-Aguilar et al., 2020). Aun así, se utilizó un patrón contrabalanceado tanto del posicionamiento de los objetos con el fin de controlar la posible preferencia de lugar (izquierda o derecha) como del orden de presentación (familiar-nuevo) de los objetos siguiendo un criterio establecido previamente para todos los grupos experimentales. Para evitar las posibles pistas olfativas, la caja y los objetos se limpiaban después de cada sesión con una solución alcohólica (70% en agua destilada). En la primera sesión, la limpieza se realizaba antes de empezar.

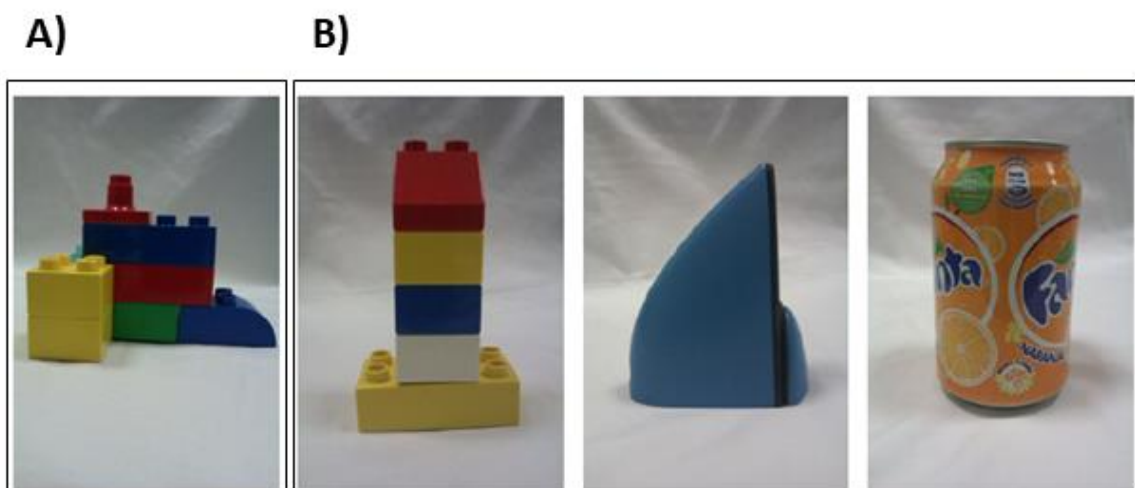


Figura 16. Objetos utilizados en la MRO. A) Objeto utilizado en la sesión de neofobia. B) Objetos utilizados en la sesión de adquisición y en las retenciones.

Habitución

Los animales realizaban tres sesiones de habituación a la caja experimental de 12 min cada una. Las dos primeras se realizaban durante el primer día de entrenamiento de MRO, siempre por la mañana con un tiempo entre sesiones de 90 min. La tercera habituación se realizaba el segundo día de entrenamiento de la MRO, también por la mañana. Los animales eran situados en el centro de la caja de MRO sin objetos, únicamente con la luz y el ruido blanco de fondo, y se les dejaba explorar durante 12 min. En cada habituación se medía la distancia total recorrida.

Test de neofobia

El test de neofobia se realizaba el segundo día de entrenamiento de la MRO, 90 min después de la tercera sesión de habituación. Este test permite evaluar el grado de reactividad emocional del animal ante un objeto novedoso presentado en un entorno familiar. Dicho objeto se colocaba en el centro de la caja experimental, fijado al suelo mediante una cinta adhesiva de doble cara para evitar que se desplazara al ser explorado. El animal era colocado de espaldas al objeto y se le dejaba explorar libremente durante 10 min. En la sesión de neofobia se registraba la latencia de la primera exploración y el tiempo total de exploración al objeto.

Adquisición

El tercer día del procedimiento de la MRO se realizaba la sesión de adquisición. Para ello, se situaban dos objetos idénticos (Lego® -Lego®, lata-lata o colgador-colgador) en dos esquinas contiguas de la caja experimental, a 10 cm de las paredes y pegados al suelo con cinta adhesiva de doble cara. Se colocaba el animal dentro de la caja mirando en dirección opuesta

a los objetos y se le dejaba 15 min para explorarlos libremente. Se registraba el tiempo de exploración de cada objeto. Se consideraba que el animal estaba explorando el objeto cuando su cabeza estaba orientada hacia el objeto y tenía el hocico a una distancia máxima de 2 cm. Se estableció un criterio de exploración mínima de 10 s para incluir a los sujetos en el análisis de MRO (Akkerman et al., 2012).

Retención 1 (RT1, 3 h)

La primera sesión de retención tenía una duración de 5 min y se realizaba 3 h después de la adquisición, durante el tercer día de entrenamiento de la MRO. En esta sesión, se situaban dos objetos en las mismas esquinas de la caja donde se habían situado los objetos en la adquisición. Uno de los objetos ya había sido presentado en la sesión de adquisición (objeto familiar) y el otro no había sido presentado en ninguna de las sesiones anteriores (objeto nuevo). Se colocaba el animal dentro de la caja mirando en dirección opuesta a los objetos y se le dejaba 5 min para explorarlos libremente. Se registraba el tiempo de exploración de cada uno de los objetos.

Retención 2 (RT2, 24 h)

La segunda retención tenía lugar 24 h después de la sesión de adquisición. El lugar de colocación de los objetos y la duración de la sesión eran exactamente iguales a la primera retención. En esta sesión se utilizaban dos objetos, uno familiar que ya se había presentado en la sesión de adquisición y en la primera retención, y un objeto novedoso diferente al objeto nuevo expuesto en la primera retención. La posición del objeto novedoso, entre la primera y segunda retención, era contrabalanceado para evitar la influencia de la preferencia de lugar. Al igual que en la primera retención se registró el tiempo de exploración de cada objeto.

Para analizar los resultados y determinar si los animales recordaban el objeto familiar en cada sesión de retención se calculó el índice de discriminación, según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de discriminación} = \left(\frac{\text{Tiempo de exploración del objeto nuevo} - \text{Tiempo de exploración del objeto familiar}}{\text{Tiempo de exploración del objeto nuevo} + \text{Tiempo de exploración del objeto familiar}} \right) \times 100$$

Este índice permite comparar las diferencias entre el tiempo de exploración del objeto nuevo y del familiar sin la influencia del tiempo total de exploración (Akkerman et al., 2012). Un índice similar a cero indica que no hay diferencias en la exploración de ambos objetos (familiar y nuevo) y, por tanto, una falta de recuerdo del objeto familiar. Los valores positivos y estadísticamente diferentes de 0 indican una mayor exploración del objeto novedoso y, por

tanto, el recuerdo del objeto familiar. En la figura 17 podemos observar todas las fases que componen la MRO.

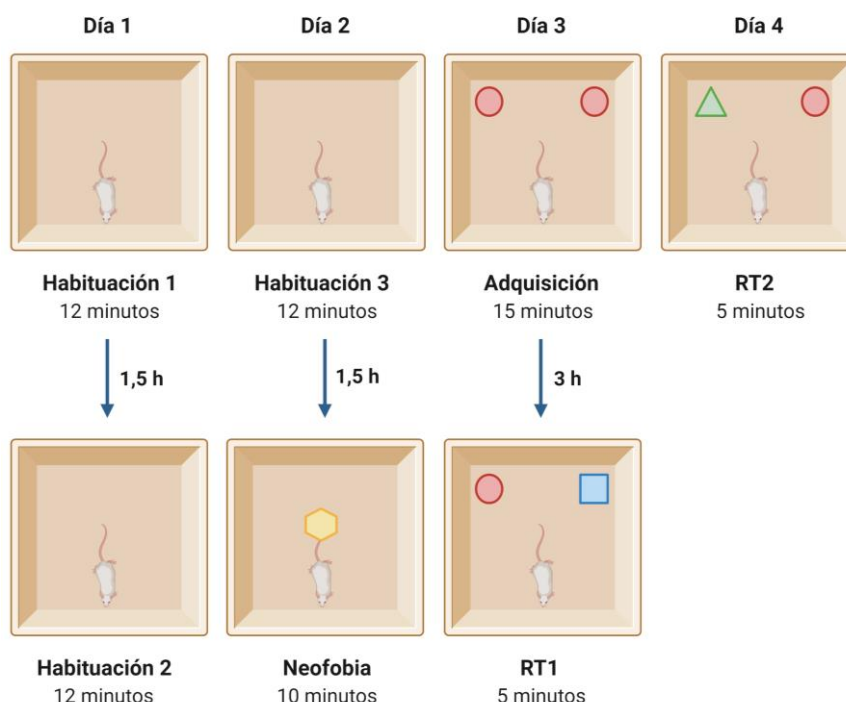


Figura 17. Sesiones de la tarea de MRO, duración de cada una, tiempo entre sesiones y detalle de la posición de los objetos. Día 1,2,3 y 4 de la prueba de MRO (equivalente al día 32, 33, 34 y 35 del experimento, respectivamente) Creado con BioRender.com

6.1.7 Histología

6.1.7.1 Eutanasia y Perfusión Intracardiaca

Al día siguiente de la segunda retención, los animales eran sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal, 200 mg/kg; Vetoquinol S.A. Madrid-Spain). Una vez se observaba que no había reflejo interdigital se procedía a realizar la perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma Aldrich, Madrid). Se utilizó una bomba de perfusión (J.P Selecta, S.A Barcelona) a 30 rpm con un caudal aproximado de 70 ml/min. El caudal se mantenía hasta que el animal estaba bien perfundido (extremidades rígidas y decoloración del hígado son algunas de las señales de una perfusión correcta). Una vez extraída la aguja de perfusión, se decapitaba el animal y se procedía a extraer el encéfalo que se dejaba en una solución de paraformaldehído al 4% a una temperatura de 4 °C durante 3 h. Después se realizaban tres lavados de 20 min cada uno con tampón fosfato (pH 7,4 y 0,1 M) y finalmente se sumergía en una solución de sacarosa al 30% y tampón fosfato (solución crioprotectora) a 4 °C durante aproximadamente 72 h. Posteriormente se procedía a su congelación con isopentano (Sigma Aldrich, Madrid) para su conservación en un congelador de -80 °C.

6.1.7.2 Obtención de Cortes Coronales

La obtención de cortes coronales se realizó mediante un criostato (Shandon Crytome FSE, Thermo Electron Corporation, Massachusetts, EE.UU.) a una temperatura constante de -20 °C. El grosor de los cortes era de 40 µm y se recogían a lo largo de toda la cavidad de la lesión, aunque en algunos casos no se podía llegar hasta el final ya que resultaba muy difícil que no se produjera una rotura del tejido (Figura 18).

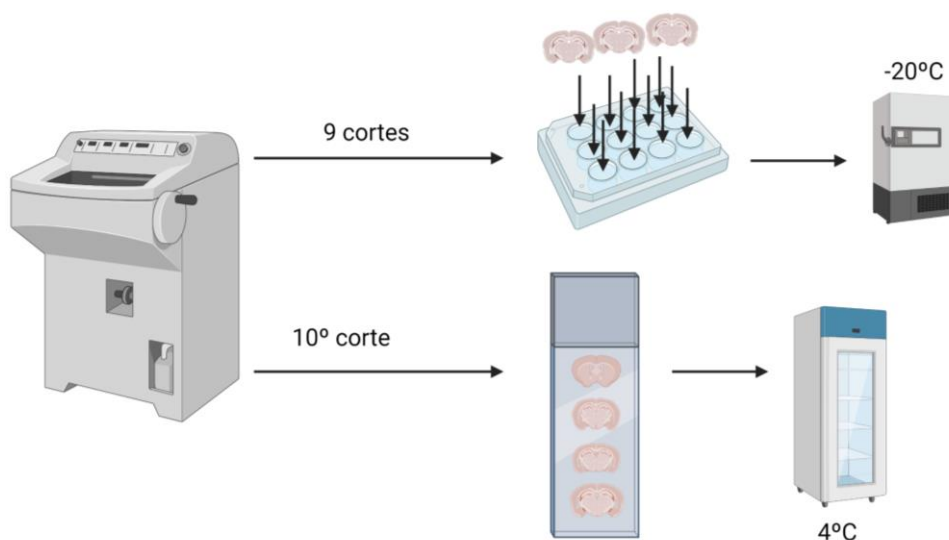


Figura 18. Representación del patrón de recogida de las muestras y su forma de conservación. Creado con el BioRender.com

Antes de empezar a cortar, se realizaba un pequeño corte en la corteza del hemisferio contralateral a la lesión (hemisferio izquierdo) para posteriormente poder identificar los hemisferios. El patrón de recogida se mantuvo constante durante todo el proceso de obtención del tejido cerebral. Se realizaron series de diez cortes, los nueve primeros se destinaban a las pruebas inmunohistoquímicas de NeuN (*neuronal nuclear protein*) e Iba-1 (*ionized calcium-binding adaptor molecule 1*) y se recogían en pocillos consecutivos con solución anticongelante en condiciones de free-floating, conservándose a -20 °C. El décimo corte de cada serie se montaba directamente sobre un portaobjetos gelatinizado y se destinaba a la valoración macroscópica del volumen del hipocampo dorsal a través de la tinción con violeta de cresilo y se conservaba a 4 °C.

6.1.7.3 Análisis Macroscópico: Tinción con Violeta de Cresilo.

Para determinar el efecto del traumatismo sobre el volumen del hipocampo dorsal, los cortes montados sobre portas gelatinizados pasaban por una batería de alcoholes de 70%, 95%, 100% y violeta de cresilo al 0,5% y se cubrían con un cubreobjetos con medio de montaje

DPX (Sigma Aldrich, Madrid). Para la valoración macroscópica del volumen del hipocampo dorsal, se obtuvieron imágenes digitalizadas de los cortes con un escáner de sobremesa (HP scanjet G4050) (Figura 19).

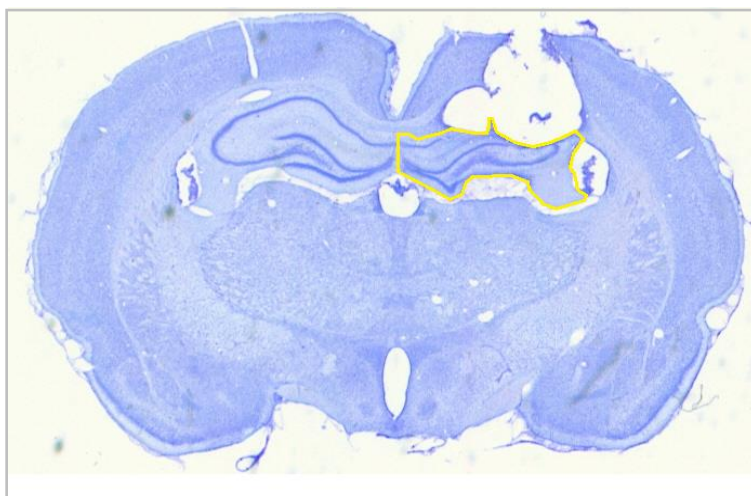


Figura 19. Hipocampo marcado a través del software de análisis de imágenes de muestras biológicas Fiji, a través del cual obteníamos el área de cada hipocampo dorsal.

En estudios previos hemos constatado que el traumatismo con los parámetros utilizados da lugar a una disminución del volumen del hipocampo ipsilateral a la lesión (Amorós-Aguilar et al., 2015; Jacotte-Simancas et al., 2015). Para valorar esta disminución, utilizamos el programa de análisis de imagen Fiji (Schindelin et al., 2012) con el que dibujamos en cada corte el contorno del hipocampo contralateral e ipsilateral a la lesión para obtener su área.

A partir de estas áreas se hizo una estimación del volumen total de cada hipocampo utilizando el método de Cavalieri. Para ello, se calculaba el volumen parcial multiplicando el área del hipocampo por el grueso de cada corte (0,04 mm) y por el número de secciones hasta la siguiente sección teñida con violeta (10 secciones). El sumatorio de estos volúmenes parciales nos proporcionaba el volumen total del hipocampo entre las coordenadas estudiadas (-1,80 a -4,20 mm respecto a Bregma) (Paxinos & Watson, 2007) en cada hemisferio. A continuación, podemos ver la fórmula aplicada:

$$\text{Volumen} = \Sigma(\text{Área hipocampo} * 0,04 * 10)$$

Para evaluar la disminución del volumen del hipocampo ipsilateral respecto al contralateral sin la influencia del número de secciones cerebrales analizadas para cada sujeto, calculamos la ratio hipocampal (relación, en porcentaje, entre el volumen del hipocampo ipsilateral y el contralateral) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio hipocampal} = \left(\frac{\text{Volumen hipocampo ipsilateral}}{\text{Volumen hipocampo contralateral}} \right) \times 100$$

Los valores iguales a 100 indican igualdad de volúmenes en ambos hemisferios, y valores estadísticamente inferiores a 100 indican que el volumen del hipocampo ipsilateral es menor que el volumen del hipocampo contralateral a la lesión.

6.1.7.4 Inmunohistoquímica de la NeuN.

Para determinar la pérdida de neuronas maduras asociada a la lesión, se realizó la inmunohistoquímica de NeuN y la posterior cuantificación de células NeuN⁺ en el hilus del GD del hipocampo y en la PRhc debido a su implicación con la tarea de MRO (Cohen & Stackman, 2015). La proteína NeuN se encuentra presente en el núcleo y el citoplasma de la mayoría de las neuronas maduras que conforman el sistema nervioso de los vertebrados, incluyendo neuronas de la médula espinal, corteza cerebral, hipocampo, tálamo dorsal, caudado/putamen y cerebelo (Duan et al., 2016). Desde que fue descrita por primera vez por Mullen et al (1992), se ha convertido en una importante herramienta para el estudio del sistema nervioso, tanto en condiciones normales como patológicas (Maxeiner et al., 2014).

El procedimiento de la inmunohistoquímica de la NeuN fue realizado por el método de la estreptavidina-biotina y el revelado mediante DAB con níquel. Los cortes se mantenían en agitación a 80 rpm durante todo el procedimiento. En primer lugar, para cada sujeto, se realizó un muestreo aleatorio y sistemático (elección aleatoria de la serie de secciones coronales utilizada) de los cortes coronales que estaban en free-floating en solución anticongelante. Los cortes seleccionados se pasaban a una solución de TBS (Tris HCL 50 mmol/L pH 7,6) y se realizaron varios lavados sucesivos. Para bloquear la peroxidasa endógena del tejido cerebral, los cortes se incubaron durante 10 min en H₂O₂ al 0.3% (Panreac®, 141076) diluido en una solución de metanol al 70% en agua destilada. Tras los lavados sucesivos en TBS y TBS-T (Tris HCL 50 mmol/L, pH 7.6 + 1% Tritón), el tejido se incubó durante 1 h con una solución de bloqueo de uniones inespecíficas (Fetal Bovine Serum al 10% y 0,3% de Bovine Serum Albumine en TBS-T). Transcurrido ese tiempo, se realizó la incubación con el anticuerpo primario (Mouse anti-NeuN, MAB377, Sigma, 1:500) diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche en agitación a 4 °C. Al día siguiente se dejaba durante 1 h a temperatura ambiente y, tras sucesivos lavados con TBS-T, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario (Goat anti-Mouse IgG (H+L), Biotin Conjugate, SAB 4600004, Sigma, 1:1000) diluido en la solución de bloqueo durante 1 h. Tras sucesivos lavados con TBS-T se procedió a la incubación del tejido con estreptavidina unida a peroxidasa de rábano (1:3600, SA-HRP

conjugate, NEL 750001EA Perkin Elmer), diluida en TBS-T, que se une a la biotina del anticuerpo secundario permitiendo el revelado con DAB. Tras sucesivos lavados con TBS y TB, se realizó el revelado con el kit de DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate, SK-4100, Vector) dejando actuar 4 min. Por último, se realizaban los sucesivos lavados con las soluciones tampón y las secciones fueron montadas en portaobjetos. Al día siguiente se realizaban las deshidrataciones con alcoholes a diferentes porcentajes de concentración (50%, 70%, 95% y 100%) y se aplicaba HistoClear. Para finalizar se cubría el tejido con medio de montaje (Histomount[®], National Diagnostic) y un cubreobjetos.

6.1.7.5 Inmunohistoquímica de Iba-1

Para estudiar la activación microglial se realizó un procesamiento inmunohistoquímico para el anticuerpo de Iba-1, una proteína específica de macrófagos y microglía cuya expresión se relaciona con la microglía reactiva (Blaszczyk et al., 2018; Norden et al., 2016). Se cuantificó la intensidad y el porcentaje de área del marcaje de Iba-1 en el hipocampo dorsal y en el tálamo dorsal, ya que en estudios previos con el mismo modelo de TBI se observó un aumento de la activación microglial en ambas estructuras (Amorós-Aguilar et al., 2020; Vivanco, 2019). Para cada sujeto, se realizó un muestreo aleatorio y sistemático (elección aleatoria de la serie de secciones coronales utilizada) de los cortes coronales que estaban en free-floating en una solución anticongelante. La inmunohistoquímica de Iba-1 se realizó con el método de la estreptavidina-biotina y el revelado mediante DAB. Los cortes se mantenían en agitación a 80 rpm durante todo el procedimiento. Para bloquear la peroxidasa endógena del tejido cerebral, los cortes se incubaron durante 10 min en H₂O₂ al 0.3% (Panreac[®], 141076) diluido en una solución de metanol al 70% en agua destilada. Seguidamente se hicieron sucesivos lavados con las soluciones tampón y se realizó la preincubación con 10% de FBS y 0.3% de BSA diluido en TBS-T para el bloqueo de uniones inespecíficas. Posteriormente se procedió a la incubación con el anticuerpo primario (rabbit, anti-Iba1, GTX00042, Genetex, Dilución 1:1000) diluido en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, después de 1 h a temperatura ambiente, se realizaron sucesivos lavados en las diferentes soluciones tampón y el tejido se incubó con el anticuerpo secundario (goat antirabbit Vector, Dilución 1:500) diluido en solución bloqueo, durante 1 h. Después de sucesivos lavados, el tejido se incubó durante 1 h con estreptavidina (Streptavidin Peroxidase, SA-5004-1, Vector Laboratories, Dilución 1:500) diluida en solución bloqueo. La estreptavidina se une a la biotina del anticuerpo secundario y permite revelar la DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate, SK-4100, Vector Laboratories). Tras sucesivos lavados, se procedió al revelado mediante el kit de DAB que se dejó actuar 3 min. Por último, se realizaron los sucesivos lavados con las soluciones tampón y las secciones fueron montadas en portaobjetos. Al día

siguiente se realizaban las deshidrataciones con alcoholes a diferentes porcentajes de concentración (50%, 70%, 95% y 100%) y se aplicaba HistoClear. Para finalizar se cubrió el tejido con medio de montaje (Histomount[®], National Diagnostic) y un cubreobjetos.

6.1.7.6 Cuantificación de Células NeuN⁺ en PRhc

Para cada animal se examinaron dos o tres secciones cerebrales, entre las coordenadas -3,00 mm y -4,20 mm respecto a Bregma (Paxinos & Watson, 2007). Para poder examinar cada una de las secciones se utilizó un microscopio de campo claro (Modelo Axio Imager. A1, Zeiss Group, Oberkochen-Germany) con un objetivo x10, al que iba acoplado una cámara DSLR digital (EOS_6D_Mark II, Canon Europe, Amsterdam, Holanda) para obtener las imágenes digitales.

De cada sección cerebral se realizaron dos o tres fotografías parciales de la PRhc que fueron unidas mediante el programa de análisis de imagen Fiji (Schindelin et al., 2012) para la obtención de una panorámica completa de la PRhc. La cuantificación se realizó siguiendo los principios de estereología. En primer lugar, se delimitó el área a analizar generando una ROI (Region of Interest) de toda la PRhc (Paxinos & Watson, 2007) sin incluir el área más externa al ser una zona de alta densidad celular (Figura 20). A continuación, se realizó un muestreo aleatorio y sistemático de las zonas a cuantificar (disectores físicos) dentro de la ROI, ejecutando una macro previamente establecida que generaba una cuadrícula posicionada aleatoriamente sobre la imagen. Cada cuadrado (disector) tenía un área de 0,001245 mm² y se contabilizaron aquellas células contenidas o tocando los márgenes de inclusión en 1 de cada 25 disectores.

Para obtener la densidad total (Dt) de células NeuN⁺ en cada corte y para cada hemisferio se realizó el siguiente cálculo adaptado de los cálculos de disector óptico (Yurt et al., 2018).

$$Dt = \left(\frac{\text{Número total de neuronas contadas}}{\text{Número de disectores contados} * \text{Área disector}} \right)$$

Posteriormente se obtuvo la ratio interhemisférica de densidad de células NeuN⁺ de cada corte mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio interhemisférica} = \left(\frac{Dt \text{ PRhc ipsilateral}}{Dt \text{ PRhc contralateral}} \right) \times 100$$

Una vez obtenida esta ratio se realizó la media de todos los cortes para obtener la ratio interhemisférica de densidad de células NeuN⁺ en la PRhc de cada sujeto. Los valores inferiores a 100 indican una menor densidad de células NeuN⁺ en el hemisferio ipsilateral a la lesión en comparación con el hemisferio contralateral.

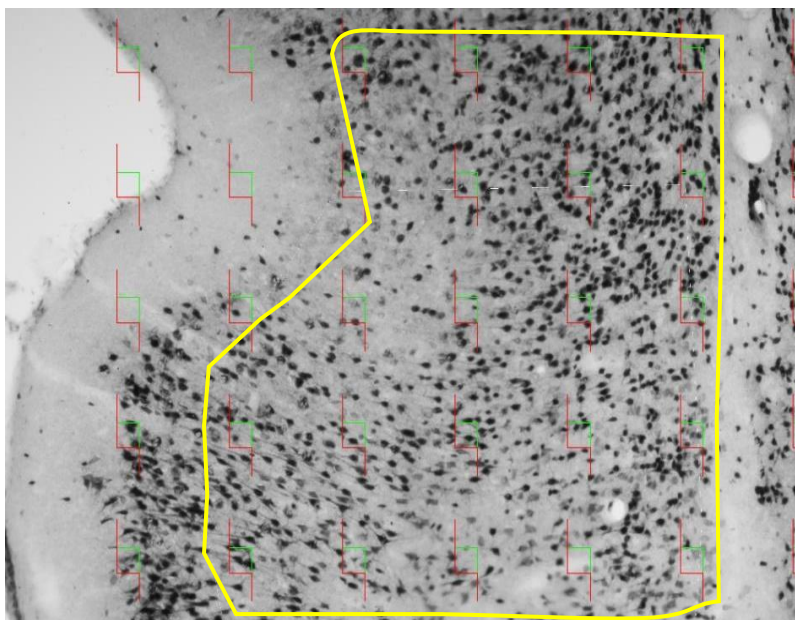


Figura 20: Corteza PRhc con el detalle de los disectores con los lados de inclusión (verde) y exclusión (rojo) y la ROI establecida (amarillo), del hemisferio contralateral al lesión.

6.1.7.7 Cuantificación de células NeuN⁺ en el hilus del GD del hipocampo

Para cada animal se examinaron dos o tres secciones cerebrales, entre las coordenadas -2,76 mm y -4,20 mm respecto a Bregma (Paxinos & Watson, 2007). La obtención de la imágenes se realizó de forma similar a la PRhc.

Para realizar la cuantificación, al ser en una zona de poca densidad celular, la ROI incluía todo el hilus del GD y se contaban manualmente todas las células NeuN⁺ (Figura 21). Por tanto, a diferencia de la PRhc, no se hacía una estimación del número de neuronas.



Figura 21. Imagen representativa del hilus del GD del hipocampo procesado mediante inmunohistoquímica de NeuN⁺ y el área de cuantificación seleccionada (ROI) en amarillo del hemisferio contralateral a la lesión.

El análisis se realizó utilizando los mismos índices que en la PRhc. En primer lugar, se calculó en cada hemisferio la densidad total (dividiendo el número de células marcadas contadas por el área de la ROI), con la que se obtuvo la ratio interhemisférica de cada corte. Finalmente, se calculó la media de la ratio interhemisférica de cada sujeto.

6.1.7.8 Cuantificación de Iba-1 en Hipocampo Dorsal

Las imágenes de las muestras procesadas mediante inmunohistoquímica de Iba-1 fueron obtenidas y analizadas mediante el mismo equipo (microscopio, objetivo, cámara y programa de procesamiento de imágenes) utilizado en la cuantificación de células NeuN⁺, pero utilizando un objetivo de x5. Se cuantificó tanto el área ocupada por marcaje de Iba-1 como la intensidad del mismo. Para cada animal se examinaron tres o cuatro secciones cerebrales, entre las coordenadas -2,76 y -4,20 mm respecto a Bregma (Paxinos & Watson, 2007).

Cuando se analiza la intensidad del marcaje debe asegurarse que la iluminación sea homogénea en toda la muestra y a lo largo de todos los sujetos. Al trabajar a bajos aumentos, como es el caso, existe un pequeño efecto viñeta que puede alterar esta homogeneidad. Por ello, además de asegurar que las condiciones de iluminación eran las mismas durante la adquisición de las imágenes, se realizó un procesamiento basado en el método *a priori* propuesto por Landini (2006-2020) que permite asegurar la homogeneidad de iluminación del fondo. En primer lugar, se realizaba una foto en blanco (microscopio encendido sin muestra) y otra en negro (microscopio apagado) después de cada sesión diaria de fotos.

Posteriormente, cada fotografía obtenida de las muestras se procesaba de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Imagen corregida} = \left[\frac{(\text{Muestra} - \text{negro})}{(\text{Blanco} - \text{negro})} \right] \times 255$$

Una vez teníamos las fotografías con la luz homogénea, se obtenía una imagen panorámica de todo el hipocampo a través de la unión de diversas fotografías parciales mediante el programa Fiji (Schindelin et al., 2012) y se invertía la escala de grises (0-255) de manera que valores más altos significaran un mayor marcaje. Para la cuantificación del marcaje de Iba-1 primero se marcaba el contorno del hipocampo contralateral (área de cuantificación seleccionada o ROI) (Figura 22) y, a través de una macro, se determinaba de manera automática el umbral de marcaje (opción *Huang dark*) y se registraba el porcentaje de área marcada y el valor medio del marcaje. Además, se apuntaba el valor mínimo del umbral obtenido, considerado valor de referencia para diferenciar el marcaje con Iba-1 del fondo. A continuación, se marcaba el contorno del hipocampo ipsilateral al traumatismo y se establecía manualmente el umbral de marcaje con el valor de referencia del hemisferio contralateral. Finalmente, se registraba el porcentaje de área marcada y el valor medio del marcaje del hipocampo ipsilateral.

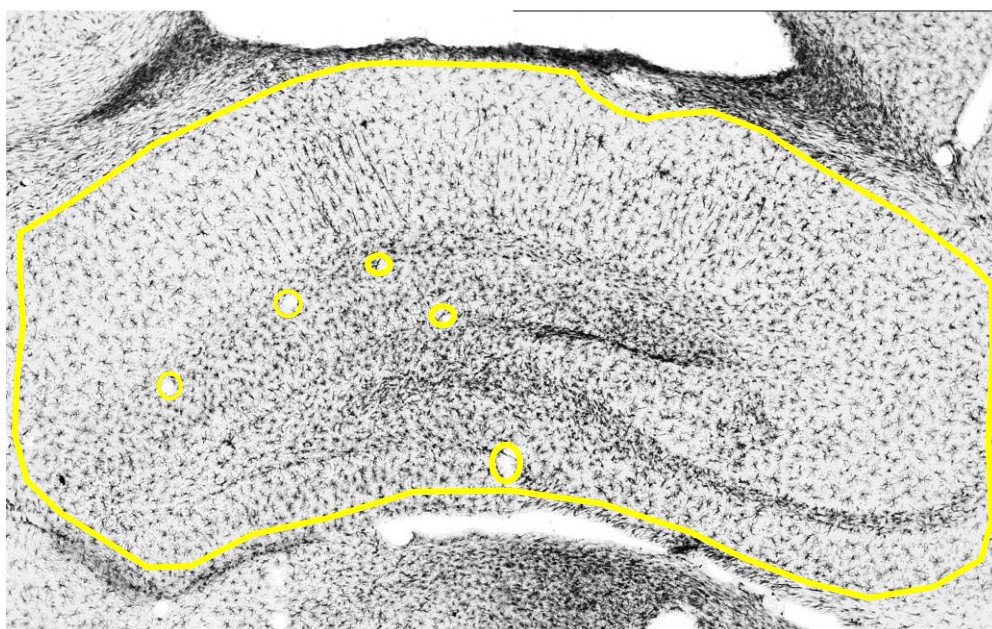


Figura 22. Imagen representativa del hipocampo dorsal procesado con inmunohistoquímica Iba-1 y área de cuantificación seleccionada (ROI) en amarillo del hemisferio ipsilateral a la lesión.

Para obtener la ratio interhemisférica del porcentaje del área ocupada por el marcaje Iba-1 y de la media de intensidad del marcaje en la región de interés, se calculaba para cada variable una ratio de cada corte con la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio Interhemisférica} = \left(\frac{\text{Hipocampo ipsilateral}}{\text{Hipocampo contralateral}} \right) \times 100$$

Finalmente, para cada variable se calculaba la media de las ratios de los cortes analizados.

6.1.7.9 Cuantificación de Iba-1 en Tálamo Dorsal

La cuantificación del marcaje Iba-1 también se realizó en la región dorsal del tálamo de ambos hemisferios, que incluye los complejos talámicos lateral dorsal, lateral posterior, la parte dorsal del núcleo reticular talámico y del cuerpo geniculado lateral. Para cada animal se examinaron tres o cuatro secciones cerebrales, entre las coordenadas -2,76 y -4,20 mm respecto a Bregma (Paxinos & Watson, 2007).

Las imágenes fueron realizadas y analizadas mediante el mismo equipo y con un método de procesamiento similar al de las muestras Iba-1 del hipocampo dorsal. De cada sección se realizaron ocho fotografías consecutivas comenzando desde la corteza del hemisferio contralateral a la lesión hasta la corteza del hemisferio ipsilateral. Posteriormente se obtuvo una imagen panorámica a través de la unión de las ocho fotografías mediante el programa Hugin (Versión 2015.0.0; para Microsoft Windows). Estas imágenes se cuantificaron con el programa Fiji (Schindelin et al., 2012), obteniendo los valores del porcentaje de área marcada y de la intensidad de marcaje y, finalmente, se calculó la ratio interhemisférica (Figura 23).

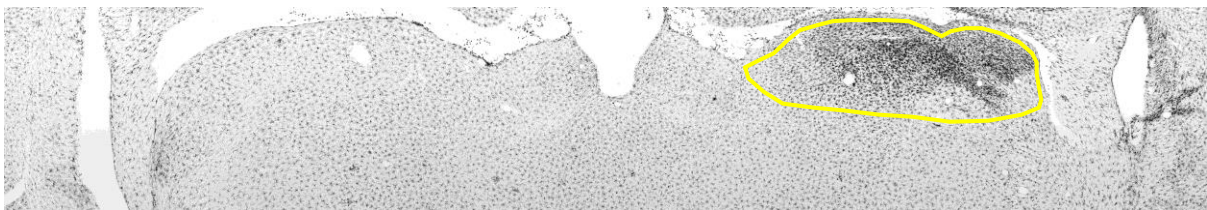


Figura 23. Imagen representativa del mosaico del tálamo dorsal de ambos hemisferios procesado mediante inmunohistoquímica Iba-1⁺. En amarillo la ROI seleccionada en el hemisferio ipsilateral a la lesión.

6.1.8 Cronograma del Experimento

En la siguiente figura puede observarse la temporalidad de las diferentes fases del experimento en todos los grupos experimentales (Figura 24).

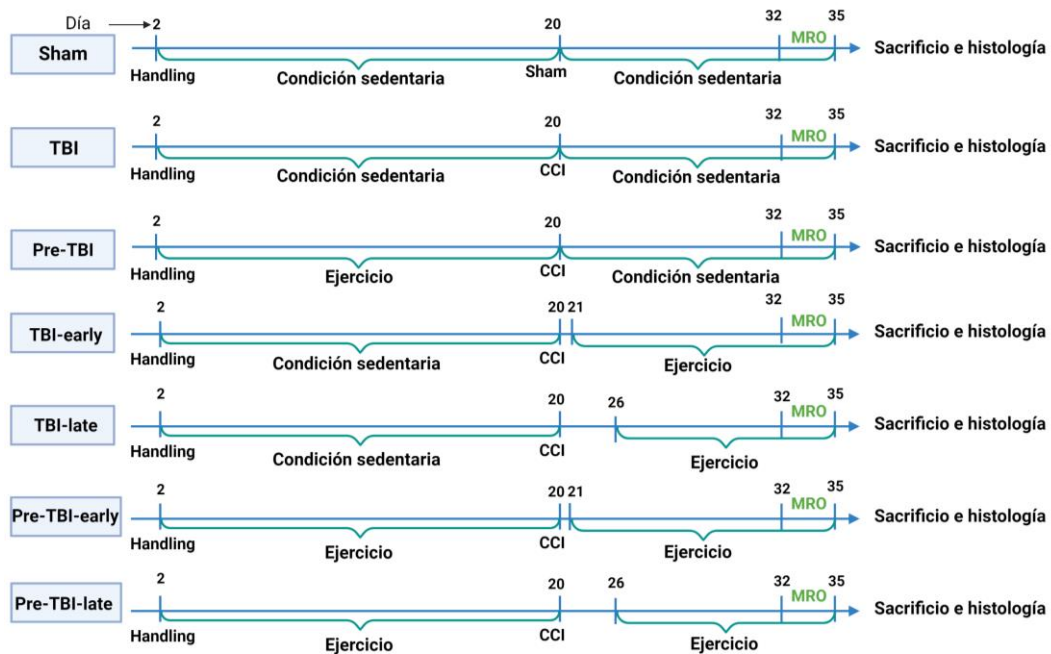


Figura 24: Cronograma del experimento y detalle de los grupos experimentales. Creado con BioRender.com

6.1.9 Análisis Estadísticos

Los datos fueron analizados con el programa R Versión 3.6.3 (Development Core Team, 2019) con el apoyo del software The Jamovi Project (2022).

Se realizaron gráficos box-plot para detectar la existencia de outliers en cada una de las variables estudiadas, que fueron posteriormente confirmados con pruebas t-test para una muestra.

Se realizaron pruebas de t de Student para una muestra para determinar si los índices de discriminación, así como algunas medidas macroscópicas e inmunohistoquímicas eran estadísticamente diferentes a un valor de referencia.

Para determinar diferencias entre grupos, utilizamos un análisis de la variancia de un factor (ANOVA) y contrastes *post hoc* de Tukey. En ausencia de homogeneidad de variancias (estadístico de Levene significativo), se utilizó el ANOVA de Welch y los contrastes *post hoc* Games-Howell.

Para estudiar la evolución entre sesiones de habituación en la tarea de MRO, utilizamos un ANOVA de medidas repetidas.

RESULTADOS

7. RESULTADOS

Del total de 84 animales utilizados para el experimento, tres animales no sobrevivieron a la intervención quirúrgica debido a problemas con la anestesia. Del resto, dos animales fueron eliminados por un error en el día de inicio del ejercicio y cuatro animales porque en la valoración macroscópica de la lesión con las secciones teñidas con violeta de cresilo se observó que presentaban una cavidad de lesión excesivamente grande no comparable al resto de sujetos. Por tanto, la muestra total para el análisis de resultados fue de 75 animales (Sham: n= 11, TBI: n= 12, Pre-TBI: n= 12, TBI-early: n= 11, TBI-late: n= 9, Pre-TBI-early: n= 10, Pre-TBI-late: n= 10).

7.1 Evolución del Peso de los Animales

En la figura 25 se muestra el peso de los animales en diferentes momentos del experimento, el primer día de handling, el día de la operación quirúrgica, el día después de la cirugía y el día de inicio de la MRO.

Un análisis de la varianza no detectó diferencias significativas de peso entre los grupos experimentales al inicio del experimento, pero si el día de la operación el [$F_{(6,68)} = 11.69$; $p < 0.001$]. Como puede verse en la figura 25, los grupos que habían realizado ejercicio previo a la intervención tenían un menor peso que el resto. Las comparaciones *post hoc* de Tukey indicaron que los grupos Pre-TBI y Pre-TBI-early tenían un peso significativamente menor al de los grupos TBI ($p < 0.001$ y $p = 0.001$, respectivamente), TBI-late ($p = 0.001$, $p = 0.01$, respectivamente) y TBI-early ($p = 0.003$ y $p = 0.046$, respectivamente). El grupo Pre-TBI-late presentó un peso significativamente menor a los grupos Sham ($p = 0.003$), TBI ($p < 0.001$), TBI-late ($p < 0.001$) y TBI-early ($p < 0.001$). También se detectaron diferencias significativas entre grupos en los pesos del día postoperatorio [$F_{(6,68)} = 9.099$; $p < 0.001$]. Las diferencias entre los grupos siguieron la misma tendencia que en el día de la operación. Las comparaciones *post hoc* de Tukey indicaron que la media del peso de los grupos Pre-TBI y Pre-TBI-early era significativamente inferior a la de los grupos TBI ($p = 0.001$ y $p = 0.006$, respectivamente) y TBI-late ($p = 0.001$ y $p = 0.009$, respectivamente). La media del peso del grupo Pre-TBI tendía a ser significativamente inferior a la del grupo TBI-early ($p = 0.059$). El grupo Pre-TBI-late tenía un peso significativamente inferior que el de los grupos Sham ($p = 0.004$), TBI ($p < 0.001$), TBI-late ($p < 0.001$) y TBI-early ($p = 0.003$).

El primer día de la prueba de MRO todos los grupos que habían realizado ejercicio tenían un peso inferior al de los grupos Sham y TBI. Así, un ANOVA indicó diferencias entre los grupos experimentales [$F_{(6,68)} = 8.588$; $p < 0.001$]. Los contrastes *post hoc* de Tukey indicaron que los grupos con ejercicio previo y posterior a la lesión, pre-TBI-early y Pre-TBI-late, presentaban

un peso inferior respecto a los grupos Sham ($p=0.042$ y $p<0.001$, respectivamente) y TBI ($p=0.001$ y $p<0.001$, respectivamente). Además, el peso medio del grupo Pre-TBI-late fue inferior respecto al del grupo Pre-TBI ($p=0.035$).

Por tanto, y como era de esperar, los animales con tratamiento de ejercicio tuvieron un menor peso a lo largo del experimento que los que se encontraban en condición sedentaria.

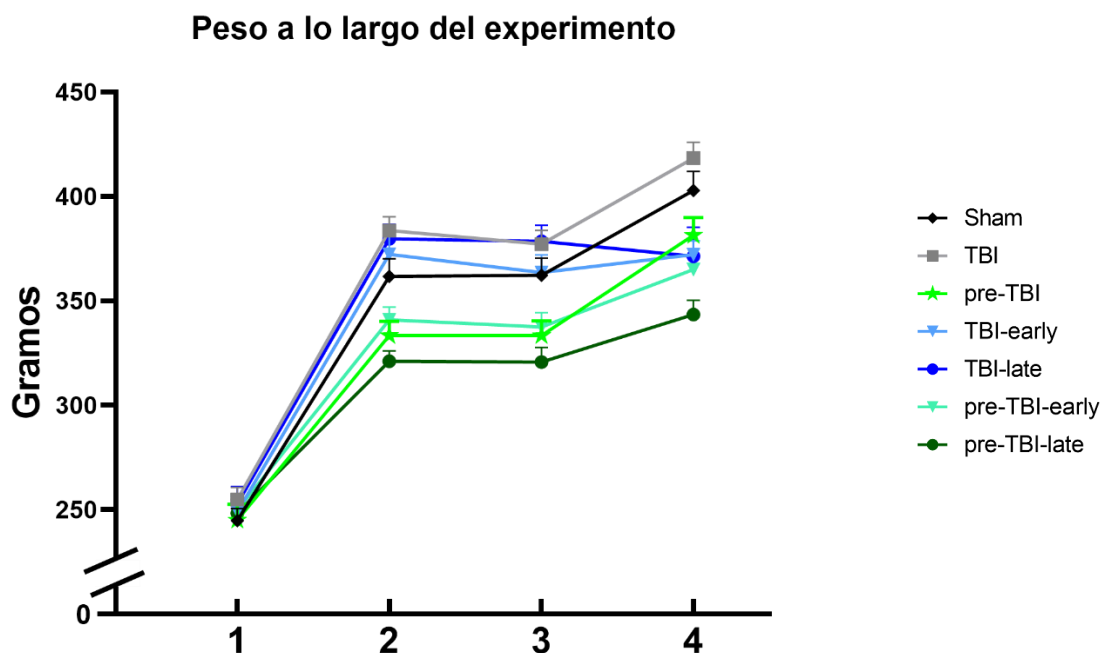


Figura 25. Medias + SEM del peso (1) al inicio del experimento, (2) el día de la intervención quirúrgica, (3) el día después de la operación y (4) el primer día de la prueba de MRO. (Sham, $n=11$; TBI, $n=12$; Pre-TBI, $n=12$; TBI-early, $n=11$; TBI-late, $n=9$; Pre-TBI-early, $n=10$; Pre-TBI-late, $n=10$).

7.2 Evolución del Ejercicio Físico: Distancia y Tiempo

Se registró diariamente la distancia recorrida y el tiempo de ejercicio en la rueda de actividad de cada sujeto que realizaba ejercicio físico.

El análisis del ejercicio físico se realizó en 3 períodos de 4 días cada uno: los 4 últimos días de ejercicio antes de la lesión traumática, los 4 primeros días de ejercicio después de la operación y los 4 días correspondientes a la prueba de MRO. Teniendo en cuenta los diferentes protocolos del tratamiento, esta división en 3 períodos nos permitía analizar los niveles de ejercicio en momentos clave como son el momento previo y posterior a la lesión y durante las pruebas de memoria. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que no todos los grupos realizaban ejercicio físico durante los mismos períodos. En el período previo a la lesión solamente realizaban ejercicio los grupos Pre-TBI, Pre-TBI-early y Pre-TBI-late.

El segundo período corresponde a los 4 primeros días de ejercicio postlesión, por tanto, en los grupos Pre-TBI-early y TBI-early este período corresponde a los días 2 a 5 postlesión, mientras que en los grupos Pre-TBI-late y TBI-late corresponde a los días 6 a 9 post lesión. Finalmente, en el tercer período analizado, es decir, durante los 4 días de las pruebas conductuales, los sujetos de los grupos TBI-early y Pre-TBI-early llevaban 11 días postlesión con acceso a la rueda de actividad antes del inicio de la MRO, mientras que los de los grupos TBI-late y Pre-TBI-late solamente 6 días.

Un ANOVA del primer período no indicó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que realizaban ejercicio previo a la lesión traumática (Pre-TBI, Pre-TBI-early, Pre-TBI-late) ni en la media de los metros diarios recorridos, ni en la media de tiempo que los animales pasaban haciendo ejercicio en la rueda (Figura 26).

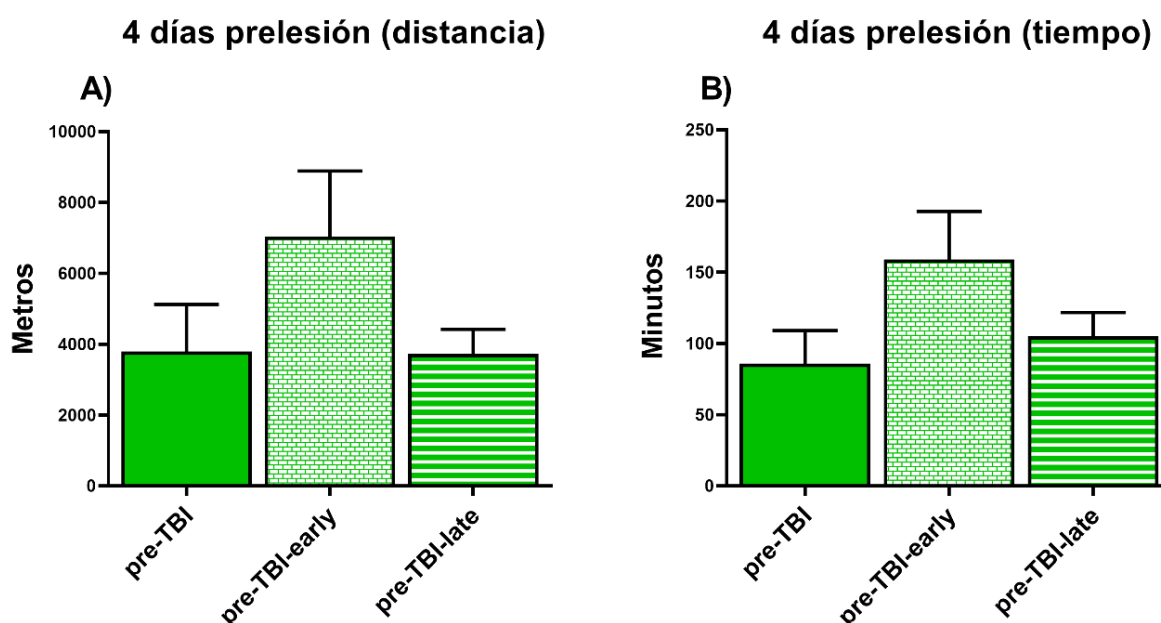


Figura 26. Medias +SEM de los 4 últimos días de ejercicio previo al TBI A) de la distancia diaria recorrida en la rueda de actividad y B) del tiempo de ejercicio realizado en la rueda de actividad. (Pre-TBI, n=12; Pre-TBI-early, n=10; Pre-TBI-late, n=10).

Un ANOVA de Welch indicó diferencias estadísticamente significativas entre grupos en la media de metros recorridos [$F_{(3,17.76)} = 10.57$; $p < 0.001$] y en la media de tiempo que los animales pasaban haciendo ejercicio en la rueda [$F_{(3,18.08)} = 11.37$; $p < 0.001$] durante el segundo período (Figura 27). Las comparaciones *post hoc* de Games-Howell indicaron que la media de la distancia recorrida era significativamente mayor en los grupos Pre-TBI-early y Pre-TBI-late en comparación con los grupos TBI-early ($p = 0.031$ y $p = 0.003$, respectivamente) y TBI-late ($p = 0.036$ y $p = 0.006$, respectivamente).

En relación al tiempo que pasaban en la rueda de actividad, los grupos Pre-TBI-early y Pre-TBI-late pasaban una media de tiempo significativamente mayor que los grupos TBI-early ($p=0.015$ y $p=0.003$, respectivamente) y TBI-late ($p=0.011$ y $p=0.009$, respectivamente). Por tanto, los resultados muestran que aquellos sujetos que habían realizado ejercicio antes del TBI, recorrían una mayor distancia y pasaban más tiempo realizando ejercicio que aquellos animales que empezaron el tratamiento después del TBI.

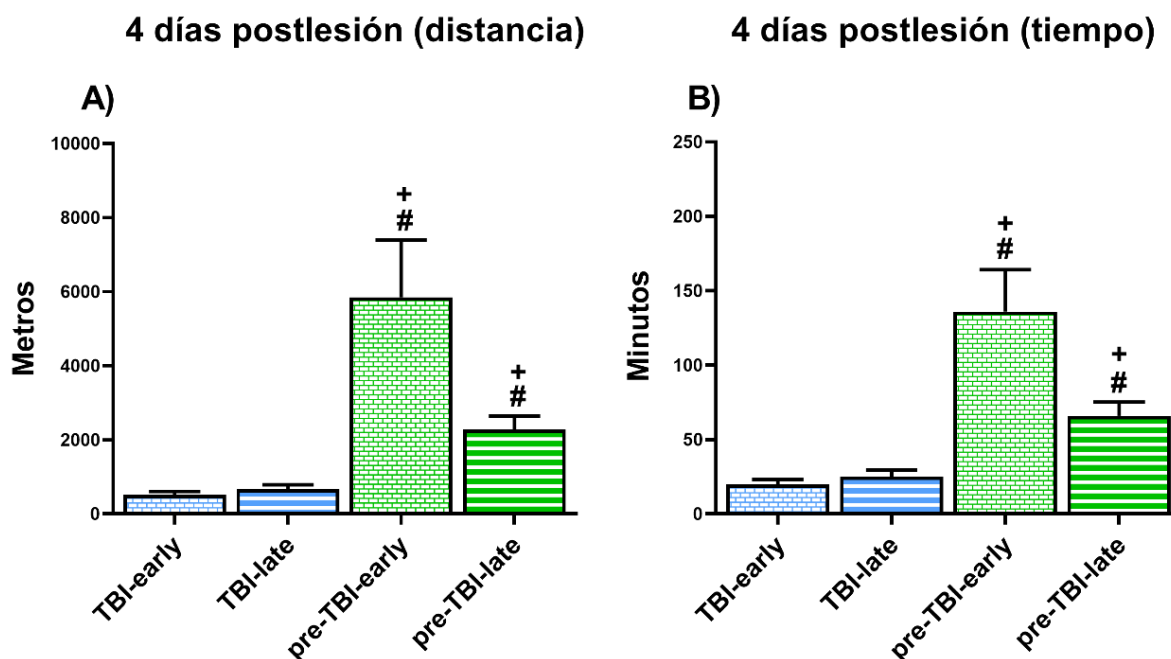


Figura 27. Medias +SEM en los 4 primeros días de ejercicio posterior al TBI A) de la distancia diaria recorrida en la rueda de actividad, y B) del tiempo diario de ejercicio realizado en la rueda de actividad. ANOVA: #Diferencias respecto al grupo TBI-early ($p<0.05$); +Diferencias respecto al grupo TBI-late ($p<0.05$). (TBI-early, $n=11$; TBI-late, $n=9$; Pre-TBI-early, $n=10$; Pre-TBI-late, $n=10$).

En el tercer período se detectaron dos sujetos con valores outliers en el grupo TBI-early para la distancia recorrida y uno en el grupo TBI-early para el tiempo de ejercicio. Estos sujetos fueron eliminados de los análisis correspondientes.

El ANOVA de Welch indicó diferencias estadísticamente significativas entre grupos en la media de los metros diarios recorridos [$F_{(3,17.11)}= 4.95$; $p=0.012$] y en la media del tiempo que los animales pasaban haciendo ejercicio en la rueda [$F_{(3,17.23)}= 4.94$; $p=0.012$] (Figura 28). Las comparaciones *post hoc* de Games Howell indicaron que el grupo Pre-TBI-early, que es el grupo con un período más largo de ejercicio, presentaba una media de la distancia recorrida significativamente mayor a los grupos TBI-early ($p=0.027$) y TBI-late ($p=0.021$).

En relación al tiempo en la rueda de actividad, el grupo Pre-TBI-early pasaba una media de tiempo significativamente mayor que el grupo TBI-late ($p=0.021$). Por tanto, los resultados indican que durante las pruebas de MRO los sujetos del grupo Pre-TBI-early mostraron una

mayor distancia recorrida en comparación con los grupos que empezaban el ejercicio físico después de la lesión, TBI-early y TBI-late. Además, también pasaban un mayor tiempo en la rueda de actividad que el grupo TBI-late.

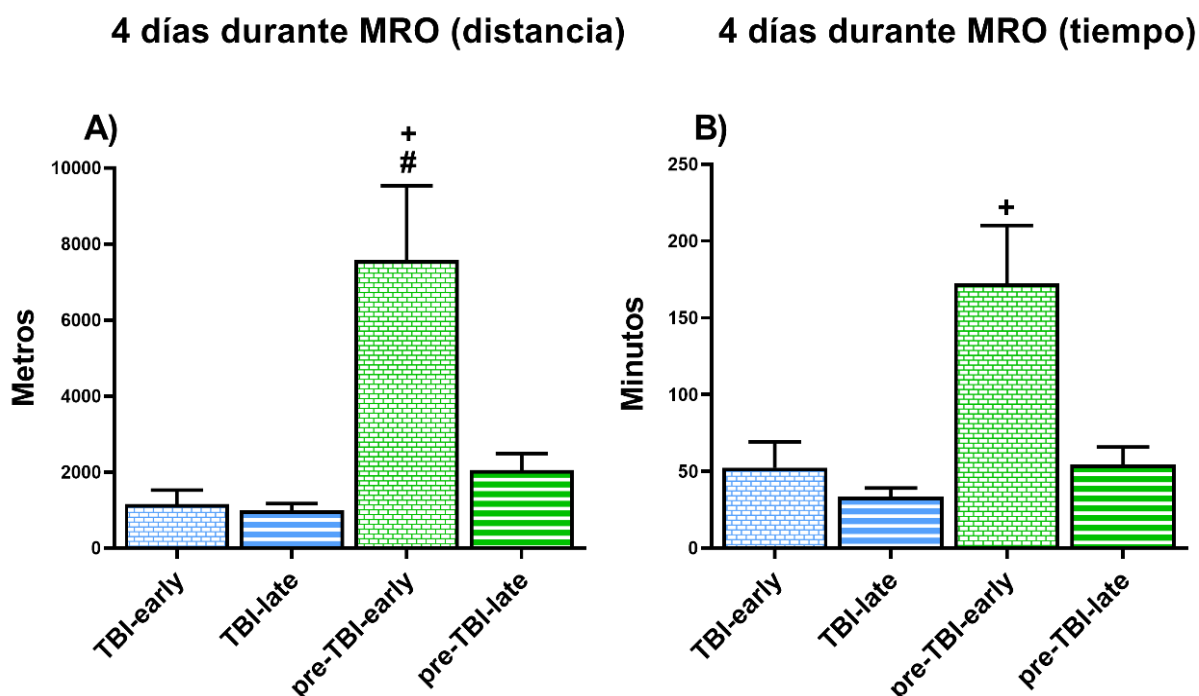


Figura 28. Medias + SEM en los 4 días de la MRO A) de la distancia diaria recorrida en la rueda de actividad, B) del tiempo diario de ejercicio realizado en la rueda de actividad. ANOVA: #Diferencias respecto al grupo TBI-early ($p < 0.05$); +Diferencias respecto al grupo TBI-late ($p < 0.05$). (TBI-early, $n=11$; TBI-late, $n=9$; Pre-TBI-early, $n=10$; Pre-TBI-late, $n=10$).

7.3 Memoria de Reconocimiento de Objetos

Se eliminaron de los análisis de la MRO tres animales (un sujeto del grupo TBI y dos sujetos del grupo Pre-TBI-early), debido al desplazamiento de alguno de los objetos utilizados en las sesiones de MRO. Por tanto, la muestra constaba de 72 animales (Sham: $n= 11$, TBI: $n= 11$, Pre-TBI: $n= 12$, TBI-early: $n= 11$, TBI-late: $n= 9$, Pre-TBI-early: $n= 8$, Pre-TBI-late: $n= 10$).

7.3.1 *Habitación*

El ANOVA de medidas repetidas mostró que todos los grupos siguieron una evolución similar a lo largo de las tres sesiones de habitación. En concreto, se observó una disminución en la distancia recorrida entre la primera y la segunda [$t_{(65)}=7.9$; $p < 0.001$] y tercera [$t_{(65)}=6.04$; $p < 0.001$] sesiones de habitación, pero no entre la segunda y la tercera sesiones (Figura 29).

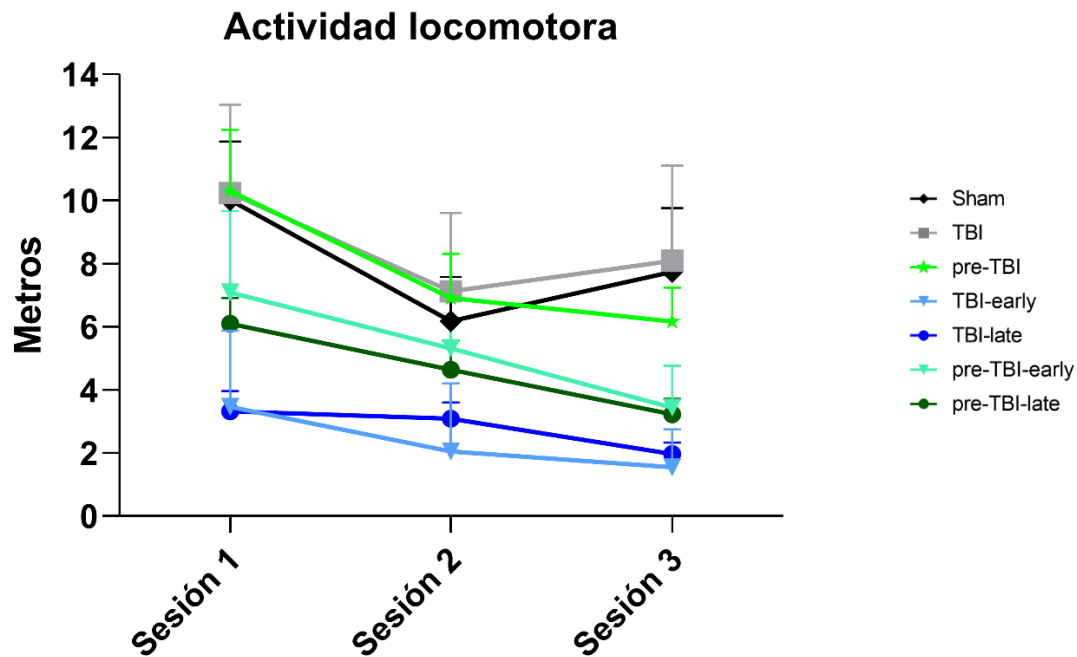


Figura 29. Media +SEM de la actividad locomotora en cada una de las sesiones de habituación para cada grupo experimental. (Sham, n=11; TBI, n=11; Pre-TBI, n=12; TBI-early, n=11; TBI-late, n=9; Pre-TBI-early, n=8; Pre-TBI-late, n=10).

7.3.2 Neofobia

Se detectaron 4 sujetos outliers (uno del grupo Sham, otro del TBI, otro del TBI-late y uno del Pre-TBI-early) en la variable latencia de exploración, y 2 (del grupo TBI) en la variable tiempo de exploración. Estos sujetos fueron eliminados de los análisis correspondientes.

La figura 30 muestra la latencia de la primera exploración y el tiempo total de exploración del objeto en la prueba de neofobia.

Los ANOVA no mostraron diferencias significativas en la latencia de exploración, pero sí en el tiempo total de exploración [$F_{(6,63)} = 5.239$; $p < 0.001$]. Las pruebas *post hoc* de Tukey indicaron que el grupo TBI-early mostraba un tiempo total de exploración significativamente menor que los grupos Sham ($p = 0.003$) y Pre-TBI ($p = 0.004$). Además, el grupo Pre-TBI-early también mostró un valor menor que el grupo Pre-TBI ($p = 0.048$). Por tanto, los resultados parecen indicar que los grupos TBI-early y Pre-TBI-early mostraron un tiempo de exploración total en el test de neofobia inferior al grupo Pre-TBI, y en el caso del grupo TBI-early también fue inferior al del grupo Sham.

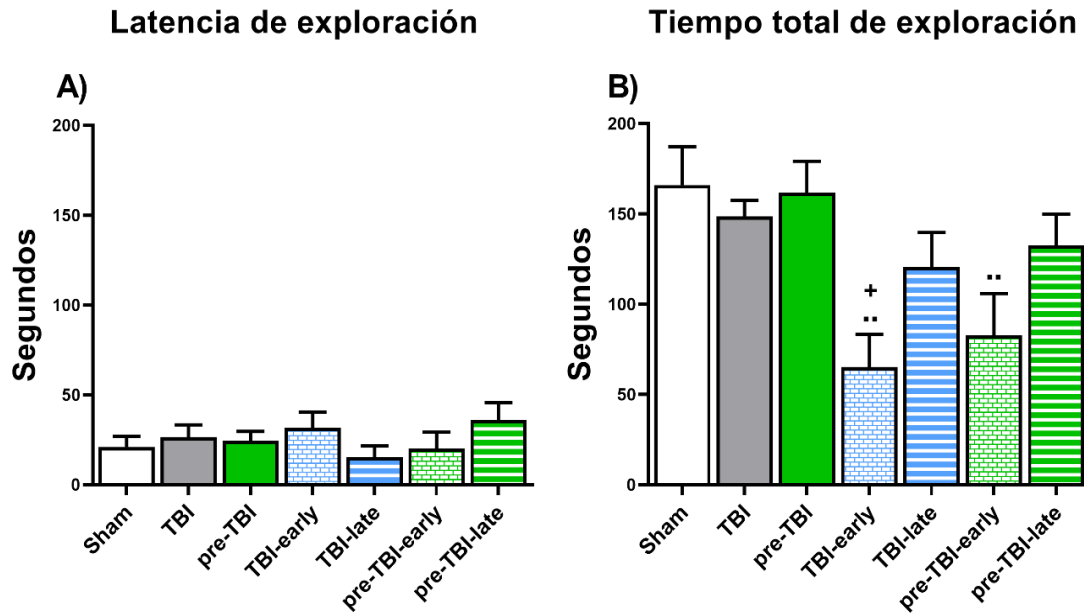


Figura 30. Medias +SEM. A) Latencia de exploración (Sham, n=10; TBI, n=10; Pre-TBI, n=12; TBI-early, n=11; TBI-late, n=8; Pre-TBI-early, n=7; Pre-TBI-late, n=10); y B) tiempo de exploración total del objeto en la prueba de neofobia (Sham, n=11; TBI, n=9; Pre-TBI, n=12; TBI-early, n=11; TBI-late, n=9; Pre-TBI-early, n=8; Pre-TBI-late, n=10). ANOVA: +Diferencias respecto al grupo Sham+ ($p<0.05$); **Diferencias respecto al grupo Pre-TBI ($p<0.05$).

7.3.3 Adquisición

En la prueba de adquisición se midió el tiempo total de exploración de los objetos (Figura 31).

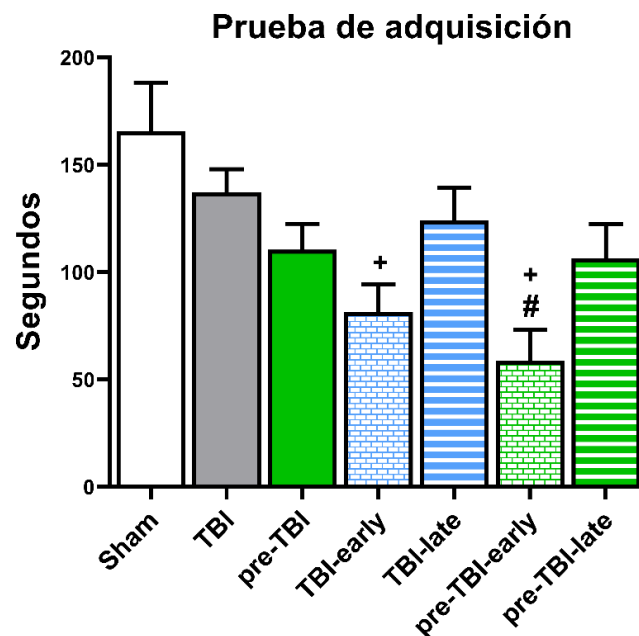


Figura 31. Media +SEM. Tiempo total de exploración en la sesión de adquisición. ANOVA: +Diferencias respecto al grupo Sham ($p<0.05$); #Diferencias respecto al grupo TBI ($p<0.05$). (Sham, n=11; TBI, n=11; Pre-TBI, n=12; TBI-early, n=11; TBI-late, n=9; Pre-TBI-early, n=8; Pre-TBI-late, n=10).

La prueba de ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos [$F_{(6,63)} = 5,044$; $p < 0.001$]. Las pruebas *post hoc* de Tukey indicaron que el tiempo total de exploración fue mayor en el grupo Sham en comparación con los grupos TBI-early ($P = 0.006$) y Pre-TBI-early ($p < 0.001$). Por otro lado, el grupo Pre-TBI-early mostró un tiempo de exploración menor que el grupo TBI ($p = 0.008$). Cabe destacar que, a pesar de estas diferencias, todos los sujetos cumplieron con el criterio de inclusión establecido (tiempo de exploración superior a 10 s).

7.3.4 Sesión de Retención 1

Por un problema técnico en el registro de la RT1 se perdieron los datos de un sujeto del grupo TBI-early. Se detectaron 2 sujetos outliers (uno del grupo Pre-TBI y otro del TBI-early) en el índice de discriminación que fueron eliminados de los análisis correspondientes. Los resultados en relación al índice de discriminación se pueden observar en la figura 32.

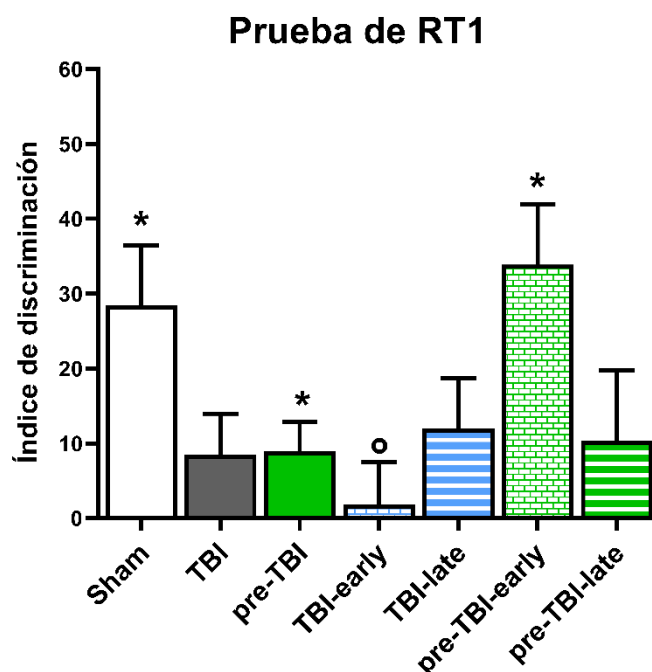


Figura 32. Medias \pm SEM del índice de discriminación en el test de retención 1 (RT1). *Diferencias respecto a 0 en la prueba t de Student para una muestra ($p < 0.05$). ANOVA: *Diferencias respecto a Pre-TBI-early ($p < 0.05$). (Sham, $n = 11$; TBI, $n = 11$; Pre-TBI, $n = 11$; TBI-early, $n = 9$; TBI-late, $n = 9$; Pre-TBI-early, $n = 8$; Pre-TBI-late, $n = 10$).

En primer lugar, realizamos pruebas t de Student de una muestra para determinar el recuerdo del objeto familiar. Estas pruebas indicaron que el índice de discriminación era significativamente superior al valor de referencia en los grupos Sham [$t_{(10)} = 3.525$; $p = 0.005$], Pre-TBI [$t_{(10)} = 2.245$; $p = 0.049$] y Pre-TBI-early [$t_{(7)} = 4.171$; $p = 0.004$]. Pero no, en los grupos TBI, TBI-late, Pre-TBI-late y TBI-early. Por tanto, solo los grupos Sham, Pre-TBI y Pre-TBI-early fueron los únicos que recordaron el objeto familiar en la primera retención. En cuanto a las diferencias entre grupos, un ANOVA mostró diferencias significativas en el índice de

discriminación [$F_{(6,63)} = 2.681$; $p = 0.022$]. Los análisis *post hoc* de Tukey indicaron que ningún grupo fue significativamente diferente de los grupos Sham y TBI. En cambio, el grupo Pre-TBI-early tenía un índice de discriminación estadísticamente superior al TBI-early ($p = 0.045$). En cuanto al tiempo total de exploración, no se detectaron diferencias significativas entre grupos.

Por tanto, los resultados muestran que nuestro modelo de TBI genera déficits de memoria a las 3 h de la adquisición, que no se observan en el grupo con ejercicio previo y posterior a la lesión de inicio temprano. Además, el tratamiento con solo ejercicio previo tuvo un ligero efecto facilitador.

7.3.5 Sesión de Retención 2

Se detectaron 4 sujetos outliers (2 del grupo Sham, 1 del Pre-TBI y 1 del grupo TBI-late) en el índice de discriminación. Estos sujetos fueron eliminados de los análisis correspondientes. Los resultados en relación al índice de discriminación se pueden observar en la figura 33.

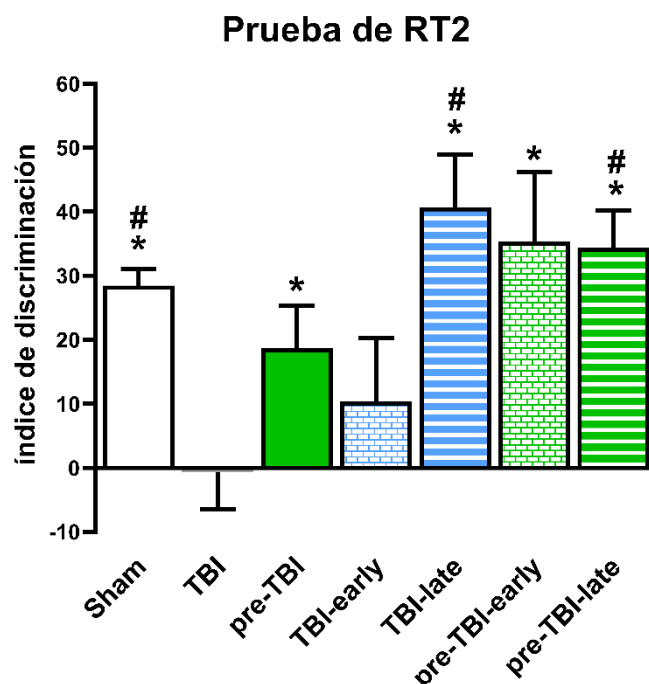


Figura 33. Media +SEM del índice de discriminación en el test de retención 2 (RT2). *Diferencias respecto a 0 en la prueba t de Student para una muestra: ($p < 0.05$). ANOVA: #Diferencias respecto a TBI ($p < 0.05$). (Sham, $n = 9$; TBI, $n = 11$; Pre-TBI, $n = 11$; TBI-early, $n = 11$; TBI-late, $n = 8$; Pre-TBI-early, $n = 8$; Pre-TBI-late, $n = 10$).

Las pruebas t de Student para una muestra indicaron que el índice de discriminación era significativamente superior al valor de referencia en los grupos Sham [$t_{(8)} = 10.954$; $p < 0.001$], Pre-TBI [$t_{(10)} = 2.85$; $p = 0.017$], Pre-TBI-early [$t_{(8)} = 10.954$; $p = 0.017$], TBI-late [$t_{(7)} = 4.958$; $p = 0.002$] y Pre-TBI-late [$t_{(7)} = 3.285$; $p = 0.013$]. Pero, no en el resto de grupos. En cuanto a las

diferencias entre grupos, el ANOVA de Welch indicó diferencias estadísticamente significativas en el índice de discriminación [$F_{(6,25.51)} = 4.64$; $p=0.003$]. Las pruebas *post hoc* de Games-Howell indicaron que el índice de discriminación del grupo TBI fue significativamente inferior al del grupo Sham ($p=0.007$) y también al de los grupos TBI-late ($p=0.015$) y Pre-TBI-late ($p=0.006$). El análisis del tiempo total de exploración no mostró diferencias entre grupos.

Estos resultados ponen de manifiesto que el TBI deteriora la memoria de reconocimiento de objetos a las 24 h de la sesión de adquisición. El ejercicio previo a la lesión por sí solo tuvo un ligero efecto beneficioso. El ejercicio físico de inicio demorado, con o sin ejercicio previo (TBI-late y Pre-TBI-late) revirtió los déficits de memoria. El ejercicio post lesión de inicio temprano no tuvo efecto cuando se realizó como tratamiento único, pero su combinación con ejercicio previo al traumatismo tuvo un efecto beneficioso, aunque inferior al de los tratamientos demorados.

7.4 Datos Histológicos

7.4.1 Evaluación Macroscópica de la Lesión

Se cuantificó el volumen del hipocampo de 68 animales. Se detectaron 4 sujetos outliers (1 del grupo Sham, 1 del Pre-TBI, 1 del TBI-late y 1 del Pre-TBI-early). Estos sujetos fueron eliminados de los análisis correspondientes.

Las pruebas t de Student para una muestra indicaron que el volumen del hipocampo dorsal ipsilateral era significativamente menor al del contralateral en los grupos TBI [$t_{(11)} = -6.63$; $p<0.001$], Pre-TBI [$t_{(10)} = -5.38$; $p<0.001$], TBI-early [$t_{(10)} = -4.68$; $p<0.001$], TBI-late [$t_{(7)} = -3.00$; $p=0.020$], Pre-TBI-early [$t_{(8)} = -7.71$; $p<0.001$], Pre-TBI-late [$t_{(8)} = -5.25$; $p<0.001$]. En cambio, en el grupo Sham la ratio interhemisférica no difería del valor de referencia (Figura 34). Un ANOVA de Welch indicó que el factor grupo era estadísticamente significativo [$F_{(6,25.41)} = 26.53$; $p<0.001$]. Las pruebas *post hoc* de Games-Howell mostraron que todos los grupos, con la excepción del grupo TBI-Late, diferían significativamente del grupo Sham (TBI $p<0.001$, Pre-TBI $p=0.002$, TBI-early $p=0.008$, Pre-TBI-early $p<0.001$, Pre-TBI-late $p=0.005$, respectivamente). Además, la ratio interhemisférica del grupo TBI-late fue significativamente superior a la de los grupos TBI ($p=0.004$), TBI-early ($p=0.032$) y Pre-TBI-early ($p=0.002$).

Por tanto, los datos indican que el TBI produce una pérdida del volumen hipocampal que no es revertida por ningún tratamiento, aunque el ejercicio post lesión de inicio demorado sin ejercicio previo sí consiguió reducir esta pérdida del volumen del hipocampo.

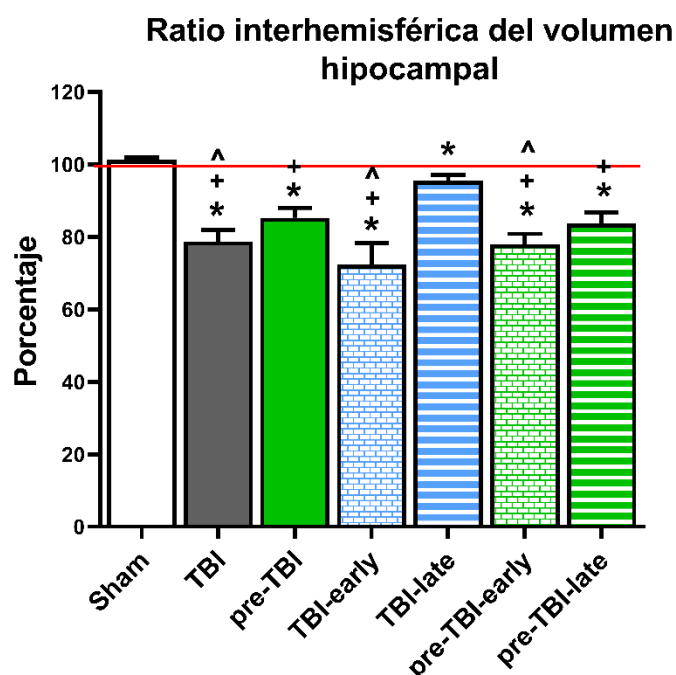


Figura 34. Media +SEM de la ratio interhemisférica de la formación hipocampal. *Diferencias respecto a 100 en la prueba t de Student para una muestra ($p < 0.05$). ANOVA: +Diferencias respecto a Sham +($p < 0.05$); ^Diferencias respecto al grupo TBI-late($p < 0.05$). (Sham, $n=10$; TBI, $n=11$; Pre-TBI, $n=11$; TBI-early, $n=11$; TBI-late, $n=8$; Pre-TBI-early, $n=7$; Pre-TBI-late, $n=10$).

7.4.2 Densidad Neuronal

7.4.2.1 Células NeuN⁺ en la PRhc

Se cuantificó el número de células NeuN⁺ en la PRhc de 48 animales. Se detectaron 2 sujetos outliers (1 del grupo Sham y 1 del grupo TBI) que fueron eliminados de los análisis correspondientes. En la figura 35, se pueden observar imágenes representativas de células con marcaje NeuN⁺ en la PRhc de ambos hemisferios y de cada grupo experimental.

Las pruebas t de Student para una muestra indicaron que la ratio interhemisférica de células NeuN⁺ en la PRhc era significativamente inferior al valor de referencia (100) en los grupos TBI [$t_{(6)} = -13.09$; $p < 0.001$], Pre-TBI [$t_{(5)} = -5.07$; $p = 0.004$], TBI-early [$t_{(6)} = -5.03$; $p = 0.002$] y Pre-TBI-early [$t_{(6)} = -4.95$; $p = 0.003$], mientras que no difería de este valor en los grupos: Sham, TBI-late y Pre-TBI-late.

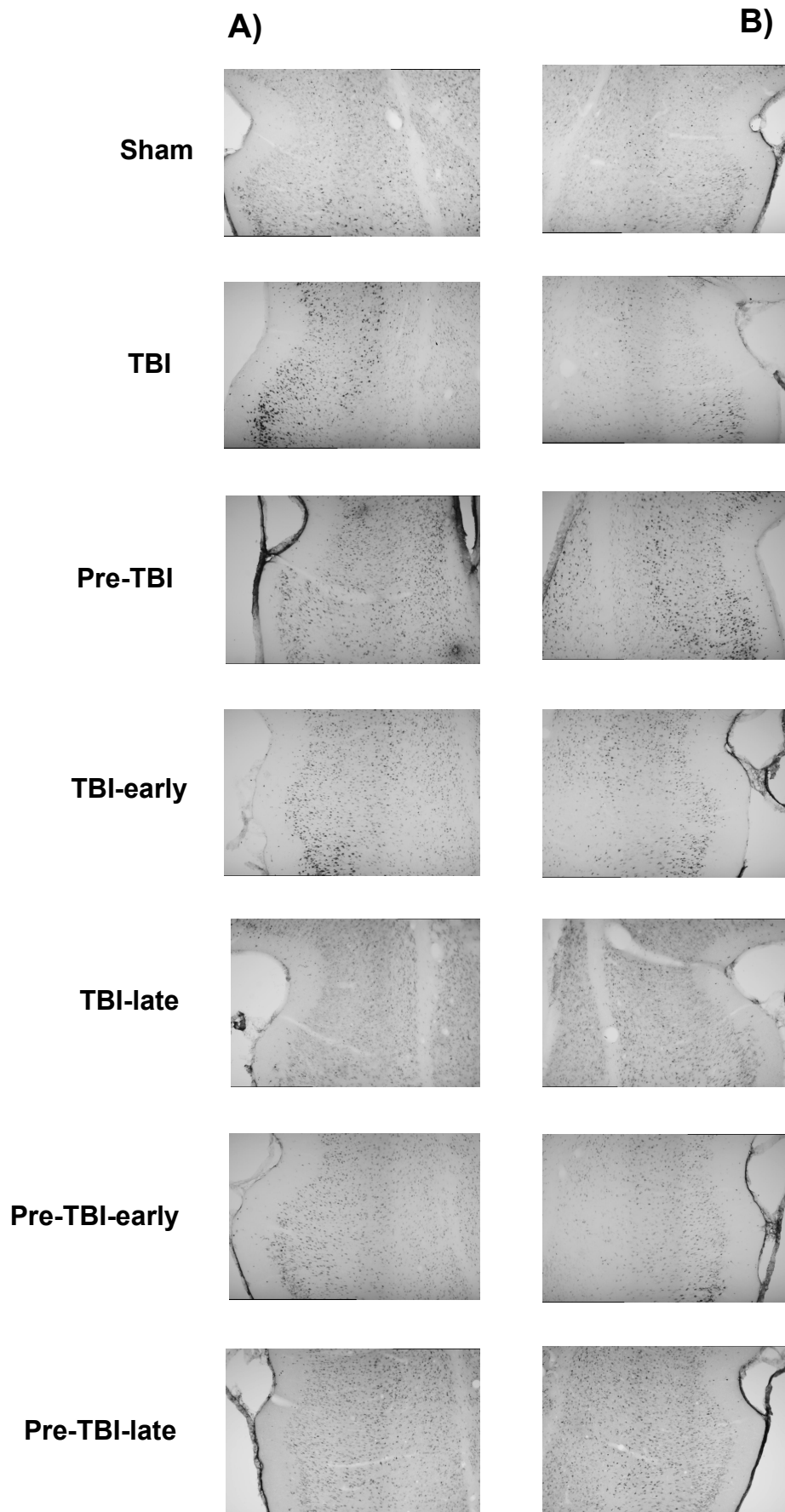


Figura 35. Imágenes representativas del córtex PRhc con células NeuN⁺. A) hemisferio contralateral a la lesión B) hemisferio ipsilateral a la lesión, para cada uno de los grupos experimentales.

Un ANOVA de Welch indicó diferencias entre grupos [$F_{(6,16.30)} = 34.37$; $p < 0.001$]. Las pruebas *post hoc* de Games-Howell mostraron que la ratio interhemisférica de densidad de células NeuN⁺ en la PRhc del grupo Sham era significativamente superior a la de los grupos TBI ($p < 0.001$), Pre-TBI ($p = 0.019$), TBI-early ($p = 0.013$) y Pre-TBI-early ($p = 0.017$). Por el contrario, los grupos con tratamiento post lesión de inicio demorado, no difirieron del grupo Sham. Además, la ratio interhemisférica del grupo TBI-late fue superior a la de los grupos TBI ($p < 0.001$), Pre-TBI ($p = 0.009$), TBI-early ($p = 0.006$) y Pre-TBI-early ($p = 0.011$) (Figura 36).

Por tanto, los resultados indican que nuestro modelo de TBI genera una pérdida neuronal en la PRhc ipsilateral a la lesión. Los tratamientos de ejercicio previo a la lesión y postlesión de inicio temprano, con o sin entrenamiento previo, no tuvieron efectos beneficiosos. Los tratamientos con pautas de ejercicio demorado tuvieron un efecto beneficioso, aunque más marcado cuando los sujetos no tenían entrenamiento previo.

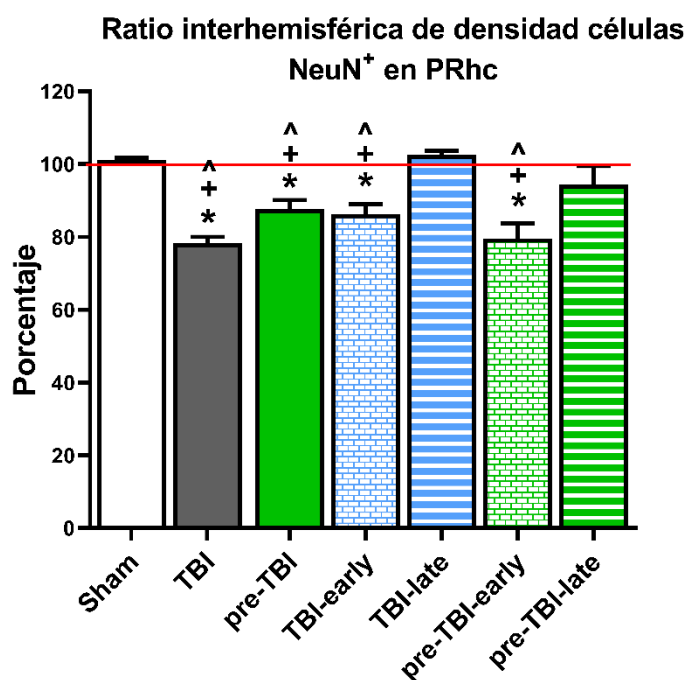


Figura 36. Media ±SEM de la ratio interhemisférica de la densidad de células NeuN⁺ en la PRhc. *Diferencias respecto a 100 en la prueba t de Student para una muestra: * ($p < 0.05$). ANOVA: +Diferencias respecto a Sham ($p < 0.05$); ^Diferencias respecto al grupo TBI-late ($p < 0.05$). (Sham, $n = 6$; TBI, $n = 7$; Pre-TBI, $n = 6$; TBI-early, $n = 7$; TBI-late, $n = 6$; Pre-TBI-early, $n = 7$; Pre-TBI-late, $n = 7$).

7.4.2.2 Células NeuN⁺ en el Hilus del GD del Hipocampo

Se cuantificó el número de células NeuN⁺ en el hilus de 51 animales. Se detectó 1 sujeto outlier del grupo Sham, que fue eliminado de los análisis correspondientes. En la figura 37 podemos observar, para cada grupo experimental, imágenes representativas del hilus del GD de ambos hemisferios con marcaje NeuN.

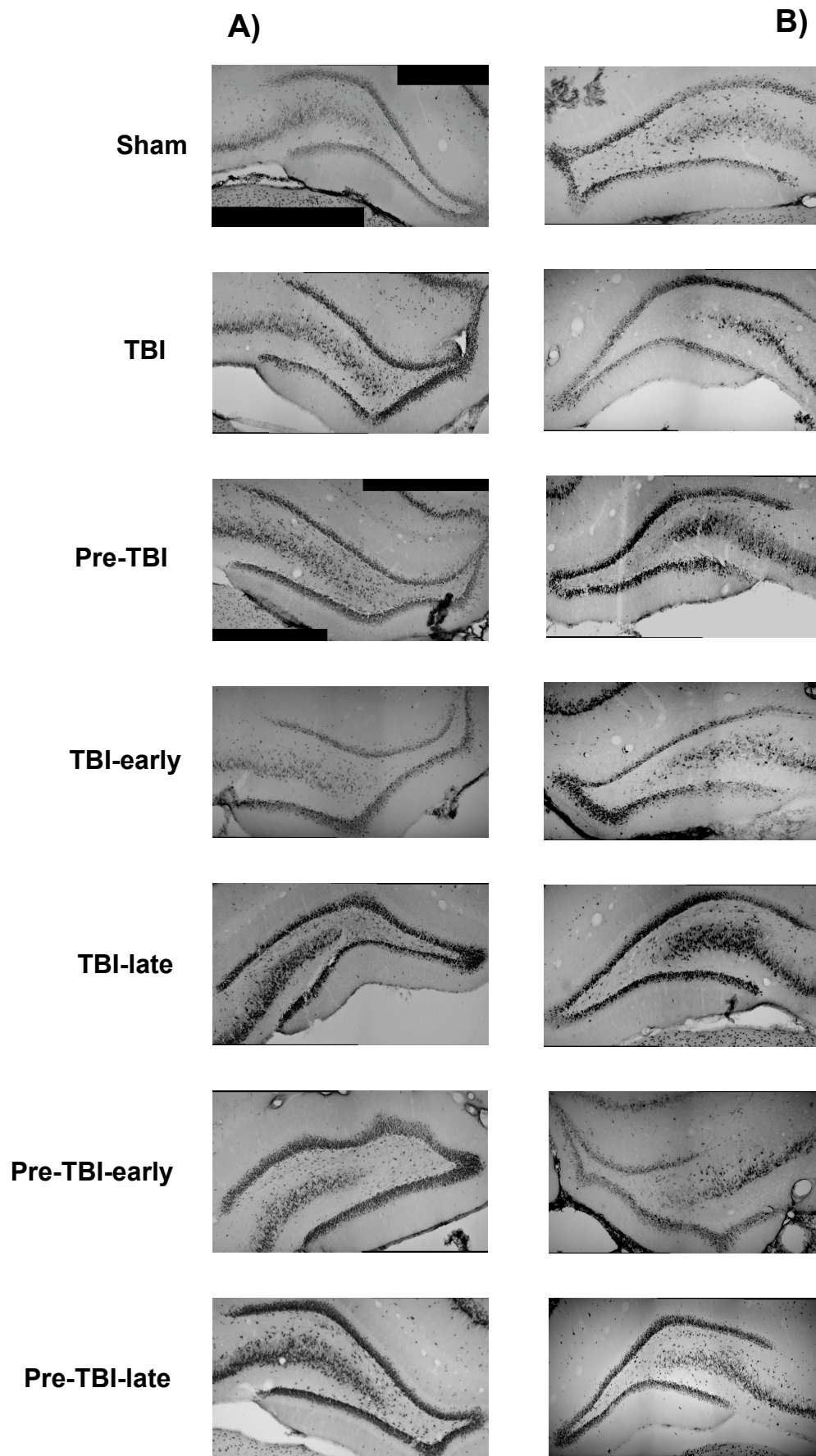


Figura 37. Imágenes representativas del hilus del GD con células NeuN⁺ A) en el hemisferio contralateral a la lesión y B) en el hemisferio ipsilateral a la lesión, para cada uno de los grupos experimentales.

Las pruebas t de Student para una muestra indicaron que la ratio interhemisférica de células NeuN⁺ en el hilus era significativamente inferior al valor de referencia en los grupos TBI [$t_{(8)} = -5.083$; $p < 0.001$], Pre-TBI [$t_{(8)} = -3.240$; $p = 0.012$], TBI-early [$t_{(5)} = -19.487$; $p < 0.001$], Pre-TBI-early [$t_{(6)} = -18.40$; $p < 0.001$] y Pre-TBI-late [$t_{(5)} = -3.340$; $p = 0.021$], mientras que no diferían de este valor ni en el grupo Sham, ni en el grupo TBI-late. Un ANOVA de Welch indicó que el factor grupo era estadísticamente significativo [$F_{(6,17.84)} = 65.84$; $p < 0.001$]. Las pruebas *post hoc* de Games-Howell mostraron que los grupos TBI ($p = 0.006$), TBI-early ($p < 0.001$) y Pre-TBI-early ($p < 0.001$) diferían significativamente del grupo Sham. Además, la ratio interhemisférica de la densidad de células NeuN⁺ en el hilus del grupo TBI-late era significativamente superior a la de los grupos TBI-early ($p = 0.013$) y Pre-TBI-early ($p = 0.004$). Finalmente, el grupo Pre-TBI mostró una ratio interhemisférica superior al grupo Pre-TBI-early ($p = 0.012$) (Figura 38).

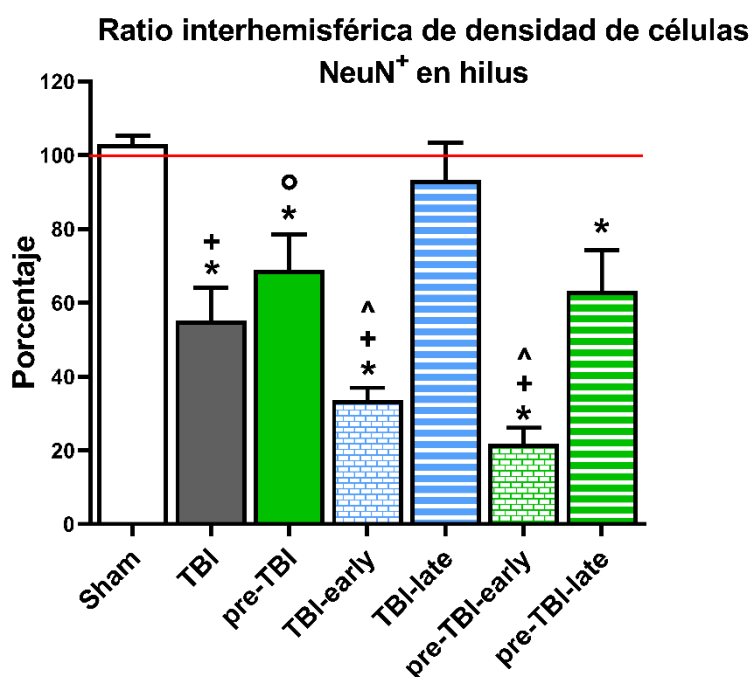


Figura 38. Media ±SEM de la ratio interhemisférica de la densidad de células NeuN⁺ en el hilus del hipocampo dorsal. *Diferencias respecto a 100 en la prueba t de Student para una muestra ($p < 0.05$). ANOVA: +Diferencias respecto a Sham ($p < 0.05$); ^Diferencias respecto al grupo TBI-late ($p < 0.05$). °Diferencias respecto a Pre-TBI-early ($p < 0.05$). (Sham, $n = 7$; TBI, $n = 9$; Pre-TBI, $n = 9$; TBI-early, $n = 6$; TBI-late, $n = 6$; Pre-TBI-early, $n = 7$; Pre-TBI-late, $n = 6$).

Por tanto, los resultados indican que el TBI genera una pérdida de neuronas maduras en el hilus del GD del hipocampo ipsilateral que también se observa en los grupos que realizaron ejercicio postlesión de inicio temprano, tanto con entrenamiento previo al traumatismo como sin. El grupo de ejercicio previo mostró un ligero efecto beneficioso. El ejercicio postlesión demorado revirtió esta pérdida neuronal, sólo cuando se realizó sin entrenamiento previo, ya que la combinación de estos tratamientos resultó en un beneficio intermedio.

7.4.3 Activación Microglial

7.4.3.1 Iba-1 en Hipocampo Dorsal

En la figura 39 se pueden observar imágenes representativas del marcaje con Iba-1 en esta estructura en ambos hemisferios en todos los grupos.

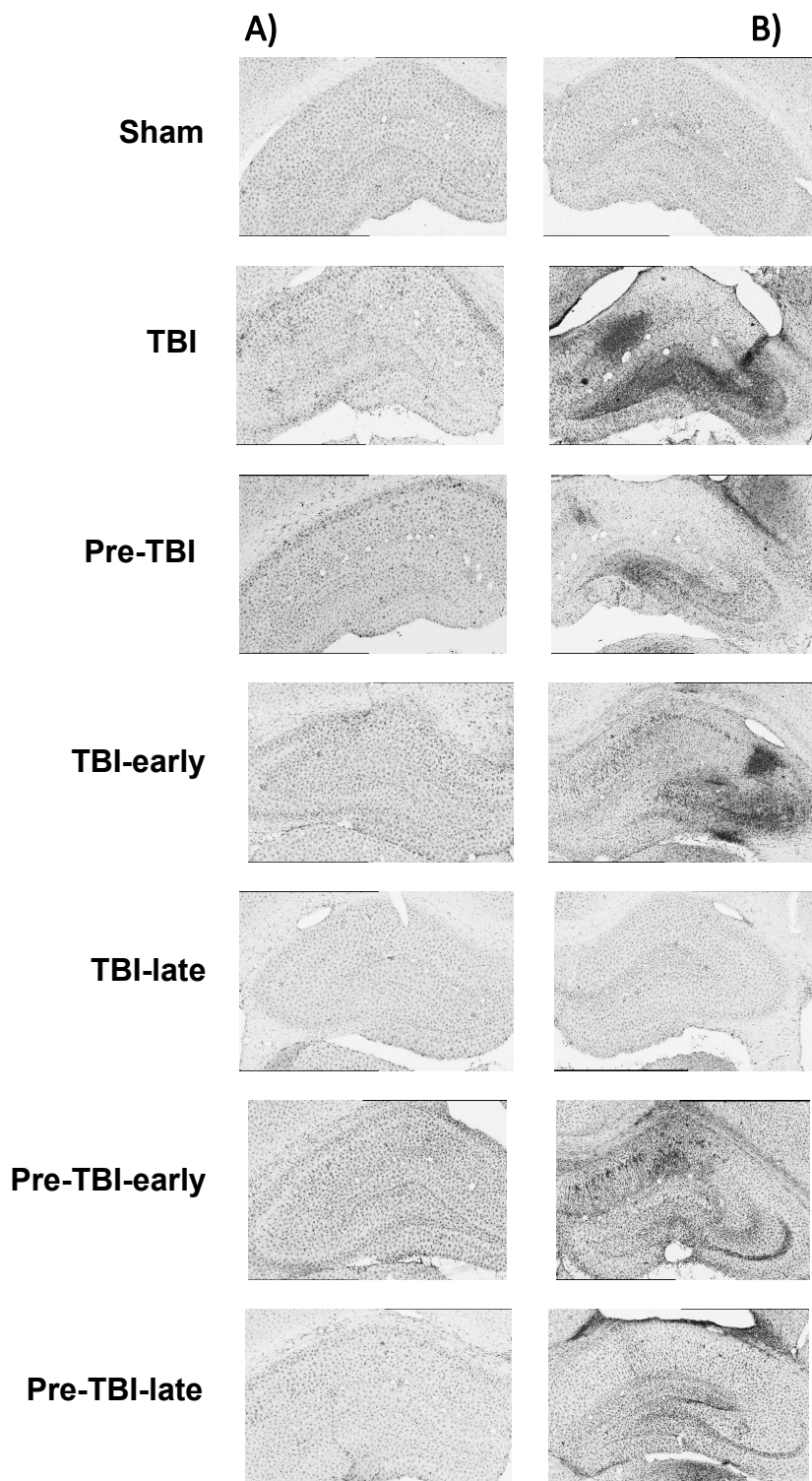


Figura 39. Imágenes representativas del hipocampo dorsal con células Iba-1⁺ en A) hemisferio contralateral, B) hemisferio ipsilateral, para cada uno de los grupos experimentales.

Se cuantificó el marcaje con Iba-1 en el hipocampo dorsal en 73 animales. Se detectó 1 sujeto outlier del grupo TBI-late en la variable ratio del porcentaje de área marcada y 1 sujeto outlier del grupo TBI-early en la variable de intensidad media de marcaje, que fueron eliminados de los análisis correspondientes.

Ratio interhemisférica del porcentaje de área con marcaje Iba-1 en el hipocampo dorsal

Las pruebas t de Student para una muestra indicaron que no había diferencias respecto al valor de referencia en los grupos Sham y TBI-late. En cambio, esta variable fue estadísticamente superior al valor de referencia en los grupos TBI [$t_{(11)} = 8.238$; $p < 0.001$], Pre-TBI [$t_{(10)} = 2.417$; $p = 0.036$], TBI-early [$t_{(9)} = 14.630$; $p < 0.001$], Pre-TBI-early [$t_{(9)} = 5.017$; $p = 0.001$], Pre-TBI-late [$t_{(9)} = 3.758$; $p = 0.004$]. Un ANOVA indicó que el factor grupo era estadísticamente significativo [$F_{(6,27.89)} = 40.73$; $p < 0.001$]. Las pruebas *post hoc* de Games-Howell mostraron valores superiores en los grupos TBI, TBI-early y Pre-TBI-early respecto a los grupos Sham ($p < 0.001$, $p < 0.001$ y $p = 0.009$, respectivamente) y TBI-late ($p < 0.001$, $p < 0.001$ y $p = 0.007$, respectivamente). Adicionalmente, el grupo Pre-TBI-late mostró un valor superior al TBI-late ($p = 0.041$) y el grupo TBI-early respecto al Pre-TBI ($p = 0.014$) (Figura 40).

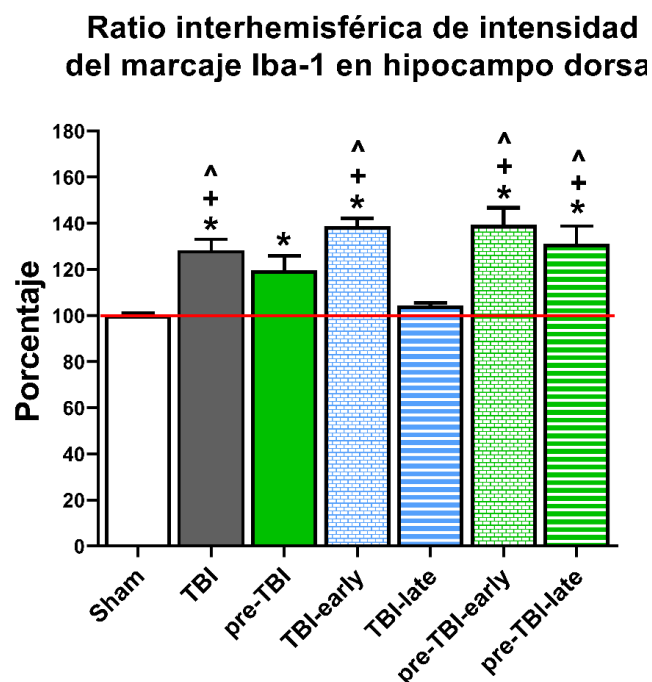


Figura 40. Media ±SEM de la ratio interhemisférica del porcentaje del área ocupada con marcaje Iba-1 en el hipocampo dorsal. *Diferencias respecto a 100 en la prueba t de Student para una muestra ($p < 0.05$). ANOVA: +Diferencias respecto a Sham ($p < 0.05$); ^Diferencias respecto al grupo TBI-late ($p < 0.05$); **Diferencias respecto a Pre-TBI ($p < 0.05$). (Sham, $n = 11$; TBI, $n = 12$; Pre-TBI, $n = 11$; TBI-early, $n = 10$; TBI-late, $n = 8$; Pre-TBI-early, $n = 10$; Pre-TBI-late, $n = 10$).

Ratio interhemisférica de la intensidad media del marcaje con Iba-1 en el hipocampo dorsal

Las pruebas t de Student para una muestra indicaron que la ratio interhemisférica hipocampal de la intensidad media de marcaje con Iba-1 era significativamente mayor al valor de referencia en los grupos: TBI [$t_{(11)}= 5.899$; $p<0.001$], Pre-TBI [$t_{(10)}= 3.243$; $p=0.009$], TBI-early [$t_{(8)}=14.082$; $p<0.001$], Pre-TBI-early [$t_{(9)}=5.325$; $p<0.001$] y Pre-TBI-late [$t_{(9)}=4.090$; $p=0.003$]. En cambio, no difería del valor de referencia en los grupos Sham y TBI-late, indicando valores similares en los dos hemisferios. Un ANOVA de Welch indicó que el factor grupo era estadísticamente significativo [$F_{(6,26,55)}= 37.98$; $p<0.001$]. Las pruebas *post hoc* de Games-Howell mostraron valores superiores en los grupos TBI, TBI-early, Pre-TBI-early y Pre-TBI-late respecto a los grupos Sham ($p=0.001$, $p<0.001$, $p=0.006$ y $p=0.030$, respectivamente) y TBI-late ($p=0.003$, $p<0.001$, $p=0.008$ y $p=0.004$, respectivamente) (Figura 41).

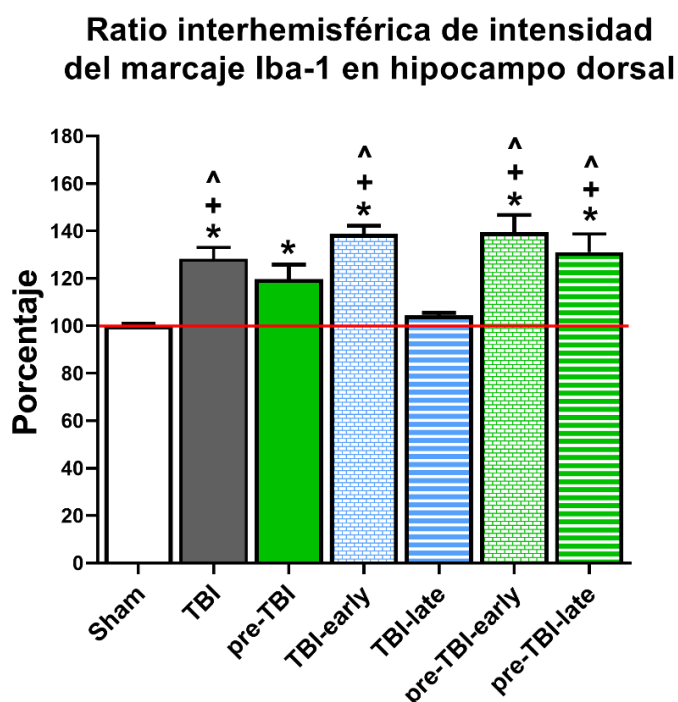


Figura 41. Media ±SEM de la ratio interhemisférica hipocampal de la intensidad media Iba-1 en hipocampo dorsal. *Diferencias respecto a 100 en la prueba t de Student para una muestra ($p<0.05$). ANOVA: +Diferencias respecto a Sham ($p<0.05$); ^Diferencias respecto al grupo TBI-late ($p<0.05$). (Sham, $n=11$; TBI, $n=12$; Pre-TBI, $n=11$; TBI-early, $n=9$; TBI-late, $n=9$; Pre-TBI-early, $n=10$; Pre-TBI-late, $n=10$).

Los resultados indican que el nuestro modelo de TBI aumentó la reactividad microglial en el hipocampo ipsilateral a la lesión en comparación al contralateral. Solo el tratamiento postlesión demorado aislado consiguió revertir este efecto, mientras que el ejercicio previo aislado si bien redujo ligeramente la activación microglial, disminuyó de forma importante el efecto beneficioso del ejercicio de inicio demorado.

7.4.3.2 Iba-1 en Tálamo Dorsal

En la figura 42 se pueden observar imágenes representativas del marcaje con Iba-1 en esta estructura en ambos hemisferios en todos los grupos.

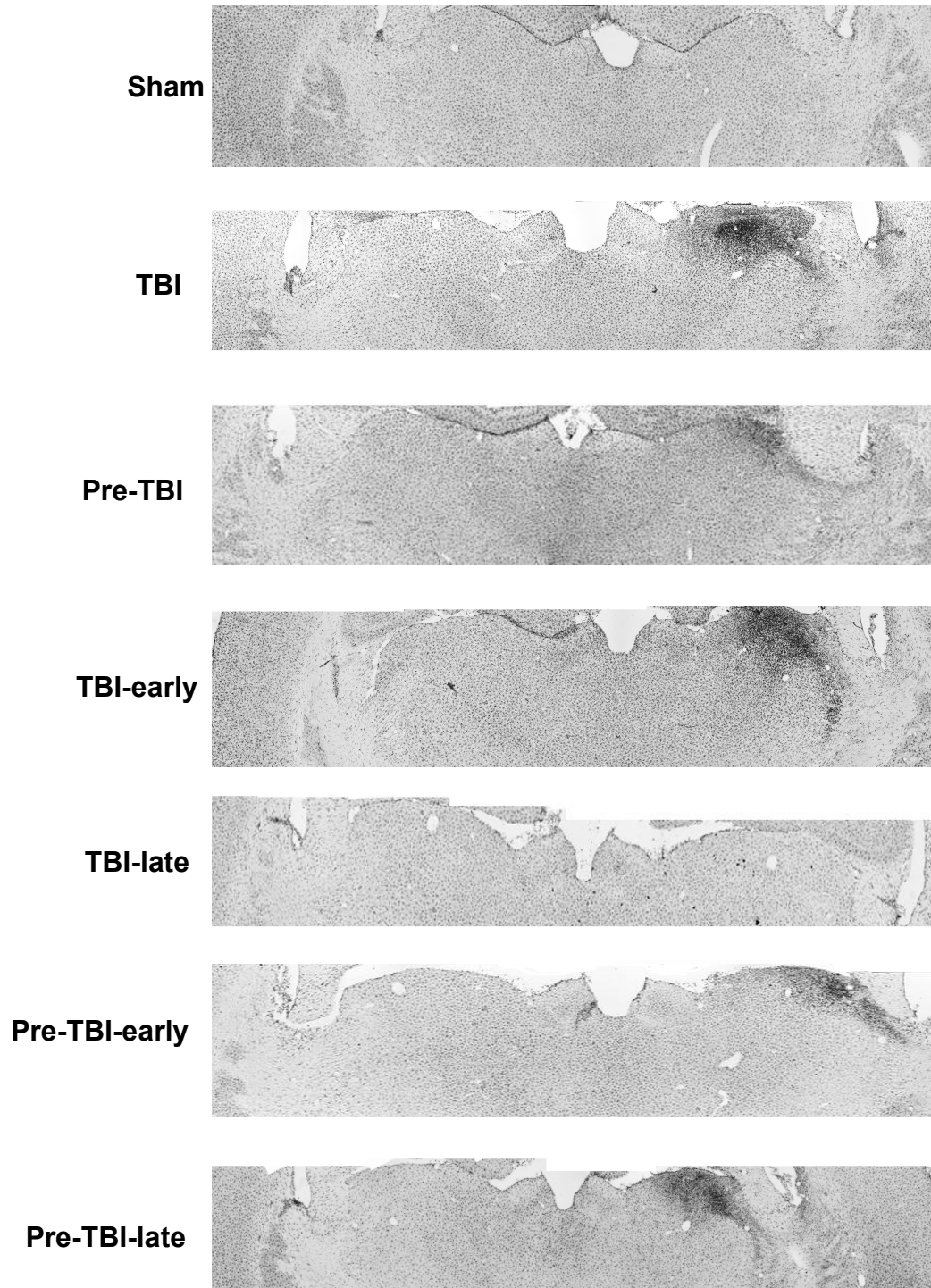


Figura 42. Imágenes representativas del tálamo dorsal con células Iba-1⁺ para cada uno de los grupos experimentales.

Se cuantificó el marcaje con Iba-1 en el tálamo dorsal en 74 animales. Se detectaron 6 sujetos outliers en la variable ratio del porcentaje de área marcada (2 TBI-early, 1 TBI-late, 1 Pre-TBI-early, 2 Pre-TBI-late) y 3 en la variable ratio de la intensidad media de marcaje (1 Sham, 1 TBI-late, 1 Pre-TBI-early) que fueron eliminados de los análisis correspondientes.

Ratio interhemisférica del porcentaje de área ocupada con marcaje Iba-1 en tálamo dorsal

Las pruebas t de Student para una muestra indicaron que la ratio era significativamente diferente del valor de referencia (100) en todos los grupos con lesión: TBI [$t_{(10)}= 10.9$; $p<0.001$], Pre-TBI [$t_{(11)}= 7.370$; $p<0.001$], TBI-early [$t_{(8)}=19.60$; $p<0.001$], TBI-late [$t_{(7)}=3.35$; $p=0.012$], Pre-TBI-early [$t_{(8)}=11.90$; $p<0.001$] y Pre-TBI-late [$t_{(7)}=15.60$; $p<0.001$], mientras que no difería en el grupo Sham (Figura 43).

Ratio interhemisférica del porcentaje de área con marcaje Iba-1 en tálamo dorsal

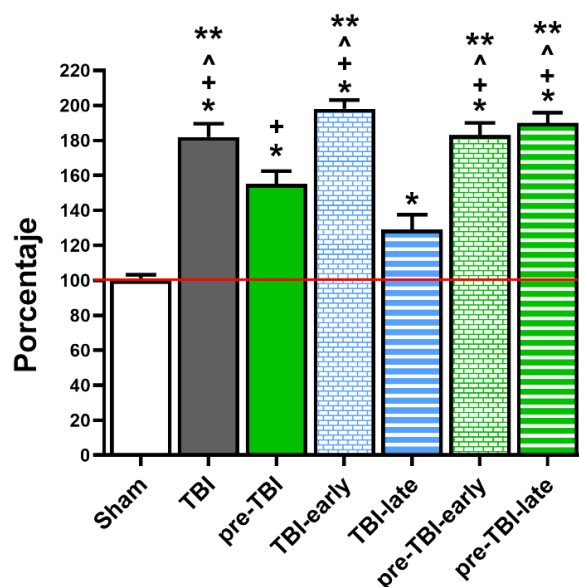


Figura 43. Media +SEM de la ratio interhemisférica del porcentaje del área ocupada por marcaje de Iba-1 en tálamo dorsal. *Diferencias respecto a 100 en la prueba t de Student para una muestra ($p<0.05$). ANOVA: +Diferencias respecto a Sham ($p<0.05$); ^Diferencias respecto al grupo TBI-late ($p<0.05$); **Diferencias respecto a Pre-TBI ($p<0.05$). (Sham, $n=11$; TBI, $n=11$; Pre-TBI, $n=12$; TBI-early, $n=9$; TBI-late, $n=8$; Pre-TBI-early, $n=9$; Pre-TBI-late, $n=8$).

Un ANOVA indicó que el factor grupo era estadísticamente significativo [$F_{(6,61)}= 30.90$; $p<0.001$]. Las pruebas *post hoc* de Tukey mostraron que todos los grupos menos el TBI-late tenían un valor superior al grupo Sham (TBI $p<0.001$, Pre-TBI $p<0.001$, TBI-early $p<0.001$, Pre-TBI-early $p<0.001$ y Pre-TBI-late $p<0.001$, respectivamente). El grupo TBI-late mostró diferencias similares con todos los grupos a excepción del grupo Pre-TBI (TBI $p<0.001$, TBI-early $p<0.001$, Pre-TBI-early $p<0.001$ y Pre-TBI-late $p<0.001$, respectivamente). Finalmente,

el grupo Pre-TBI mostró valores inferiores a los grupos TBI ($p=0.034$), TBI-early ($p<0.001$), Pre-TBI-early ($p=0.035$) y Pre-TBI-late ($p=0.006$).

Ratio interhemisférica de la intensidad media del marcaje con Iba-1 en tálamo dorsal

Las pruebas t de Student para una muestra indicaron una intensidad media de marcaje mayor en el tálamo ipsilateral en comparación al contralateral en los grupos: TBI [$t_{(10)}=7.140$; $p<0.001$], Pre-TBI [$t_{(11)}=5.970$; $p<0.001$], TBI-early [$t_{(10)}=8.660$; $p<0.001$], TBI-late [$t_{(7)}=3.150$; $p=0.016$], Pre-TBI-early [$t_{(8)}=12.200$; $p<0.001$] y, Pre-TBI-late [$t_{(9)}=5.410$; $p<0.001$], pero no en el grupo Sham (Figura 44).

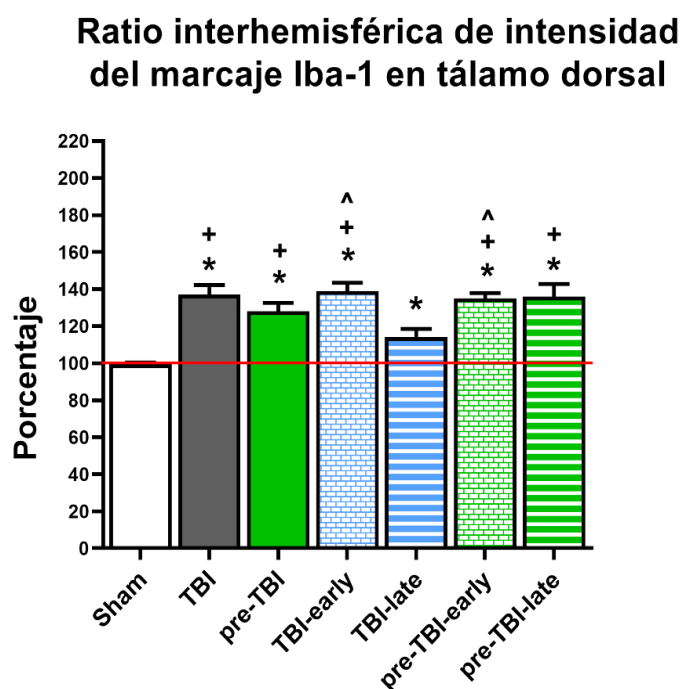


Figura 44. Media \pm SEM de la ratio interhemisférica de la intensidad media de marcaje Iba-1 en tálamo dorsal. *Diferencias respecto a 100 en la prueba t de Student para una muestra ($p<0.05$). ANOVA: +Diferencias respecto a Sham ($p<0.05$); ^Diferencias respecto al grupo TBI-late ($p<0.05$). (Sham, $n=10$; TBI, $n=11$; Pre-TBI, $n=12$; TBI-early, $n=11$; TBI-late, $n=8$; Pre-TBI-early, $n=9$; Pre-TBI-late, $n=10$).

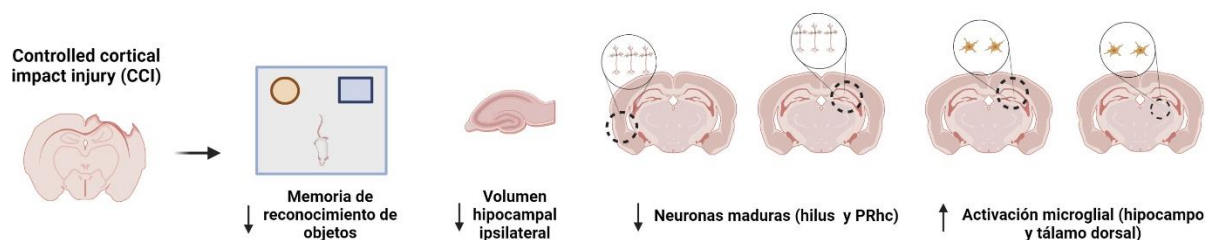
Los resultados obtenidos en un ANOVA Welch mostraron que el factor grupo fue estadísticamente significativo [$F_{(6,26)}=39.40$; $p<0.001$]. Las pruebas *post hoc* de Games-Howell indicaron que la ratio interhemisférica de todos los grupos, menos del TBI-late, tenía un valor superior a la del grupo Sham (TBI $p<0.001$, Pre-TBI $p<0.001$, TBI-early $p<0.001$, Pre-TBI-early $p<0.001$ y Pre-TBI-late $p=0.004$, respectivamente). Además, los grupos con tratamiento post lesión de inicio temprano presentaban valores superiores al grupo TBI-late (TBI-early $p=0.02$ y Pre-TBI-early $p=0.03$, respectivamente).

Por tanto, los resultados de las dos variables estudiadas indican que nuestro modelo de TBI genera un aumento de la reactividad microglial en el tálamo dorsal del hemisferio ipsilateral a la lesión, en comparación al hemisferio contralateral. Solo el tratamiento con ejercicio

postlesión de inicio demorado y sin entrenamiento previo al traumatismo consiguió revertir este efecto.

7.5 Tabla Resumen de Resultados

Efectos del traumatismo



Efecto de los tratamientos

	↓ Déficit de memoria		↑ Neuroprotección			↓ Inflamación	
	3 h	24 h	Volumen hipocampo	NeuN (PRhc)	NeuN (hilus)	Iba-1 (hipocampo)	Iba-1 (tálamo)
Pre-TBI	+	+			+	+	
TBI-early							
TBI-late		++	+	+++	++	+++	+
Pre-TBI-early	+	+					
Pre-TBI-late		++		++	+		

Tabla 2. Resumen de los principales resultados. +, ++ y +++ indican magnitud del efecto.

DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

El presente estudio es el único trabajo hasta la fecha que conozcamos, que ha evaluado la demora de inicio del tratamiento con ejercicio y su interacción con el entrenamiento previo a un TBI sobre la función cognitiva, la neuroprotección y la respuesta inflamatoria.

Los principales hallazgos de este trabajo pusieron de manifiesto que:

El TBI causó un déficit de memoria en la MRO, tanto a corto (3 h) como a largo (24 h) plazo evaluada 2 semanas después del traumatismo. Este deterioro cognitivo se acompañó de diferentes cambios histológicos. Primeramente, se observó una importante pérdida de tejido en la corteza parietal además de la deformación de estructuras adyacentes, en nuestro caso el hipocampo. Por otro lado, se observaron diversos cambios (principalmente asociados al daño secundario) que afectaron sobre todo al hemisferio ipsilateral al traumatismo, como la reducción del volumen del hipocampo dorsal, la pérdida de densidad neuronal tanto en el hilus del GD como en la PRhc, y la exacerbación de la respuesta inflamatoria en el hipocampo y el tálamo dorsal.

Todos los grupos de ejercicio físico, a excepción del grupo con ejercicio posterior temprano (24 h), fueron capaces de reducir los déficits de memoria a las 24 h, y, por tanto, fueron capaces de recordar el objeto familiar. Además, los animales asignados a las pautas de ejercicio demorado (6 días), tanto de ejercicio como sin ejercicio previo, revirtieron los déficits de memoria en la retención a las 24 h, ya que su índice de discriminación fue superior al del grupo lesionado sedentario e igual al del grupo Sham. En la primera retención (3 h) solo los grupos con entrenamiento previo y tratamiento combinado temprano lograron reducir los déficits. Por tanto, la demora de inicio del tratamiento y su interacción con el entrenamiento previo son parámetros clave en los efectos del ejercicio físico sobre los déficits de memoria.

En cuanto a los cambios histológicos producidos por las diferentes pautas de entrenamiento, el ejercicio previo redujo la muerte neuronal y la respuesta inflamatoria en el hipocampo y, probablemente por ello, disminuyó los déficits de memoria asociados al traumatismo. Por otro lado, la importancia del momento de inicio del tratamiento tras el traumatismo queda patente, ya que solo el grupo que inició el ejercicio demorado redujo la pérdida de volumen del hipocampo ipsilateral, revirtió la pérdida de neuronas maduras en el hilus de GD del hipocampo y en la PRhc, y revirtió la respuesta inflamatoria en el hipocampo y la redujo en el tálamo. Estos efectos no se observaron en el grupo de inicio temprano. Los tratamientos combinados con ejercicio previo y posterior al traumatismo, no tuvieron los resultados esperados. Por un lado, el grupo de tratamiento combinado con inicio temprano, a pesar de mostrar una reducción de los déficits de memoria, no presentó el efecto neuroprotector del

entrenamiento previo, mostrando en todas las variables histológicas analizadas unos valores similares a los grupos sedentario y de ejercicio temprano aislado. Por otro lado, si bien el tratamiento combinado de inicio demorado mantuvo la reversión de los déficits de memoria, su efecto neuroprotector fue significativamente inferior al de su grupo homólogo sin entrenamiento previo.

8.1 Efectos del TBI

En este estudio hemos constatado que el daño cerebral producido por un CCI genera déficits de memoria en la tarea de reconocimiento de objetos, tanto a las 3 h como a las 24 h de la adquisición. Así, a diferencia del grupo Sham, los animales del grupo TBI exploraron por igual el objeto nuevo y el familiar, indicando una falta de recuerdo del objeto presentado durante la adquisición. Estos resultados no parecen explicarse por cambios en las fases de habituación, neofobia o adquisición, puesto que no existen diferencias en estas variables respecto al grupo Sham. Déficits de memoria asociados a un TBI en la tarea de MRO y en otras tareas han sido descritos con anterioridad (Donkin et al., 2011; Griesbach et al., 2004; Griffin et al., 2011; Itoh et al., 2011). El déficit de memoria en la sesión de retención a las 24 h ha sido observado de forma consistente en experimentos anteriores en nuestro laboratorio (Amorós-Aguilar et al., 2015, 2020; Lorón-Sánchez et al., 2016). En cambio, el efecto del TBI sobre la retención a las 3 h no siempre ha sido hallado. Así, hemos observado tanto déficits similares a los del presente experimento (Amorós-Aguilar et al., 2020), como déficits mayores (Jacotte-Simancas et al., 2015; Lorón-Sánchez et al., 2016) o ausencia de los mismos (Amorós-Aguilar et al., 2015). Estas discrepancias entre experimentos podrían ser debidas a pequeñas diferencias en la extensión de la lesión o a diferencias en el diseño experimental concreto, como la demora entre la lesión y la MRO.

Este tipo de traumatismos genera un daño focalizado como consecuencia del impacto sobre la duramadre, produciendo una cavidad lesional, deformación de las estructuras adyacentes y muerte neuronal que puede llegar a extenderse a zonas más alejadas. En el presente trabajo, hemos podido comprobar como el traumatismo ha afectado al hipocampo del hemisferio ipsilateral. En concreto, las tinciones con violeta de cresilo mostraron que la ratio interhemisférica del volumen hipocampal de los animales sedentarios con lesión era inferior a 100 y significativamente inferior a la grupo Sham, indicando una considerable reducción del volumen del hipocampo dorsal ipsilateral, en comparación al contralateral. Estos resultados eran esperados y concuerdan con los obtenidos en experimentos previos en nuestro laboratorio con el mismo modelo de TBI y con demoras de 19 (Amorós-Aguilar et al., 2015), 25 (Jacotte-Simancas et al., 2015), 43 (Amorós-Aguilar et al., 2015) o 53 días (Amorós-Aguilar et al., 2020), entre la lesión y la evaluación histológica. Nuestros resultados también

concuerdan con los obtenidos en otros laboratorios utilizando también el modelo de CCI (Byrnes et al., 2012; Itoh et al., 2011; Karelina et al., 2021; Piao et al., 2013)

En cuanto a la pérdida neuronal, los animales del grupo TBI mostraron una ratio interhemisférica de la densidad neuronal inferior a 100 y diferente a la de los animales del grupo Sham, tanto en la PRhc como en el hilus del GD del hipocampo. Estos resultados indican que hubo una disminución de la densidad neuronal en dichas estructuras en el hemisferio ipsilateral al impacto en comparación al contralateral. A pesar de que el daño primario producido por el traumatismo puede ser el responsable de una parte de la muerte neuronal producida en el hipocampo, ya que el traumatismo se realizaba en la corteza adyacente a esta estructura, probablemente el daño secundario sería el principal responsable de la disminución en la densidad neuronal en el hipocampo y la PRhc del hemisferio ipsilateral. Otros laboratorios también han reportado disminuciones neuronales en diversas regiones cerebrales tras un TBI (Gu et al., 2014; Itoh et al., 2011; Piao et al., 2013). La pérdida neuronal observada en la PRhc concuerda con la descrita previamente en nuestro laboratorio (Jacotte-Simancas et al., 2015) y podría relacionarse con la falta de recuerdo a las 3 h, ya que se ha propuesto que esta estructura estaría más relacionada con el reconocimiento de la familiaridad de un objeto presentado previamente que con la consolidación de la memoria a largo plazo (Kealy & Commins, 2011). La pérdida neuronal en el hipocampo es consistente con resultados previos de nuestro laboratorio (Amorós-Aguilar et al., 2020; Jacotte-Simancas et al., 2015) y podría estar especialmente relacionada con el déficit de memoria a las 24 h, ya que hay datos que indican que la implicación de esta estructura en la MRO es mayor en intervalos de retención largos (Clark et al., 2000; Hammond et al., 2004) o cuando la prueba implica un mayor componente espacial (Clark & Martin, 2005; Warburton & Brown, 2015). En nuestro trabajo la retención a las 24 h tiene un mayor componente espacial que el test a las 3 h ya que la localización del objeto familiar cambia entre el primer y el segundo test.

El estudio de la activación microglial mediante el marcaje de Iba-1 nos ha permitido comprobar que nuestro modelo de CCI genera un aumento de la actividad microglial, tanto en el hipocampo como en el tálamo dorsal. Los resultados pusieron de manifiesto que los animales lesionados sedentarios mostraron un mayor porcentaje de área marcada y una mayor intensidad de marcaje en el hemisferio ipsilateral al traumatismo en comparación al contralateral. Por tanto, el TBI generó una potente respuesta de inflamación en ambas estructuras.

La respuesta inflamatoria en el hipocampo dorsal concuerda con trabajos propios previos donde se observó un incremento de la actividad microglial con presencia de focos muy densos de microglía activada 7 semanas después de un CCI (Amorós-Aguilar et al., 2020)(Amorós-

Aguilar et al., 2020). Además, también concuerda con estudios de otros investigadores con demoras menores entre el traumatismo y la evaluación histológica, en concreto 2 (Crane et al., 2012) o 3 semanas post-TBI (Karelina et al., 2021). Sin embargo, no siempre se ha descrito un incremento de la inflamación en el GD del hipocampo tras un TBI. Por ejemplo, (Acosta, Tajiri, et al., 2013) observaron activación microglial en diferentes regiones de la sustancia blanca y gris, pero no en el hipocampo. Este hecho podría ser debido a importantes diferencias en los parámetros utilizados para generar el traumatismo, puesto que en este último trabajo el impacto se realizaba más anterior y medial y alcanzando menor profundidad que en nuestro caso.

El aumento de activación microglial en el tálamo dorsal coincide tanto con los resultados de nuestro (Vivanco-Cárdenas et al., 2019) como de otros laboratorios. Así, se ha descrito que la respuesta inflamatoria en el tálamo tras un daño cerebral traumático aparece desde el periodo agudo (6-24 h) y se sigue observando a los 7 (Simon et al., 2018) y a los 28 días tras el traumatismo (Kelley et al., 2007). Probablemente, esta afectación talámica no es consecuencia directa del impacto sino de la disrupción de la conectividad con otras regiones directamente lesionadas como la corteza parietal (Glushakov et al., 2018; Holden et al., 2021).

En resumen, nuestro modelo de CCI genera una importante respuesta inflamatoria y muerte neuronal tanto en regiones cercanas al punto de impacto como en estructuras más alejadas. Estas alteraciones histológicas en regiones relacionadas con la MRO podrían explicar los déficits observados en la memoria a corto y a largo plazo.

8.2 Efecto del Ejercicio Previo al TBI

Los resultados del presente estudio muestran que 18 días de ejercicio físico realizado previamente a un daño cerebral traumático reducen los déficits asociados al TBI en la memoria a corto y a largo plazo de la prueba de reconocimiento de objetos. Sin embargo, en el test realizado 3 h después de la adquisición, el valor del índice de discriminación del grupo Pre-TBI es muy similar al del grupo TBI y es posible que la diferencia en la significación estadística respecto al valor de referencia se deba a una menor dispersión de los datos en el grupo con ejercicio. Esta reducción de los déficits de memoria no parece estar relacionada con cambios en la exploración en las fases de habituación, neofobia o adquisición. Resultados similares han sido descritos con anterioridad utilizando diferentes tareas, incluida la MRO, tanto con ejercicio físico voluntario como forzado (Fiorin et al., 2016; Gu et al., 2014; Soltani et al., 2020; Taylor et al., 2015; Zhao et al., 2015).

A nivel histológico, el ejercicio previo al traumatismo no modificó la reducción en el volumen hipocampal producida por el TBI, ya que la ratio interhemisférica fue inferior al valor de

referencia y a la del grupo Sham. Sin embargo, sí que disminuyó parcialmente la pérdida de la densidad neuronal en el hilus del GD ipsilateral, ya que a pesar de que la ratio interhemisférica del grupo Pre-TBI fue inferior al valor de referencia, no se diferenció del grupo Sham, a diferencia del grupo TBI. Estos cambios no se observaron en la PRhc. Los resultados obtenidos sugieren que el ejercicio previo puede tener, al menos en parte, un efecto neuroprotector. Este efecto ha sido descrito previamente en modelos de TBI, si bien en su mayoría se ha estudiado en los primeros días tras el daño (Chio et al., 2017; Soltani et al., 2020; Zhao et al., 2015). En el único trabajo que se ha evaluado a largo plazo (15 días después del traumatismo) el efecto del ejercicio voluntario previo al traumatismo sobre la muerte neuronal asociada al TBI, se observó una reducción de la pérdida de neuronas maduras en la corteza cerebral (Gu et al., 2014). Este efecto neuroprotector del ejercicio también ha sido descrito en modelos de daño cerebral adquirido como la isquemia (He et al., 2014; Otsuka et al., 2019, 2021; Terashi et al., 2019).

En relación a la activación microglial, los resultados obtenidos en el hipocampo son similares a los descritos respecto a la densidad neuronal en el hilus del GD. Los animales del grupo Pre-TBI mostraron una ratio interhemisférica, tanto en porcentaje de área marcada como en intensidad de marcaje, superior al valor de referencia, pero a diferencia de los sujetos del grupo TBI, sin diferenciarse de los valores del grupo Sham. En cambio, en el tálamo dorsal los sujetos del grupo Pre-TBI mostraron un aumento de la activación microglial similar a la de los animales con lesión y sin ejercicio. La reducción de la activación microglial observada en el hipocampo puede ser interpretada como una disminución de la respuesta neuroinflamatoria y/o como un efecto antiinflamatorio del tratamiento pretraumático. En este sentido, diversos trabajos con ejercicio forzado previo al traumatismo han descrito una reducción en diversas citoquinas y factores proinflamatorios y un aumento de factores antiinflamatorios (Chio et al., 2017; Fiorin et al., 2016; Soltani et al., 2020). Sin embargo, en estos trabajos el efecto del ejercicio ha sido evaluado en fase aguda tras el traumatismo (entre 1 y 3 días). En el único trabajo en el que se ha estudiado a largo plazo el efecto del ejercicio voluntario sobre la activación microglial asociada a un TBI, se observó una reducción en el número de células de microglía en estado activo en la corteza ipsilateral a la lesión (Zhao et al., 2015). Similares resultados han sido proporcionados en trabajos con daño isquémico (Ding et al., 2006) o daño cerebral hemorrágico (Otsuka et al., 2021).

Por tanto, el ejercicio previo reduce la muerte neuronal y la respuesta inflamatoria en el hipocampo y, probablemente por ello, disminuye los déficits de memoria asociados al traumatismo. Sin embargo, este efecto neuroprotector no se observa en estructuras más alejadas de la zona impactada, como la PRhc y el tálamo. Si bien es posible que estas diferencias se deban a la distancia respecto al punto de impacto, también es posible que se

deban al hecho de que el hipocampo es la estructura más sensible a los efectos del ejercicio físico (Hamilton & Rhodes, 2015).

8.3 Efecto del Ejercicio Posterior al TBI (Inicio Temprano vs Demorado)

Los resultados del presente estudio muestran que el ejercicio físico tras un TBI puede ser beneficioso para reducir los déficits cognitivos asociados solo cuando existe una cierta demora entre el traumatismo y el inicio del tratamiento. En este sentido, el grupo que inició el tratamiento de forma temprana (a las 24 h) mostró una ejecución en la tarea de MRO similar a la del grupo lesionado sin ejercicio, es decir, no mostró recuerdo ni a las 3 h ni a las 24 h de la adquisición. En cambio, el grupo con inicio demorado (6 días), si bien en la prueba de memoria a corto plazo mostró una ejecución similar a la del grupo TBI, en la prueba de memoria a largo plazo mostró un recuerdo significativo del objeto familiar y superior al del grupo sedentario. Este efecto beneficioso sobre la memoria en la segunda retención de la MRO se ha observado de forma consistente en experimentos previos en nuestro laboratorio con el mismo modelo de TBI y con demoras de 4 días (Amorós-Aguilar et al., 2020; Jacotte-Simancas et al., 2015), 11 días (Martínez-Drudis et al., 2021) o 4 semanas después del TBI (Amorós-Aguilar et al., 2020). El efecto del tratamiento demorado no puede explicarse por cambios en la actividad locomotora durante las sesiones de habituación, en la conducta en la sesión de neofobia, ni en la cantidad de exploración de los objetos en la sesión de adquisición. En cambio, en los animales del grupo con ejercicio temprano se observó un menor tiempo, pero no latencia, de exploración en la sesión de neofobia y un menor tiempo de exploración de los objetos durante la adquisición respecto al grupo Sham, pero no respecto al grupo TBI. Podría pensarse que la cantidad de exploración de los objetos en la adquisición de los sujetos del grupo TBI-early no es suficiente para poder reconocer el objeto familiar en las sesiones de retención. Sin embargo, el grupo Pre-TBI-early que muestra valores de exploración similares, tiene un buen recuerdo en ambas sesiones de retención. Además, en trabajos anteriores hemos podido comprobar que con tiempos de exploración mucho menores a los mostrados por el grupo TBI-early, es posible una buena ejecución durante las pruebas de retención (Amorós-Aguilar et al., 2020; Jacotte-Simancas et al., 2015; Martínez-Drudis et al., 2021).

En cuanto al estudio histológico en el hipocampo, los animales del grupo TBI-early mostraron una disminución similar a la de los del grupo TBI, tanto de la ratio interhemisférica del volumen hipocampal como de la densidad de neuronas Neun⁺ en el hilus. Es decir, el hipocampo ipsilateral mostraba un menor volumen que el contralateral y una menor densidad neuronal. En el grupo TBI-late se observó también una pérdida de tejido hipocampal ipsilateral, aunque menor que la de los grupos de inicio temprano y TBI sedentario. Además, no se diferenció de la ratio del grupo Sham. En cuanto a la densidad neuronal en el hipocampo, el grupo TBI-late

tuvo valores iguales al valor de referencia y al grupo Sham, y superiores al grupo TBI-early. Es decir, los sujetos con ejercicio demorado sufrieron una pérdida de tejido en el hipocampo ipsilateral, pero el tejido conservado mantuvo una densidad neuronal similar a la del grupo Sham. La evaluación de la densidad neuronal en la PRhc puso de manifiesto que el tratamiento de inicio temprano no tuvo ningún efecto sobre la reducción asociada al traumatismo. En cambio, el tratamiento demorado revirtió nuevamente la pérdida neuronal, ya que la densidad neuronal del hemisferio ipsilateral fue similar a la del contralateral y la ratio interhemisférica no difirió de la del grupo Sham y fue superior a la de los grupos TBI y TBI-early.

Resultados similares a los del estudio de la densidad neuronal fueron obtenidos en el análisis de la activación microglial. En este sentido, el tratamiento demorado revirtió completamente el aumento de activación observado en el hipocampo tras el traumatismo, con ratios interhemisféricas iguales al valor de referencia e inferiores a las de los grupos TBI y TBI-early, pero no a las del grupo Sham. En el tálamo, el efecto también fue beneficioso, pero algo menor ya que el grupo TBI-late mostró niveles de activación microglial superiores en el hemisferio ipsilateral respecto al contralateral, aunque sin llegar a diferenciarse ni del grupo Sham ni del grupo TBI en la intensidad de marcaje, y solo se diferenció del grupo TBI en el porcentaje de área con marcaje Iba-1. Por el contrario, cuando el tratamiento se inició de forma temprana no se detectaron cambios respecto al grupo TBI en ninguna de las variables estudiadas ni en el hilus del GD ni en la parte dorsal del tálamo.

Los resultados obtenidos confirman, en su mayor parte, resultados previos respecto a los efectos beneficiosos del ejercicio como tratamiento tras un TBI, cuando su inicio es demorado (Amorós-Aguilar et al., 2020; Griesbach et al., 2004; Jacotte-Simancas et al., 2015; Karelina et al., 2021; Ko et al., 2018; Martínez-Drudis et al., 2021). Por otra parte, ponen de manifiesto la importancia del momento de inicio de este tratamiento tal como habíamos expuesto en nuestro planteamiento. A diferencia de lo que podría haberse esperado según la literatura previa (Griesbach et al., 2004), el ejercicio iniciado de forma temprana tras el traumatismo no agravó los déficits asociados al TBI. Estas diferencias en los resultados en función de la demora de inicio del tratamiento no parecen explicarse por diferencias en el volumen de ejercicio físico durante los primeros días de ejercicio o durante los días de la evaluación cognitiva.

El tiempo de demora entre la lesión y el inicio del tratamiento con ejercicio físico ha sido poco estudiado, probablemente por la imposibilidad de igualar todas las variables temporales que influyen en los efectos del ejercicio. Así, si el tratamiento se inicia con diferentes demoras y se iguala su duración, forzosamente la evaluación cognitiva debe realizarse en momentos

diferentes tras el traumatismo (Griesbach et al., 2004). En cambio, si el tratamiento se inicia con diferentes demoras y se iguala tanto el momento de evaluación como la duración del tratamiento, debe introducirse una pausa sin ejercicio (Piao et al., 2013). Estos diseños implican, respectivamente, que se está realizando la evaluación en momentos distintos de la evolución del daño secundario, o que existe una diferencia temporal importante entre la finalización del ejercicio y la evaluación cognitiva. En nuestro caso, el diseño no introduce ninguna interrupción en el tratamiento y las pruebas cognitivas se realizan en el mismo momento postlesión, pero esto implica una diferencia en la duración del tratamiento, de forma similar al trabajo de Chen et al (2013) con ejercicio forzado. Por todo ello, los resultados de los diferentes trabajos son difíciles de comparar. A pesar de estas diferencias, nuestros resultados son similares a los obtenidos en un estudio de Griesbach et al. (2004) en el que se comparó el efecto de 7 días de ejercicio voluntario iniciado el mismo día del traumatismo o iniciado con una demora de 14 días. También existe cierta coincidencia con el trabajo de Piao et al. (2013) en el que el tratamiento iniciado con una mayor demora (5 semanas) tuvo más efecto beneficioso sobre el aprendizaje que el iniciado con una menor demora (1 semana). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en este último trabajo hubo un período de 38 días sin ejercicio físico entre el final del tratamiento iniciado 1 semana post-TBI y las pruebas conductuales. En cambio, nuestros resultados no coinciden con los de Chen et al (2013) a pesar de que los aspectos temporales de su diseño experimental son similares a los nuestros. En este estudio, el inicio temprano (2 días postraumatismo) del ejercicio físico supuso una mejora de la MRO, pero no el inicio demorado (9 días). Estas diferencias podrían estar relacionadas tanto con diferencias en el modelo de TBI (impacto cortical controlado vs impacto sobre el cráneo), como con la especie animal (rata vs ratón) y el tipo de ejercicio físico (voluntario vs forzado).

Por tanto, el ejercicio posterior de inicio demorado, pero no de inicio temprano, ha tenido un efecto neuroprotector y antiinflamatorio y, probablemente por ello, ha disminuido los déficits de memoria asociados al traumatismo.

8.4 Interacción entre Ejercicio Previo y Demora de Inicio del Tratamiento

Hasta el momento hemos discutido el efecto protector del ejercicio previo al traumatismo y la importancia de la demora cuando el tratamiento se realiza a posteriori. En este apartado, analizaremos como se modifica el efecto del ejercicio físico posterior al impacto en función de si se ha realizado o no entrenamiento previamente.

¿Puede el entrenamiento previo modificar el efecto del tratamiento posterior al traumatismo? Los resultados del grupo Pre-TBI-early respecto a la MRO indican un buen recuerdo del objeto

familiar en la primera sesión de retención, que se mantiene en la retención a largo plazo. Así pues, mientras que el tratamiento con inicio temprano y sin ejercicio previo no supuso ningún beneficio en los déficits de memoria, cuando el tratamiento lo realizan sujetos entrenados previamente al traumatismo, supone una mejora en la cognición tanto a corto como a largo plazo. Es decir, el hecho de hacer ejercicio previo modifica el efecto del tratamiento posterior de inicio temprano. Esta mejora en el rendimiento se observa incluso a pesar de que el tiempo de exploración en la sesión de adquisición fue inferior a la de los grupos Sham y TBI. Esta disminución en la exploración es común a los dos grupos con tratamiento de inicio temprano y, por tanto, no puede explicar las diferencias en la memoria. En cuanto al análisis histológico, no parece que la combinación de ejercicio previo y posterior temprano suponga ninguna ventaja respecto al tratamiento posterior solo. Así, igual que en los grupos TBI y TBI-early, el volumen del hipocampo y la densidad neuronal en el hilus del GD y de la PRhc son menores en el hemisferio ipsilateral respecto al contralateral y la activación microglial es mayor tanto en el hipocampo como en el tálamo dorsal. Además, en comparación con el grupo Pre-TBI, el grupo Pre-TBI-early mostró una menor ratio interhemisférica de células NeuN⁺ en el hilus del GD y del porcentaje de área marcada con Iba-1 en el tálamo dorsal.

Los resultados del grupo Pre-TBI-late respecto a la MRO son parecidos a los del grupo TBI-late ya que ambos grupos muestran un buen recuerdo del objeto familiar en la segunda sesión de retención y superior al mostrado por el grupo TBI. Es decir, en este caso, el tratamiento previo no modificó el efecto del tratamiento posterior de inicio demorado. Como en el caso del efecto en el grupo TBI-late, la mejora en la retención no es atribuible a cambios en las sesiones de habituación, neofobia o adquisición. En cuanto al análisis histológico, todas las variables estudiadas presentan, en mayor o menor medida, peores resultados que los del grupo TBI-late. Así, el tratamiento combinado no tuvo ningún efecto sobre la pérdida de volumen hipocampal generada por el TBI, redujo el efecto positivo del tratamiento demorado sobre la densidad neuronal en el hilus del GD (valor inferior al valor de referencia) y en la PRhc (valores intermedios entre el grupo Sham y TBI), y prácticamente anuló el efecto antiinflamatorio en el hipocampo y en el tálamo dorsal del tratamiento posterior al traumatismo aislado (valores superiores a los de referencia y a los del grupo TBI-late en todas las variables, si bien en el hipocampo no fue superior a los grupo Sham).

En la búsqueda bibliográfica solo hemos encontrado un trabajo en el que se evalúe el efecto de la combinación de ejercicio físico forzado previo y de inicio temprano después de un TBI (Rafie et al., 2022). Los resultados de este trabajo sugieren que tanto el tratamiento temprano como su combinación con entrenamiento previo disminuyen la inflamación y mejoran la capacidad antioxidante total. Sin embargo, la descripción metodológica no deja claro el

momento de evaluación de estos parámetros en los grupos sedentarios y, por tanto, es difícil extraer conclusiones y poder compararlo con nuestro trabajo.

Nuestros resultados indican que el ejercicio previo al traumatismo sí que modifica los efectos del tratamiento post-TBI, tanto de inicio temprano como demorado. Sin embargo, esta influencia parece ser distinta en función de las variables estudiadas. En cuanto a la MRO, el entrenamiento previo tiene un gran impacto en el efecto del tratamiento temprano ya que el tratamiento combinado mejora la ejecución de la tarea en las dos sesiones de retención. En cambio, no modifica el efecto beneficioso del tratamiento de inicio demorado. Sorprendentemente, estos efectos conductuales no se acompañan de cambios similares en las variables histológicas. En este caso, el tratamiento previo no modificó la pérdida neuronal ni la activación microglial observada en los sujetos del grupo TBI-early, pero sí que empeoró estas variables en el caso del ejercicio demorado.

8.5 ¿Efectos Neuroprotectores o Neuroreparadores?

En nuestro experimento, el tratamiento de inicio temprano supuso un deterioro cognitivo y del tejido similares a las del grupo lesionado y sedentario, mientras que el tratamiento de inicio demorado disminuyó el daño secundario asociado al traumatismo y mejoró el rendimiento en las pruebas de memoria. Por tanto, nuestros resultados apoyan la idea de que es necesaria una cierta demora entre el traumatismo y el inicio del tratamiento con ejercicio físico para poder obtener un efecto beneficioso. Como ya hemos comentado en el marco teórico, probablemente esto se debe a que la demanda metabólica que comporta el ejercicio físico agrava la crisis energética asociada al TBI, especialmente durante las primeras horas o días tras el traumatismo.

Nuestra hipótesis de partida suponía que el ejercicio previo a un traumatismo reduciría el impacto metabólico del TBI y, con ello, podría permitir avanzar el inicio del tratamiento postlesión para aprovechar el efecto neuroprotector del tratamiento desde una fase temprana, disminuyendo el daño secundario y mejorando la recuperación cognitiva. Además, en el caso del tratamiento demorado, estos beneficios en los primeros momentos tras el traumatismo podrían sumarse a la neuroprotección ofrecida por el tratamiento posterior, potenciando los efectos sobre la cognición. De acuerdo con esta idea, el tratamiento previo ha tenido un ligero efecto neuroprotector en el hipocampo que podría estar relacionado con el efecto beneficioso observado en las pruebas de memoria. Sin embargo, los resultados obtenidos en los grupos de tratamiento combinado, pre y postratamiento, parecen contradecir parcialmente nuestra hipótesis inicial ya que, si bien los resultados cognitivos sí son los esperados, no lo son los cambios a nivel histológico. Es posible que, tal como sugiere la bibliografía existente (Fiorin

et al., 2016; Mota et al., 2012; Soltani et al., 2020; Z. Zhao et al., 2015), el ejercicio previo haya disminuido el impacto metabólico generado por el TBI. Pero, además, este entrenamiento previo ha supuesto un incremento significativo, respecto a su respectivo tratamiento post aislado, del nivel de ejercicio (distancia recorrida y tiempo de ejercicio) durante los primeros días de ejercicio físico después de la lesión. Por tanto, aunque el ejercicio previo haya reducido el impacto metabólico del TBI, parece razonable pensar que el incremento significativo en los niveles de ejercicio haya aumentado de manera importante la demanda metabólica asociada al tratamiento. Este desequilibrio entre la reducción del impacto de los cambios metabólicos generados por el TBI y el incremento de la demanda por parte del ejercicio sería más grave en los primeros momentos tras el TBI e iría disminuyendo a medida que aumenta la demora entre el traumatismo y el inicio del ejercicio. Probablemente por esta razón, el grupo Pre-TBI-late presentó una neuroprotección intermedia entre el grupo Pre-TBI-early y TBI-late. Por tanto, puesto que en el presente trabajo los dos tratamientos combinados tuvieron un efecto beneficioso sobre la MRO que no puede ser explicado por un aumento del efecto neuroprotector respecto al tratamiento postlesión aislado, es plausible pensar que este beneficio se debe a otros mecanismos neurales.

Los efectos beneficiosos de un tratamiento tras un TBI se pueden explicar por la disminución del daño secundario (neuroprotección) y/o por la potenciación de mecanismos compensatorios (neuroreparación). Trabajos previos han puesto de manifiesto que el efecto del ejercicio físico tras un TBI activa ambos procesos. En concreto, en nuestro laboratorio hemos podido observar un efecto neuroprotector evidenciado por una disminución de la muerte neuronal y un efecto neuroreparador asociado a un aumento de la neurogénesis (Amorós-Aguilar et al., 2020; Jacotte-Simancas et al., 2015) y de neurotrofinas como el BDNF (Martínez-Drudis et al., 2021). ¿Podría este mecanismo neuroreparador explicar los resultados beneficiosos de los grupos con ejercicio previo y posterior al traumatismo? Para contestar a esta pregunta debemos tener en cuenta que, a pesar de que el ejercicio físico puede parecer un tratamiento relativamente simple, existe una gran cantidad de parámetros que pueden influir en sus efectos. Por ejemplo, hay que tener en cuenta el tipo de ejercicio físico (voluntario/forzado, aeróbico/anaeróbico), el programa de entrenamiento (continuo/discontinuo), la duración, la intensidad y el volumen del ejercicio, etc. En nuestro experimento, una diferencia clara entre los grupos de tratamiento combinado con los que solo tienen ejercicio postlesión es el volumen de ejercicio durante los primeros días de tratamiento tras el TBI y, en el caso del grupo Pre-TBI-early, también durante los días de las pruebas de MRO. Esta diferencia en el volumen de ejercicio es esperable teniendo en cuenta que el ejercicio previo a la lesión hace que los sujetos ya estén adaptados a la rueda de actividad y que además estén físicamente más entrenados. Diversos trabajos muestran que existe una

correlación positiva entre el volumen de ejercicio físico voluntario (distancia recorrida) y el incremento de diversas neurotrofinas y moléculas ligadas a la plasticidad como el BDNF, el IGF-1, la sinapsina I y la sinaptofisina (Gómez-Pinilla et al., 2002; Griesbach et al., 2007; Ploughman et al., 2014). Por tanto, es razonable pensar que los grupos de tratamiento combinado se hayan podido beneficiar de un elevado incremento en los niveles de estas moléculas, y que este efecto neuroreparador explicara los beneficios en la conducta.

Sin embargo, ¿qué mecanismo podría explicar la reducción en el efecto neuroprotector observada en el grupo Pre-TBI-late? Como hemos comentado, es posible que la alta demanda metabólica que implica un nivel elevado de ejercicio físico los primeros días del tratamiento haya contrarrestado los efectos metabólicos del entrenamiento previo. Otra posible explicación es que los altos niveles de actividad física voluntaria hayan exacerbado la muerte neuronal. Los niveles altos de BDNF promueven la hiperexcitabilidad neuronal asociada al glutamato y, al menos en determinadas circunstancias, esto podría aumentar la vulnerabilidad neuronal, principalmente en el hipocampo (Koh et al., 1995; Koyama et al., 2004; Prehn, 1996; Ramsden et al., 2003). Esta misma explicación encajaría con la falta total de neuroprotección observada en el grupo Pre-TBI-early que presenta los mayores niveles de ejercicio durante los primeros días tras el traumatismo.

El conjunto de resultados son una muestra de la gran complejidad del estudio de los efectos del ejercicio físico como tratamiento tras un TBI. Además de la gran cantidad de parámetros que se deben tener en cuenta en este tipo de tratamiento y que aún no están estandarizados ni en humanos ni en modelos animales, es posible que algunos de estos parámetros influyan de forma diferencial sobre los mecanismos neuroprotectores y neuroreparadores.

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

- El modelo de daño cerebral traumático utilizado en el presente trabajo (impacto cortical controlado), induce un déficit de memoria en la tarea de reconocimiento de objetos, tanto a las 3 h como a las 24 h de la adquisición. A nivel histológico, produce una importante pérdida de tejido en el hipocampo, una reducción de la densidad neuronal en el hilus del GD del hipocampo y en la corteza perirhinal, y un aumento de la activación microglial en el hipocampo y tálamo dorsales.
- El entrenamiento previo a la lesión traumática reduce los déficits de memoria en ambas retenciones (3 h y 24 h tras la adquisición) en la prueba de reconocimiento de objetos y tiene un ligero efecto neuroprotector al reducir la muerte neuronal y la activación microglial en hipocampo dorsal.
- El efecto del ejercicio físico tras el traumatismo depende de la demora de inicio. Un inicio temprano (24 h) no supone ningún beneficio, en cambio, el tratamiento iniciado con una demora de 6 días revierte el déficit de memoria a largo plazo, reduce la pérdida de tejido, la disminución de la densidad neuronal y la activación microglial.
- El entrenamiento previo al traumatismo modifica el efecto del tratamiento con ejercicio posterior. El ejercicio de inicio temprano (24 h), que no supone un beneficio cuando se aplica aisladamente, reduce los déficits de memoria a corto y a largo plazo cuando se aplica en sujetos entrenados previamente, pero no modifica la pérdida neuronal ni la activación microglial. En cambio, la combinación de ejercicio demorado (6 días) y entrenamiento previo al traumatismo, no modifica el efecto beneficioso en la memoria, pero reduce el efecto neuroprotector y antiinflamatorio del tratamiento posterior a la lesión.

REFERENCIAS

10. REFERENCIAS

- Abelson, K. S., Jacobsen, K. R., Sundbom, R., Kalliokoski, O., & Hau, J. (2012). Voluntary ingestion of nut paste for administration of buprenorphine in rats and mice. *Laboratory Animals*, 46(4), 349–351. <https://doi.org/10.1258/la.2012.012028>
- Åberg, M. A., Pedersen, N. L., Torén, K., Svartengren, M., Bäckstrand, B., Johnsson, T., Cooper-Kuhn, C. M., Åberg, N. D., Nilsson, M., & Kuhn, H. G. (2009). Cardiovascular fitness is associated with cognition in young adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49), 20906–20911. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0905307106>
- Acosta, S. A., Diamond, D. M., Wolfe, S., Tajiri, N., Shinozuka, K., Ishikawa, H., Hernandez, D. G., Sanberg, P. R., Kaneko, Y., & Borlongan, C. V. (2013). Influence of post-traumatic stress disorder on neuroinflammation and cell proliferation in a rat model of traumatic brain injury. *PLoS ONE*, 8(12), 81585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081585>
- Acosta, S. A., Tajiri, N., Shinozuka, K., Ishikawa, H., Grimmig, B., Diamond, D., Sanberg, P. R., Bickford, P. C., Kaneko, Y., & 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), 53376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053376>
- Aggleton, J. P., Brown, M. W., & Albasser, M. M. (2012). Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: Insights from immediate-early gene functional imaging. *Neuropsychologia*, 50(13), 3141–3155. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2012.05.018>
- Akkerman, S., Blokland, A., Reneerkens, O., van Goethem, N. P., Bollen, E., Gijssels, H. J. M., Lieben, C. K. J., Steinbusch, H. W. 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>
- Alder, J., Fujioka, W., Lifshitz, J., Crockett, D. P., & Thakker-Varia, S. (2011). Lateral Fluid Percussion: Model of Traumatic Brain Injury in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 54. <https://doi.org/10.3791/3063>
- 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>
- Allen, N. J., Káradóttir, R., & Attwell, D. (2005). A preferential role for glycolysis in preventing the anoxic depolarization of rat hippocampal area CA1 pyramidal cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(4), 848–859. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4157-04.2005>

- 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>
- 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>
- Amorós-Aguilar, L., Portell-Cortés, I., Costa-Miserachs, D., Torras-Garcia, M., Riubugent-Camps, È., Almolda, B., & Coll-Andreu, M. (2020). The benefits of voluntary physical exercise after traumatic brain injury on rat's object recognition memory: A comparison of different temporal schedules. *Experimental Neurology*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113178>
- Andriessen, T. M., Jacobs, B., & Vos, P. E. (2010). Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(10), 2381–2392. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x>
- Ang, E. T., Dawe, G. S., Wong, P. T. H., Moochhala, S., & Ng, Y. K. (2006). Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Research*, 1113(1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.023>
- Ansari, M. A., Roberts, K. N., & Scheff, S. W. (2008). Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(4), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.038>
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/S10339-011-0430-Z>
- Archer, T., Svensson, K., & Alricsson, M. (2012). Physical exercise ameliorates deficits induced by traumatic brain injury. *Acta Neurologica Scandinavica*, 125(5), 293–302. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2011.01638.x>
- Asl, N. A., Sheikhzade, F., Torchi, M., Roshangar, L., & Khamnei, S. (2008). Long-term regular exercise promotes memory and learning in young but not in older rats. *Pathophysiology*, 15(1), 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2007.10.002>
- Audiffren, M., Tomporowski, P. D., & Zagrodnik, J. (2008). Acute aerobic exercise and information processing: energizing motor processes during a choice reaction time task. *Acta Psychologica*, 129(3), 410–419. <https://doi.org/10.1016/J.ACTPSY.2008.09.006>
- Audiffren, M., Tomporowski, P. D., & Zagrodnik, J. (2009). Acute aerobic exercise and information processing: modulation of executive control in a Random Number Generation task. *Acta Psychologica*, 132(1), 85–95. <https://doi.org/10.1016/J.ACTPSY.2009.06.008>

- Ballester-Ferrer, J. A., Roldan, A., Cervelló, E., & Pastor, D. (2022). Memory Modulation by Exercise in Young Adults Is Related to Lactate and Not Affected by Sex or BDNF Polymorphism. *Biology*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11101541>
- Barker, G. R., Bashir, Z. I., Brown, M. W., & Warburton, E. C. (2006). A temporally distinct role for group I and group II metabotropic glutamate receptors in object recognition memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 13(2), 178–186. <https://doi.org/10.1101/LM.77806>
- Bartko, S. J., Winters, B. D., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2007a). Perceptual functions of perirhinal cortex in rats: Zero-delay object recognition and simultaneous oddity discriminations. *Journal of Neuroscience*, 27(10), 2548–2559. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5171-06.2007>
- Bartko, S. J., Winters, B. D., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2007b). 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>
- Basso, J. C., Oberlin, D. J., Satyal, M. K., O'Brien, C. E., Crosta, C., Psaras, Z., Metpally, A., & Suzuki, W. A. (2022). Examining the Effect of Increased Aerobic Exercise in Moderately Fit Adults on Psychological State and Cognitive Function. *Frontiers in Human Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2022.833149>
- Bermejo, J. L., Valdecabres, R., Villarrasa-Sapiña, I., Monfort-Torres, G., Marco-Ahulló, A., & Ribeiro Do Couto, B. (2022). Increased cortisol levels caused by acute resistance physical exercise impair memory and learning ability. *PeerJ*, 10. <https://doi.org/10.7717/peerj.13000>
- Bird, C. M., & Burgess, N. (2008). The hippocampus and memory: Insights from spatial processing. In *Nature Reviews Neuroscience*, 9(3), 182–194. *Nat Rev Neurosci*. <https://doi.org/10.1038/nrn2335>
- Blaszczuk, L., Maître, M., Lesté-Lasserre, T., Clark, S., Cota, D., Olié, S. H. R., & Fénelon, V. S. (2018). Sequential alteration of microglia and astrocytes in the rat thalamus following spinal nerve ligation. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1378-z>
- Blennow, K., Brody, D. L., Kochanek, P. M., Levin, H., McKee, A., Ribbers, G. M., Yaffe, K., & Zetterberg, H. (2016). Traumatic brain injuries. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2016.84>
- Blustein, J. E., McLaughlin, M., & Hoffman, J. R. (2006). Exercise effects stress-induced analgesia and spatial learning in rats. *Physiology and Behavior*, 89(4), 582–586. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.07.017>
- Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G. L., & Song, H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145(7), 1142–1155. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.024>

- Bonne, O., Gilboa, A., Louzoun, Y., Kempf-Sherf, O., Katz, M., Fishman, Y., Ben-Nahum, Z., Krausz, Y., Bocher, M., Lester, H., Chisin, R., & Lerer, B. (2003). Cerebral blood flow in chronic symptomatic mild traumatic brain injury. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 124(3), 141–152. [https://doi.org/10.1016/S0925-4927\(03\)00109-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4927(03)00109-4)
- Bramham, C. R., & Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. *Progress in Neurobiology*, 76(2), 99–125. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.003>
- Bramham, C. R., & Wells, D. G. (2007). Dendritic mRNA: Transport, translation and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10), 776–789. <https://doi.org/10.1038/nrn2150>
- Brazinova, A., Rehorcikova, V., Taylor, M. S., Buckova, V., Majdan, M., Psota, M., Peeters, W., Feigin, V., Theadom, A., Holkovic, L., & Synnot, A. (2021). Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *Journal of Neurotrauma*, 38(10), 1411–1440. <https://doi.org/10.1089/NEU.2015.4126>
- Brodmann, K. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Leipzig, Alemania: Barth.
- Brown, M. W., & Xiang, J. Z. (1998). Recognition memory: neuronal substrates of the judgement of prior occurrence. *Progress in Neurobiology*, 55(2), 149–189. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00002-1)
- Bruns, J., & Hauser, W. A. (2003). The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia*, 44(s10), 2–10. <https://doi.org/10.1046/J.1528-1157.44.S10.3.X>
- Burda, J. E., Bernstein, A. M., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 275 Pt 3(0 3), 305–315. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2015.03.020>
- Byrnes, K. R., Loane, D. J., Stoica, B. A., Zhang, J., & Faden, A. I. (2012). Delayed mGluR5 activation limits neuroinflammation and neurodegeneration after traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-43>
- Capizzi, A., Woo, J., & Verduzco-Gutierrez, M. (2020). Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management. In *Medical Clinics of North America*, 104,(2), 213–238. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.11.001>
- Caspersen, C. J., Powell, K. E., & Christenson, G. M. (1985). Physical Activity, Exercise, and Physical Fitness: Definitions and Distinctions for Health-Related Research. *Public Health Reports*, 100(2), 126–131. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1424733>
- Cassilhas, R. C., Tufik, S., & De Mello, M. T. (2016). Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(5), 975–983. <https://doi.org/10.1007/S00018-015-2102-0>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2023, 20 de abril). Traumatic Brain Injury Recuperado de <https://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/index.html>

- Chaddock, L., Erickson, K. I., Prakash, R. S., Kim, J. S., Voss, M. W., Vanpatter, M., Pontifex, M. B., Raine, L. B., Konkel, A., Hillman, C. H., Cohen, N. J., & Kramer, A. F. (2010). A neuroimaging investigation of the association between aerobic fitness, hippocampal volume, and memory performance in preadolescent children. *Brain Research*, 1358, 172–183. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2010.08.049>
- Chaddock, L., Hillman, C. H., Pontifex, M. B., Johnson, C. R., Raine, L. B., & Kramer, A. F. (2012). Childhood aerobic fitness predicts cognitive performance one year later. *Journal of Sports Sciences*, 30(5), 421–430. <https://doi.org/10.1080/02640414.2011.647706>
- Chang, H. C., Yang, Y. R., Wang, S. G. P., & Wang, R. Y. (2009). Effects of treadmill training on motor performance and extracellular glutamate level in striatum in rats with or without transient middle cerebral artery occlusion. *Behavioural Brain Research*, 205(2), 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.07.033>
- Chang, Y. K., Ku, P. W., Tomporowski, P. D., Chen, F. T., & Huang, C. C. (2012). Effects of acute resistance exercise on late-middle-age adults' goal planning. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(9), 1773–1779. <https://doi.org/10.1249/MSS.0B013E3182574E0B>
- Chao, O. Y., de Souza Silva, M. A., Yang, Y. M., & Huston, J. P. (2020). The medial prefrontal cortex - hippocampus circuit that integrates information of object, place and time to construct episodic memory in rodents: Behavioral, anatomical and neurochemical properties. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 113, 373–407. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2020.04.007>
- 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>
- Cherian, L., Robertson, C. S., Contant, C. F., & Bryan, R. M. (1994). Lateral cortical impact injury in rats: cerebrovascular effects of varying depth of cortical deformation and impact velocity. *Journal of Neurotrauma*, 11(5), 573–585. <https://doi.org/10.1089/NEU.1994.11.573>
- 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>
- Chio, C. C., Lin, H. J., Tian, Y. F., Chen, Y. C., Lin, M. T., Lin, C. H., Chang, C. P., & Hsu, C. C. (2017). Exercise attenuates neurological deficits by stimulating a critical HSP70/NF- κ B/IL-6/synapsin I axis in traumatic brain injury rats. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0867-9>

- Chiu, C. C., Liao, Y. E., Yang, L. Y., Wang, J. Y., Tweedie, D., Karnati, H. K., Greig, N. H., & Wang, J. Y. (2016). Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. In *Journal of Neuroscience Methods* (Vol. 272, pp. 38–49). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.06.018>
- Christian, K. M., Song, H., & Ming, G. L. (2014). Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. *Annual Review of Neuroscience*, 37, 243–262. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-071013-014134>
- Cinalli, D. A., Cohen, S. J., Guthrie, K., & Stackman, R. W. (2020). Object Recognition Memory: Distinct Yet Complementary Roles of the Mouse CA1 and Perirhinal Cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2020.527543>
- Clarke, J. R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., & Delgado-García, J. M. (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6), 2652–2657. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0915059107>
- 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 rats after damage to the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 20(23), 8853–8860. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-23-08853.2000>
- 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>
- Cope, E. C., & Gould, E. (2019). Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*, 24(5), 690–705. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.023>
- Damsbo, A. G., Mortensen, J. K., Kraglund, K. L., Johnsen, S. P., Andersen, G., & Blauenfeldt, R. A. (2020). Prestroke Physical Activity and Poststroke Cognitive Performance. *Cerebrovascular Diseases*, 49(6), 632–638. <https://doi.org/10.1159/000511490>
- Davachi, L., Mitchell, J. P., & Wagner, A. D. (2003). Multiple routes to memory: Distinct medial temporal lobe processes build item and source memories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 2157–2162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337195100>
- Dean, D. D., Frank, J. A., & Turtzo, L. C. (2017). Controlled Cortical Impact in the Rat. *Current Protocols in Neuroscience*, 81(1), 9.62.1–9.62.12. <https://doi.org/10.1002/cpns.37>
- De Bono, J. P., Adlam, D., Paterson, D. J., & Channon, K. M. (2006). Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(4). <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00694.2005>

- de Diego-Moreno, M., Álvarez-Salvago, F., Martínez-Amat, A., Boquete-Pumar, C., Orihuela-Espejo, A., Aibar-Almazán, A., & Jiménez-García, J. D. (2022). Acute Effects of High-Intensity Functional Training and Moderate-Intensity Continuous Training on Cognitive Functions in Young Adults. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17). <https://doi.org/10.3390/IJERPH191710608>
- Delic, V., Beck, K. D., Pang, K. C. H., & Citron, B. A. (2020). Biological links between traumatic brain injury and Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/S40478-020-00924-7>
- Delmonico, R. L., Theodore, B. R., Sandel, M. E., Armstrong, M. A., & Camicia, M. (2021). Prevalence of depression and anxiety disorders following mild traumatic brain injury. *PM & R: The Journal of Injury, Function, and Rehabilitation*. <https://doi.org/10.1002/PMRJ.12657>
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 11(5), 339–350. <https://doi.org/10.1038/nrn2822>
- Deshpande, A., Bergami, M., Ghanem, A., Conzelmann, K. K., Lepier, A., Götz, M., & Berninger, B. (2013). Retrograde monosynaptic tracing reveals the temporal evolution of inputs onto new neurons in the adult dentate gyrus and olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.1218991110>
- Dewan, M. C., Rattani, A., Gupta, S., Baticulon, R. E., Hung, Y. C., Punchak, M., Agrawal, A., Adeleye, A. O., Shrimel, M. G., Rubiano, A. M., Rosenfeld, J. V., & Park, K. B. (2019). Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*, 130(4). <https://doi.org/10.3171/2017.10.JNS17352>
- 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>
- Ding, Y. H., Ding, Y., Li, J., Bessert, D. A., & Rafols, J. A. (2006). Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model. *Neurological Research*, 28(2), 184–189. <https://doi.org/10.1179/016164106X98053>
- Dixon, C. E., Lyeth, B. G., Povlishock, J. T., Findling, R. L., Hamm, R. J., Marmarou, A., Young, H. F., & Hayes, R. L. (1987). A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *Journal of Neurosurgery*, 67(1), 110–119. <https://doi.org/10.3171/jns.1987.67.1.0110>
- Donat, C. K., Scott, G., Gentleman, S. M., & Sastre, M. (2017). Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00208>

- Donkin, J. J., Cernak, I., Blumbergs, P. C., & Vink, R. (2011). A substance P antagonist reduces axonal injury and improves neurologic outcome when administered up to 12 hours after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 28(2), 217–224. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1632>
- Duan, W., Zhang, Y. P., Hou, Z., Huang, C., Zhu, H., Zhang, C. Q., & Yin, Q. (2016). Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. In *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1637–1647. Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9122-5>
- Dixon, C. E., Clifton, G. L., Lighthall, J. W., Yaghmai, A. A., & Hayes, R. L. (1991). A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 39(3), 253–262. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90104-8](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90104-8)
- Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C. J., & Palmer, T. D. (2003). VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 18(10), 2803–2812. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.03041.x>
- Fahy, F. L., Riches, I. P., & Brown, M. W. (1993). Neuronal activity related to visual recognition memory: long-term memory and the encoding of recency and familiarity information in the primate anterior and medial inferior temporal and rhinal cortex. *Experimental Brain Research*, 96(3), 457–472. <https://doi.org/10.1007/BF00234113>
- Fan, Y. Y., & Huo, J. (2021). A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochemistry International*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105080>
- Feeney, D. M., Boyeson, M. G., Linn, R. T., Murray, H. M., & Dail, W. G. (1981). Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Research*, 211(1), 67–77. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90067-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90067-6)
- Fernandes, J., Arida, R. M., & Gomez-Pinilla, F. (2017). Physical exercise as an epigenetic modulator of brain plasticity and cognition. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.06.012>
- da Silva Fiorin, F., de Oliveira Ferreira, A. P., Ribeiro, L. R., Silva, L. F., de Castro, M. R., da Silva, L. R., da Silveira, M. E., Jr, Zemolin, A. P., Dobrachinski, F., Marchesan de Oliveira, S., Franco, J. L., Soares, F. A., Furian, A. F., Oliveira, M. S., Figuera, M. R., & Freire Royes, L. F. (2016). The Impact of Previous Physical Training on Redox Signaling after Traumatic Brain Injury in Rats: A Behavioral and Neurochemical Approach. *Journal of neurotrauma*, 33(14), 1317–1330. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4068>
- Fordyce, D. E., & Wehner, J. M. (1993). Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Research*, 619(1–2), 111–119. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91602-O](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91602-O)

- 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>
- Gardner, J., & Zafonte, R. (2016). Neuroepidemiology of traumatic brain injury. *Handbook of Clinical Neurology*, 138, 207–223. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802973-2.00012-4>
- Ge, S., Goh, E. L., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G. L., & Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439(7076), 589–593. <https://doi.org/10.1038/nature04404>
- Glushakov, A. O., Glushakova, O. Y., Korol, T. Y., Acosta, S. A., Borlongan, C. V., Valadka, A. B., Hayes, R. L., & Glushakov, A. V. (2018). Chronic Upregulation of Cleaved-Caspase-3 Associated with Chronic Myelin Pathology and Microvascular Reorganization in the Thalamus after Traumatic Brain Injury in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS19103151>
- Goldkuhl, R., Jacobsen, K. R., Kalliokoski, O., Hau, J., & Abelson, K. S. P. (2010). Plasma concentrations of corticosterone and buprenorphine in rats subjected to jugular vein catheterization. *Laboratory Animals*, 44(4), 337–343. <https://doi.org/10.1258/la.2010.009115>
- Gómez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R. R., Molteni, R., & Reggie Edgerton, V. (2002). Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *Journal of Neurophysiology*, 88(5), 2187–2195. <https://doi.org/10.1152/jn.00152.2002>
- Gonçalves, J. T., Bloyd, C. W., Shtrahman, M., Johnston, S. T., Schafer, S. T., Parylak, S. L., Tran, T., Chang, T., & Gage, F. H. (2016). In vivo imaging of dendritic pruning in dentate granule cells. *Nature Neuroscience*, 19(6), 788–791. <https://doi.org/10.1038/nn.4301>
- Gordon, W. A., Sliwinski, M., Echo, J., McLoughlin, M., Sheerer, M., & Meili, T. E. (1998). The benefits of exercise in individuals with traumatic brain injury: A retrospective study. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 13(4), 58–67. <https://doi.org/10.1097/00001199-199808000-00006>
- Gorgoraptis, N., Zaw-Linn, J., Feeney, C., Tenorio-Jimenez, C., Niemi, M., Malik, A., Ham, T., Goldstone, A. P., & Sharp, D. J. (2019). Cognitive impairment and health-related quality of life following traumatic brain injury. *NeuroRehabilitation*, 44(3), 321–331. <https://doi.org/10.3233/NRE-182618>
- Grealy, M. A., Johnson, D. A., & Rushton, S. K. (1999). Improving cognitive function after brain injury: the use of exercise and virtual reality. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 80(6), 661–667. [https://doi.org/10.1016/S0003-9993\(99\)90169-7](https://doi.org/10.1016/S0003-9993(99)90169-7)
- Greenberg, M. E., Xu, B., Lu, B., & Hempstead, B. L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: Implications in CNS function. *Journal of Neuroscience*, 29(41), 12764–12767. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3566-09.2009>

- Griesbach, G. S. (2011). Exercise after traumatic brain injury: is it a double-edged sword? *PM & R: The Journal of Injury, Function, and Rehabilitation*, 3(6 Suppl 1). <https://doi.org/10.1016/J.PMRJ.2011.02.008>
- 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., & Gomez-Pinilla, F. (2009). Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. *Brain Research*, 1288, 105–115. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2009.06.045>
- Griesbach, G. S., Tio, D. L., Nair, S., & Hovda, D. A. (2014). Recovery of stress response coincides with responsiveness to voluntary exercise after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 31(7), 674–682. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3151>
- 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>
- Griffin, É. W., Mullally, S., Foley, C., Warmington, S. A., O'Mara, S. M., & Kelly, Á. M. (2011). Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. *Physiology & Behavior*, 104(5), 934–941. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2011.06.005>
- Gustafsson, T., & Kraus, W. E. (2001). Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Frontiers in Bioscience*, 6(1), d75-89. <https://doi.org/10.2741/gustafss>
- Gu, Y. li, Zhang, L. wei, Ma, N., Ye, L. lin, Wang, D. xin, & Gao, X. (2014). Cognitive improvement of mice induced by exercise prior to traumatic brain injury is associated with cytochrome c oxidase. *Neuroscience Letters*, 570, 86–91. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2014.04.004>
- Håkansson, K., Ledreux, A., Daffner, K., Terjestam, Y., Bergman, P., Carlsson, R., Kivipelto, M., Winblad, B., Granholm, A. C., & Mohammed, A. K. H. (2017). BDNF Responses in Healthy Older Persons to 35 Minutes of Physical Exercise, Cognitive Training, and Mindfulness: Associations with Working Memory Function. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(2), 645–657. <https://doi.org/10.3233/JAD-160593>
- Hamilton, G. F., & Rhodes, J. S. (2015). Exercise Regulation of Cognitive Function and Neuroplasticity in the Healthy and Diseased Brain. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 135, 381–406. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.004>

- 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>
- Hanyu, O., Yamatani, K., Ikarashi, T., Soda, S., Maruyama, S., Kamimura, T., Kaneko, S., Hirayama, S., Suzuki, K., Nakagawa, O., Nawa, H., & Aizawa, Y. (2003). Brain-derived neurotrophic factor modulates glucagon secretion from pancreatic alpha cells: Its contribution to glucose metabolism. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 5(1), 27–37. <https://doi.org/10.1046/j.1463-1326.2003.00238.x>
- Hara, M., Kobayakawa, K., Ohkawa, Y., Kumamaru, H., Yokota, K., Saito, T., Kijima, K., Yoshizaki, S., Harimaya, K., Nakashima, Y., & Okada, S. (2017). Interaction of reactive astrocytes with type i collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nature Medicine*, 23(7), 818–828. <https://doi.org/10.1038/nm.4354>
- Harris, N. G., Verley, D. R., Gutman, B. A., & Sutton, R. L. (2016). Bi-directional changes in fractional anisotropy after experiment TBI: Disorganization and reorganization? *NeuroImage*, 133, 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.03.012>
- He, Z., Wang, X., Wu, Y., Jia, J., Hu, Y., Yang, X., Li, J., Fan, M., Zhang, L., Guo, J., & Leung, M. C. (2014). Treadmill pre-training ameliorates brain edema in ischemic stroke via down-regulation of aquaporin-4: An MRI study in rats. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084602>
- Hicks, R. R., Brown, R., & Scheff, S. W. (1998). Effects of Exercise Following Lateral Fluid Percussion Brain Injury in Rats. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 12, 41–46. <https://www.researchgate.net/publication/10826347>
- Hicks, R., Soares, H., Smith, D., & McIntosh, T. (1996). Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neuropathologica*, 91(3), 236–246. <https://doi.org/10.1007/s004010050421>
- Holden, S. S., Grandi, F. C., Aboubakr, O., Higashikubo, B., Cho, F. S., Chang, A. H., Forero, A. O., Morningstar, A. R., Mathur, V., Kuhn, L. J., Suri, P., Sankaranarayanan, S., Andrews-Zwilling, Y., Tenner, A. J., Luthi, A., Aronica, E., Corces, R., Yednock, T., & Paz, J. T. (2021). Complement factor C1q mediates sleep spindle loss and epileptic spikes after mild brain injury. *Science*, 372, 1217. <https://doi.org/10.1126/science.abj2685>
- Holzschneider, K., Wolbers, T., Röder, B., & Hötting, K. (2012). Cardiovascular fitness modulates brain activation associated with spatial learning. *NeuroImage*, 59(3), 3003–3014. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.10.021>
- Hopkins, M. E., & Bucci, D. J. (2010). BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(2), 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.06.006>

- Hopkins, M. E., Davis, F. C., VanTieghem, M. R., Whalen, P. J., & Bucci, D. J. (2012). Differential effects of acute and regular physical exercise on cognition and affect. *Neuroscience*, 215, 59–68. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.04.056>
- 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>
- Hötting, K., Reich, B., Holzschneider, K., Kauschke, K., Schmidt, T., Reer, R., Braumann, K. M., & Röder, B. (2012). Differential cognitive effects of cycling versus stretching/coordination training in middle-aged adults. *Health Psychology: Official Journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association*, 31(2), 145–155. <https://doi.org/10.1037/A0025371>
- Imhoff, S., Fait, P., Carrier-Toutant, F., & Boulard, G. (2016). Efficiency of an Active Rehabilitation Intervention in a Slow-to-Recover Paediatric Population following Mild Traumatic Brain Injury: A Pilot Study. *Journal of Sports Medicine (Hindawi Publishing Corporation)*, 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/5127374>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128720>
- Itoh, T., Imano, M., Nishida, S., Tsubaki, M., Hashimoto, S., Ito, A., & Satou, T. (2011). Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves cerebral function following rat traumatic brain injury. *Journal of Neural Transmission*, 118(9), 1263–1272. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0629-2>
- 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>
- Jarrah, A., Braun, M., Ahluwalia, M., Gupta, R. V, Wilson, M., Munie, S., Ahluwalia, P., Vender, J. R., Vale, F. L., Dhandapani, K. M., & Vaibhav, K. (2020). Revisiting traumatic brain injury: From molecular mechanisms to therapeutic interventions. In *Biomedicines*, 8(10), 1–42. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100389>
- Kamijo, K., & Takeda, Y. (2009). General physical activity levels influence positive and negative priming effects in young adults. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 120(3), 511–519. <https://doi.org/10.1016/J.CLINPH.2008.11.022>

- Kamijo, K., & Takeda, Y. (2010). Regular physical activity improves executive function during task switching in young adults. *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 75(3), 304–311. <https://doi.org/10.1016/J.IJPSYCHO.2010.01.002>
- Karelina, K., Schneiderman, K., Shah, S., Fitzgerald, J., Crruz Velazquez, R., Oliverio, R., Whitehead, B., Yang, J., & Weil, Z. (2021). Moderate Intensity Treadmill Exercise Increases Survival of Newborn Hippocampal Neurons and Improves Neurobehavioral Outcomes after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 38(13), 1858–1869. <https://doi.org/10.1089/NEU.2020.7389>
- Karve, I. P., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British Journal of Pharmacology*, 173(4). <https://doi.org/10.1111/bph.13125>
- Katsimpardi, L., Litterman, N. K., Schein, P. A., Miller, C. M., Loffredo, F. S., Wojtkiewicz, G. R., Chen, J. W., Lee, R. T., Wagers, A. J., & Rubin, L. L. (2014). Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science*, 344(6184), 630–634. <https://doi.org/10.1126/science.1251141>
- 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>
- Kelley, B. J., Lifshitz, J., & Povlishock, J. T. (2007). Neuroinflammatory responses after experimental diffuse traumatic brain injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(11), 989–1001. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181588245>
- Kennard, J. A., & Woodruff-Pak, D. S. (2012). A comparison of low- and high-impact forced exercise: effects of training paradigm on learning and memory. *Physiology & Behavior*, 106(4), 423–427. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2012.02.023>
- Khabour, O. F., Alzoubi, K. H., Alomari, M. A., & Alzubi, M. A. (2010). Changes in spatial memory and BDNF expression to concurrent dietary restriction and voluntary exercise. *Hippocampus*, 20(5), 637–645. <https://doi.org/10.1002/hipo.20657>
- Khabour, O. F., Alzoubi, K. H., Alomari, M. A., & Alzubi, M. A. (2013). Changes in spatial memory and BDNF expression to simultaneous dietary restriction and forced exercise. *Brain Research Bulletin*, 90(1), 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.08.005>
- Kim, D. H., Ko, I. G., Kim, B. K., Kim, T. W., Kim, S. E., Shin, M. S., Kim, C. J., Kim, H., Kim, K. M., & Baek, S. S. (2010). Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury-induced hippocampal apoptosis. *Physiology & Behavior*, 101(5), 660–665. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2010.09.021>
- Kim, T. A., Chen, L., & Ge, S. (2021). The interplay of neurovasculature and adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscience Letters*, 760. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136071>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology: CB*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.10.049>

- Koh, J. Y., Gwag, B. J., Lobner, D., & Choi, D. W. (1995). Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science*, 268(5210), 573–575. <https://doi.org/10.1126/science.7725105>
- 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 leaning ability through suppressing CREP/BDNF/TrkB signaling pathway following traumatic brain injury in rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 14(3). <https://doi.org/10.12965/jer.1836248.124>
- Kondo, M., Nakamura, Y., Ishida, Y., & Shimada, S. (2015). The 5-HT3 receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects. *Molecular Psychiatry*, 20(11), 1428–1437. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.153>
- Kopczynski, A., Carteri, R. B., Rodolphi, M. S., Oses, J. P., Portela, L. O., Geller, C. A., de Oliveira, V. G., De Bastiani, M. A., Strogulski, N. R., Smith, D. H., & Portela, L. V. (2023). Lower and higher volumes of physical exercise build up brain reserves against memory deficits triggered by a head injury in mice. *Experimental Neurology*, 363, 114352. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2023.114352>
- 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>
- Koyama, R., Yamada, M. K., Fujisawa, S., Katoh-Semba, R., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 24(33), 7215–7224. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2045-04.2004>
- Krishna, G., Agrawal, R., Zhuang, Y., Ying, Z., Paydar, A., Harris, N. G., Royes, L. F. F., & 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, D. T. (2016). Cellular and Molecular Mechanisms of Secondary Neuronal Injury following Traumatic Brain Injury. *Translational Research in Traumatic Brain Injury*, 97–126. <https://doi.org/10.1201/b18959-10>
- Ladak, A. A., Enam, S. A., & Ibrahim, M. T. (2019). A Review of the Molecular Mechanisms of Traumatic Brain Injury. In *World Neurosurgery* (Vol. 131, pp. 126–132). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.07.039>
- Lafenêtre, P., Leske, O., Ma-Högemeie, Z., Haghikia, A., Bichler, Z., Wahle, P., & Heumann, R. (2010). Exercise can rescue recognition memory impairment in a model with reduced adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.034.2009>

- 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>
- Lamade, A. M., Anthonymuthu, T. S., Hier, Z. E., Gao, Y., Kagan, V. E., & Bayir, H. (2020). Mitochondrial damage & lipid signaling in traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 329. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2020.113307>
- Landini, G. (2006-2020). Background illumination correction. Available at: <https://blog.bham.ac.uk/intellimic/background-illumination-correction>
- 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>
- Lee, Y. S. han C., Ashman, T., Shang, A., & Suzuki, W. (2014). Brief report: Effects of exercise and self-affirmation intervention after traumatic brain injury. *NeuroRehabilitation*, 35(1), 57–65. <https://doi.org/10.3233/NRE-141100>
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Lighthall, J. W. (1988). Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *Journal of Neurotrauma*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1089/NEU.1988.5.1>
- Liu, P. Z., & Nusslock, R. (2018). Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 52. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00052>
- Liu, Y. F., Chen, H. I., Wu, C. L., Kuo, Y. M., Yu, L., Huang, A. M., Wu, F. Sen, Chuang, J. I., & 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>
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.1155/2016/9151490>

- Maas, A. I. R., Menon, D. K., David Adelson, P. D., Andelic, N., Bell, M. J., Belli, A., Bragge, P., Brazinova, A., Büki, A., Chesnut, R. M., Citerio, G., Coburn, M., Jamie Cooper, D., Tamara Crowder, A., Czeiter, E., Czosnyka, M., Diaz-Arrastia, R., Dreier, J. P., Duhaime, A. C., ... Zemek, R. (2017). Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *The Lancet. Neurology*, 16(12), 987–1048. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30371-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30371-X)
- Maass, A., Düzel, S., Brigadski, T., Goerke, M., Becke, A., Sobieray, U., Neumann, K., Lövdén, M., Lindenberger, U., Bäckman, L., Braun-Dullaeus, R., Ahrens, D., Heinze, H. J., Müller, N. G., Lessmann, V., Sendtner, M., & Düzel, E. (2016). Relationships of peripheral IGF-1, VEGF and BDNF levels to exercise-related changes in memory, hippocampal perfusion and volumes in older adults. *NeuroImage*, 131, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.10.084>
- 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>
- 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>
- Marmarou, A., Abd-Elfattah Foda, M. A., Van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., & Demetriadou, K. (1994). A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *Journal of Neurosurgery*, 80(2), 291–300. <https://doi.org/10.3171/JNS.1994.80.2.0291>
- Martínez-Drudis, L., Amorós-Aguilar, L., Torras-Garcia, M., Serra-Elias, B., Costa-Miserachs, D., Portell-Cortés, I., & Coll-Andreu, M. (2021). Delayed voluntary physical exercise restores “when” and “where” object recognition memory after traumatic brain injury. *Behavioural Brain Research*, 400. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.113048>
- Masley, S., Roetzheim, R., & Gualtieri, T. (2009). Aerobic exercise enhances cognitive flexibility. *Journal of Clinical Psychology in Medical Settings*, 16(2), 186–193. <https://doi.org/10.1007/s10880-009-9159-6>
- Matsuura, H., Ohnishi, M., Yoshioka, Y., Togami, Y., Hosomi, S., Umemura, Y., Ebihara, T., Shimizu, K., Ogura, H., & Shimazu, T. (2021). *Original experimental rat model of blast-induced mild traumatic brain injury: a pilot study*. <https://doi.org/10.1080/02699052.2020.1861653>
- Ma, X., Aravind, A., Pfister, B. J., Chandra, N., & Haorah, J. (2019). Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Molecular Neurobiology*, 56(8). <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1454-5>

- Maxeiner, S., Glassmann, A., Kao, H. T., & Schilling, K. (2014). The molecular basis of the specificity and cross-reactivity of the NeuN epitope of the neuron-specific splicing regulator, Rbfox3. *Histochemistry and Cell Biology*, 141(1), 43–55. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1159-9>
- McGinn, M. J., & Povlishock, J. T. (2016). Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Neurosurgery Clinics of North America*, 27(4), 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2016.06.002>
- Meldolesi, J. (2017). Neurotrophin receptors in the pathogenesis, diagnosis and therapy of neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, 121, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.04.024>
- Menon, D. K., Schwab, K., Wright, D. W., & Maas, A. I. (2010). Position statement: Definition of traumatic brain injury. In *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 91(11), 1637–1640. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2010.05.017>
- Michinaga, S., & Koyama, Y. (2021). Pathophysiological Responses and Roles of Astrocytes in Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/IJMS22126418>
- 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>
- Molteni, R., Wu, A., Vaynman, S., Ying, Z., Barnard, R. J., & Gómez-Pinilla, F. (2004). Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*, 123(2), 429–440. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.020>
- 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 (Bethesda, Md.: 1985)*, 58(5), 1553–1557. <https://doi.org/10.1152/JAPPL.1985.58.5.1553>
- Morales, D. M., Marklund, N., Lebold, D., Thompson, H. J., Pitkanen, A., Maxwell, W. L., Longhi, L., Laurer, H., Maegele, M., Neugebauer, E., Graham, D. I., Stocchetti, N., & McIntosh, T. K. (2005). Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience*, 136(4), 971–989. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.08.030>
- Morici, J. F., Bekinschtein, P., & Weisstaub, N. V. (2015). Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behavioural Brain Research*, 292, 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.030>
- Morris, T., Osman, J. G., Muñoz, J. M. T., Costa-Miserachs, D., & Leone, A. P. (2016). The role of physical exercise in cognitive recovery after traumatic brain injury: A systematic review. In *Restorative Neurology and Neuroscience*, 34(6), 977–988. Restor Neurol Neurosci. <https://doi.org/10.3233/RNN-160687>

- Morris, T. P., Tormos Muñoz, J. M., Cattaneo, G., Solana-Sánchez, J., Bartrés-Faz, D., & Pascual-Leone, A. (2019). Traumatic brain injury modifies the relationship between physical activity and global and cognitive health: Results from the barcelona brain health initiative. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00135>
- Moses, S. N., Cole, C., & Ryan, J. D. (2005). Relational memory for object identity and spatial location in rats with lesions of perirhinal cortex, amygdala and hippocampus. *Brain Research Bulletin*, 65(6), 501–512. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.02.029>
- 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., Ayala, D., Baker, T., Heard, J., & Masel, B. (2007). Aerobic capacity after traumatic brain injury: comparison with a nondisabled cohort. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 88(3), 315–320. <https://doi.org/10.1016/J.APMR.2006.12.006>
- Mota, B. C., Pereira, L., Souza, M. A., Silva, L. F. A., Magni, D. V., Ferreira, A. P. O., Oliveira, M. S., Furian, A. F., Mazzardo-Martins, L., Silva, M. D. Da, Santos, A. R. S., Ferreira, J., Figuera, M. R., & Royes, L. F. F. (2012). Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. *Neurotoxicity Research*, 21(2), 175–184. <https://doi.org/10.1007/S12640-011-9257-8>
- Mousavi, K., Parry, D. J., & Jasmin, B. J. (2004). BDNF rescues myosin heavy chain IIB muscle fibers after neonatal nerve injury. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 287(1 56-1). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00583.2003>
- 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. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2017.00101>
- Mustafa, A. G., Singh, I. N., Wang, J., Carrico, K. M., & Hall, E. D. (2010). Mitochondrial protection after traumatic brain injury by scavenging lipid peroxyl radicals. *Journal of Neurochemistry*, 114(1), 271–280. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06749.x>
- Myer, D. J., Gurkoff, G. G., Lee, S. M., Hovda, D. A., & Sofroniew, M. V. (2006). Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain: A Journal of Neurology*, 129(Pt 10), 2761–2772. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWL165>
- Najem, D., Rennie, K., Ribocco-Lutkiewicz, M., Ly, D., Haukenfrers, J., Liu, Q., Nzau, M., Fraser, D. D., & Bani-Yaghoub, M. (2018). Traumatic brain injury: Classification, models, and markers. *Biochemistry and Cell Biology*, 96(4), 391–406. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0160>

- Nakagawa, T., Tsuchida, A., Itakura, Y., Nonomura, T., Ono, M., Hirota, F., Inoue, T., Nakayama, C., Taiji, M., & Noguchi, H. (2000). Brain-derived neurotrophic factor regulates glucose metabolism by modulating energy balance in diabetic mice. *Diabetes*, 49(3), 436–444. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.3.436>
- Neel, J. V. (1999). Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? 1962. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(8). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10516792/>
- Neeper, S. A., Góaucomez-Pinilla, F., Choi, J., & Cotman, C. (1995). Exercise and brain neurotrophins. *Nature*, 373(6510), 109. <https://doi.org/10.1038/373109A0>
- Nelson, M. E., Rejeski, W. J., Blair, S. N., Duncan, P. W., Judge, J. O., King, A. C., Macera, C. A., & Castaneda-Sceppa, C. (2007). Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*, 116(9), 1094–1105. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.185650>
- Ng, S. Y., & Lee, A. Y. W. (2019). Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00528>
- Ni, H., Li, C., Feng, X., & Cen, J. N. (2011). Effects of forced running exercise on cognitive function and its relation to zinc homeostasis-related gene expression in rat hippocampus. *Biological Trace Element Research*, 142(3), 704–712. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8793-z>
- Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E., & Godbout, J. P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, 64(2), 300–316. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22930>
- Nortje, J., & Menon, D. K. (2004). Traumatic brain injury: Physiology, mechanisms, and outcome. *Current Opinion in Neurology*, 17(6), 711–718. <https://doi.org/10.1097/00019052-200412000-00011>
- O'Connor, W. T., Smyth, A., & Gilchrist, M. D. (2011). Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Pharmacology and Therapeutics*, 130(2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.001>
- O'Leary, R. A., & Nichol, A. D. (2018). Pathophysiology of severe traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgical Sciences*, 62(5), 542–548. <https://doi.org/10.23736/S0390-5616.18.04501-0>
- Olsen, R. K., Moses, S. N., Riggs, L., & Ryan, J. D. (2012). The hippocampus supports multiple cognitive processes through relational binding and comparison. *Frontiers in Human Neuroscience*, 6(MAY 2012), 1–13. <https://doi.org/10.3389/FNHUM.2012.00146>

- O'Shea, T. M., Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2017). Cell biology of spinal cord injury and repair. In *Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3259–3270. <https://doi.org/10.1172/JCI90608>
- Osier, N. D., & Dixon, C. E. (2016). The controlled cortical impact model: Applications, considerations for researchers, and future directions. In *Frontiers in Neurology*, 7, 134. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00134>
- Otsuka, S., Sakakima, H., Tani, A., Nakanishi, K., Takada, S., Norimatsu, K., Maejima, H., & Maruyama, I. (2021). Effects of detraining on preconditioning exercise-induced neuroprotective potential after ischemic stroke in rats. *Brain Structure and Function*, 226(7), 2169–2180. <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02317-5>
- Otsuka, S., Sakakima, H., Terashi, T., Takada, S., Nakanishi, K., & Kikuchi, K. (2019). Preconditioning exercise reduces brain damage and neuronal apoptosis through enhanced endogenous 14-3-3 γ after focal brain ischemia in rats. *Brain Structure & Function*, 224(2), 727–738. <https://doi.org/10.1007/S00429-018-1800-4>
- Pallotto, M., & Deprez, F. (2014). Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: Signaling beyond GABAA-receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00166>
- Park, H., & Poo, M. M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), 7–23. <https://doi.org/10.1038/nrn3379>
- Pavlovic, D., Pekic, S., Stojanovic, M., & Popovic, V. (2019). Traumatic brain injury: neuropathological, neurocognitive and neurobehavioral sequelae. *Pituitary*, 22(3). <https://doi.org/10.1007/S11102-019-00957-9>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). San Diego, CA: Academic Press.
- Pedersen, B. K., & Saltin, B. (2015). Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 25 Suppl 3, 1–72. <https://doi.org/10.1111/SMS.12581>
- 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. In *Neuroimaging Clinics of North America*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2017.09.010>
- Piao, C. S., Stoica, B. A., Wu, J., Sabirzhanov, B., Zhao, Z., Cabatbat, R., Loane, D. J., & 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>

- Pischiutta, F., Micotti, E., Hay, J. R., Marongiu, I., Sammali, E., Tolomeo, D., Vegliante, G., Stocchetti, N., Forloni, G., De Simoni, M. G., Stewart, W., & Zanier, E. R. (2018). Single severe traumatic brain injury produces progressive pathology with ongoing contralateral white matter damage one year after injury. *Experimental Neurology*, 300, 167–178. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2017.11.003>
- Ploughman, M. (2008). Exercise is brain food: the effects of physical activity on cognitive function. *Developmental Neurorehabilitation*, 11(3), 236–240. <https://doi.org/10.1080/17518420801997007>
- Ploughman, M., Austin, M. W., Glynn, L., & Corbett, D. (2014). The Effects of Poststroke Aerobic Exercise on Neuroplasticity: A Systematic Review of Animal and Clinical Studies. *Translational Stroke Research*, 6(1), 13–28. <https://doi.org/10.1007/s12975-014-0357-7>
- Povlishock, J. T., & Katz, D. I. (2005). Update of neuropathology and neurological recovery after traumatic brain injury. In *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 20, (1), 76–94. *J Head Trauma Rehabil.* <https://doi.org/10.1097/00001199-200501000-00008>
- Prehn, J. H. M. (1996). Marked diversity in the action of growth factors on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal degeneration. *European Journal of Pharmacology*, 306(1–3), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00225-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00225-7)
- Qi, Y., Wang, S., Luo, Y., Huang, W., Chen, L., Zhang, Y., Liang, X., Tang, J., Zhang, Y., Zhang, L., Chao, F., Gao, Y., Zhu, Y., & Tang, Y. (2020). Exercise-induced Nitric Oxide Contributes to Spatial Memory and Hippocampal Capillaries in Rats. *International Journal of Sports Medicine*, 41(13), 951–961. <https://doi.org/10.1055/a-1195-2737>
- Rafie, F., Khaksari, M., Amiresmaili, S., Soltani, Z., Pourranjbar, M., Shirazpour, S., & Jafari, E. (2022). Protective effects of early exercise on neuroinflammation, and neurotoxicity associated by traumatic brain injury: a behavioral and neurochemical approach. *The International Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1080/00207454.2022.2144294>
- Ramos-Cejudo, J., Wisniewski, T., Marmar, C., Zetterberg, H., Blennow, K., de Leon, M. J., & Fossati, S. (2018). Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease: The Cerebrovascular Link. *EBioMedicine*, 28, 21–30. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2018.01.021>
- Ramsden, M., Berchtold, N. C., Patrick Kesslak, J., Cotman, C. W., & Pike, C. J. (2003). Exercise increases the vulnerability of rat hippocampal neurons to kainate lesion. *Brain Research*, 971(2), 239–244. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02365-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02365-5)
- Ramsey, J., Driver, S., Swank, C., Bennett, M., & Dubiel, R. (2018). Physical activity intensity of patient's with traumatic brain injury during inpatient rehabilitation. *Brain Injury*, 32(12), 1518–1524. <https://doi.org/10.1080/02699052.2018.1500715>
- Ranganath, C., Yonelinas, A. P., Cohen, M. X., Dy, C. J., Tom, S. M., & D'Esposito, M. (2004). Dissociable correlates of recollection and familiarity within the medial temporal lobes. *Neuropsychologia*, 42(1), 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2003.07.006>

- Rasmussen, P., Brassard, P., Adser, H., Pedersen, M. V., Leick, L., Hart, E., Secher, N. H., Pedersen, B. K., & Pilegaard, H. (2009). Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Experimental Physiology*, 94(10), 1062–1069. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.048512>
- Reinholdsson, M., Abzhandadze, T., Palstam, A., & Sunnerhagen, K. S. (2022). A register-based study on associations between pre-stroke physical activity and cognition early after stroke (part of PAPSIGOT). *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09520-2>
- Riches, I. P., Wilson, F. A. W., & Brown, M. W. (1991). The effects of visual stimulation and memory on neurons of the hippocampal formation and the neighboring parahippocampal gyrus and inferior temporal cortex of the primate. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(6), 1763–1779. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-06-01763.1991>
- Riquelme, P. A., Drapeau, E., & Doetsch, F. (2008). Brain micro-ecologies: Neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1489), 123–137. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.2016>
- Risling, M., Smith, D., Stein, T. D., Thelin, E. P., Zanier, E. R., Ankarcrona, M., & Nilsson, P. (2019). Modelling human pathology of traumatic brain injury in animal models. *Journal of Internal Medicine*, 285(6), 594–607. <https://doi.org/10.1111/joim.12909>
- Rogge, A. K., Röder, B., Zech, A., Nagel, V., Hollander, K., Braumann, K. M., & Hötting, K. (2017). Balance training improves memory and spatial cognition in healthy adults. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06071-9>
- Rolls, E. T., Franco, L., & Stringer, S. M. (2005). The perirhinal cortex and long-term familiarity memory. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B: Comparative and Physiological Psychology*, 58(3–4), 234–245. <https://doi.org/10.1080/02724990444000122>
- Rueda, C. B., Llorente-Folch, I., Traba, J., Amigo, I., Gonzalez-Sanchez, P., Contreras, L., Juaristi, I., Martinez-Valero, P., Pardo, B., del Arco, A., & Satrustegui, J. (2016). Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺-regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(8), 1158–1166. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2016.04.003>
- 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>
- Saatman, K. E., Duhaime, A. C., Bullock, R., Maas, A. I. R., Valadka, A., Manley, G. T., Brody, D., Contant, C., Dash, P., Diaz-Arrastia, R., Fertig, S., Gean, A., Goodman, C., Gordon, W., Hayes, R., Hicks, R., Langlois, J., Marmarou, A., Moore, D., ... Wright, D. (2008). Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *Journal of Neurotrauma*, 25(7), 719–738. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0586>

- Salehi, A., Zhang, J. H., & Obenaus, A. (2017). Response of the cerebral vasculature following traumatic brain injury. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(7), 2320–2339). <https://doi.org/10.1177/0271678X17701460>
- Sampedro-Piquero, P., Zancada-Menendez, C., Begega, A., Mendez, M., & Arias, J. L. (2013). Effects of forced exercise on spatial memory and cytochrome c oxidase activity in aged rats. *Brain Research*, 1502, 20–29. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.12.036>
- Santos, M., Fernandes, S., Ordônio, T. F., Carvalho, G., Santos, J., Santos, L. E. R., Calazans, C. T., Gomes, D. A., & Santos, T. M. (2020). *Effects of Physical Exercise on Neuroplasticity and Brain Function: A Systematic Review in Human and Animal Studies*. <https://doi.org/10.1155/2020/8856621>
- Sauvage, M. M. (2010). ROC in animals: Uncovering the neural substrates of recollection and familiarity in episodic recognition memory. *Consciousness and Cognition*, 19(3), 816–828. <https://doi.org/10.1016/j.concog.2010.06.023>
- 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., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schweitzer, N. B., Alessio, H. M., Berry, S. D., Roeske, K., & Hagerman, A. E. (2006). Exercise-induced changes in cardiac gene expression and its relation to spatial maze performance. *Neurochemistry International*, 48(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2005.08.006>
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberté, J., Lazure, C., Chrétien, M., & Murphy, R. A. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *The Biochemical Journal*, 314 (Pt 3) (Pt 3), 951–960. <https://doi.org/10.1042/BJ3140951>
- Sekeres, M. J., Winocur, G., & Moscovitch, M. (2018). The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation. *Neuroscience Letters*, 680, 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.05.006>
- Sharma, B., Allison, D., Tucker, P., Mabbott, D., & Timmons, B. W. (2020). Cognitive and neural effects of exercise following traumatic brain injury: A systematic review of randomized and controlled clinical trials. *Brain Injury*, 34(2), 149–159. <https://doi.org/10.1080/02699052.2019.1683892>
- Shields, D. C., Haque, A., & Banik, N. L. (2020). Neuroinflammatory responses of microglia in central nervous system trauma. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 40(1_suppl), S25–S33). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/0271678X20965786>

- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078163>
- Simon, D. W., Aneja, R. K., Alexander, H., Bell, M. J., Baylr, H., Kochanek, P. M., & Clark, R. S. B. (2018). Minocycline Attenuates High Mobility Group Box 1 Translocation, Microglial Activation, and Thalamic Neurodegeneration after Traumatic Brain Injury in Post-Natal Day 17 Rats. *Journal of Neurotrauma*, 35(1), 130–138. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5093>
- Sinaei, M., Alaei, H., Nazem, F., Kargarfard, M., Feizi, A., Talebi, A., Esmaeili, A., Nobari, H., & Pérez-Gómez, J. (2021). Endurance exercise improves avoidance learning and spatial memory, through changes in genes of GABA and relaxin-3, in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 566, 204–210. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2021.05.080>
- Smith, P. J., Blumenthal, J. A., Hoffman, B. M., Cooper, H., Strauman, T. A., Welsh-Bohmer, K., Browndyke, J. N., & Sherwood, A. (2010). Aerobic exercise and neurocognitive performance: A meta-analytic review of randomized controlled trials. *Psychosomatic Medicine*, 72(3), 239–252. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181d14633>
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(5), 249–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3898>
- 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>
- Soltani, N., Soltani, Z., Khaksari, M., Ebrahimi, G., Hajmohammadi, M., & Iranpour, M. (2020). The Changes of Brain Edema and Neurological Outcome, and the Probable Mechanisms in Diffuse Traumatic Brain Injury Induced in Rats with the History of Exercise. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 40(4), 555–567. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00753-w>
- Soustiel, J. F., Glenn, T. C., Shik, V., Boscardin, J., Mahamid, E., & Zaaroor, M. (2005). Monitoring of cerebral blood flow and metabolism in traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 22(9), 955–965. <https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.955>
- Spain, A., Dumas, S., Lifshitz, J., Rhodes, J., Andrews, P. J. D., Horsburgh, K., & Fowler, J. H. (2010). Mild fluid percussion injury in mice produces evolving selective axonal pathology and cognitive deficits relevant to human brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 27(8), 1429–1438. <https://doi.org/10.1089/NEU.2010.1288>
- Speisman, R. B., Kumar, A., Rani, A., Foster, T. C., & Ormerod, B. K. (2013). Daily exercise improves memory, stimulates hippocampal neurogenesis and modulates immune and neuroimmune cytokines in aging rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 28, 25–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.09.013>

- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K. A., & Gage, F. H. H. (2007). In Vivo Fate Analysis Reveals the Multipotent and Self-Renewal Capacities of Sox2+ Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell*, 1(5), 515–528. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.09.002>
- Suzuki, W. A., & Naya, Y. (2014). The perirhinal cortex. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 37, pp. 39–53). <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014207>
- Taguchi, S., Choudhury, M. E., Miyanishi, K., Nakanishi, Y., Kameda, K., Abe, N., Yano, H., Yorozya, T., & Tanaka, J. (2019). Aggravating effects of treadmill exercises during the early-onset period in a rat traumatic brain injury model: When should rehabilitation exercises be initiated? *IBRO Reports*, 7, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.10.002>
- Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T., Sekino, Y., & Sato, K. (2012). L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: The “collusion” hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-275>
- Tang, Y. P., Noda, Y., Hasegawa, T., & Nabeshima, T. (1997). A concussive-like brain injury model in mice (II): selective neuronal loss in the cortex and hippocampus. *Journal of Neurotrauma*, 14(11), 863–874. <https://doi.org/10.1089/NEU.1997.14.863>
- Tanimizu, T., Kono, K., & Kida, S. (2018). Brain networks activated to form object recognition memory. *Brain Research Bulletin*, 141(April), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.05.017>
- Taylor, C. A., Bell, J. M., Breiding, M. J., & Xu, L. (2017). Traumatic brain injury-related emergency department visits, hospitalizations, and deaths - United States, 2007 and 2013. *MMWR Surveillance Summaries*, 66(9). <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6609a1>
- Taylor, J. M., Montgomery, M. H., Gregory, E. J., & Berman, N. E. J. (2015). Exercise preconditioning improves traumatic brain injury outcomes. *Brain Research*, 1622, 414–429. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.009>
- Teasdale, G., & Jennett, B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet (London, England)*, 2(7872), 81–84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(74\)91639-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(74)91639-0)
- Terashi, T., Otsuka, S., Takada, S., Nakanishi, K., Ueda, K., Sumizono, M., Kikuchi, K., & Sakakima, H. (2019). Neuroprotective effects of different frequency preconditioning exercise on neuronal apoptosis after focal brain ischemia in rats. *Neurological Research*, 41(6), 510–518. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1580458>
- The jamovi project (2022). *jamovi* (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

- Thome, A., Erickson, C. A., Lipa, P., & Barnes, C. A. (2012). Differential effects of experience on tuning properties of macaque MTL neurons in a passive viewing task. *Hippocampus*, 22(10), 2000–2011. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22070>
- Thompson, H. J., Lifshitz, J., Marklund, N., Grady, M. S., Graham, D. I., Hovda, D. A., & McIntosh, T. K. (2005). Lateral fluid percussion brain injury: A 15-year review and evaluation. *Journal of Neurotrauma*, 22(1), 42–75. <https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.42>
- Toda, T., & Gage, F. H. (2018). Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. In *Cell and Tissue Research*, 373(3). <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2735-4>
- Trejo, J. L., Carro, E., & Torres-Alemán, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(5), 1628–1634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-05-01628.2001>
- Tsuchida, A., Nakagawa, T., Itakura, Y., Ichihara, J., Ogawa, W., Kasuga, M., Taiji, M., & Noguchi, H. (2001). The effects of brain-derived neurotrophic factor on insulin signal transduction in the liver of diabetic mice. *Diabetologia*, 44(5), 555–566. <https://doi.org/10.1007/s001250051661>
- Tsukamoto, H., Suga, T., Takenaka, S., Tanaka, D., Takeuchi, T., Hamaoka, T., Isaka, T., & Hashimoto, T. (2016). Greater impact of acute high-intensity interval exercise on post-exercise executive function compared to moderate-intensity continuous exercise. *Physiology & Behavior*, 155, 224–230. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2015.12.021>
- Tunca, U., Saygin, M., Ozmen, O., Aslankoc, R., & Yalcin, A. (2021). The impact of moderate-intensity swimming exercise on learning and memory in aged rats: The role of Sirtuin-1. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(10), 1413–1420. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2021.58145.12920>
- Turtzo, L. C., Budde, M. D., Gold, E. M., Lewis, B. K., Janes, L., Yarnell, A., Grunberg, N. E., Watson, W., Frank, J. A., Turtzo, C., Frank, J., Budde, M., Gold, E., Lewis, B., & Watson, W. D. (2013). The Evolution of Traumatic Brain Injury in a Rat Focal Contusion Model. *NMR Biomed*, 26(4), 468–479. <https://doi.org/10.1002/nbm.2886>
- Tyler, W. J., & Pozzo-Miller, L. D. (2001). BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *Journal of Neuroscience*, 21(12), 4249–4258. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-12-04249.2001>
- Uysal, N., Tugyan, K., Kayatekin, B. M., Acikgoz, O., Bagriyanik, H. A., Gonenc, S., Ozdemir, D., Aksu, I., Topcu, A., & Semin, I. (2005). The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neuroscience Letters*, 383(3), 241–245. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2005.04.054>

- 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>
- Van Praag, H., Schinder, A. F., Christle, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875), 1030–1034. <https://doi.org/10.1038/4151030A>
- Vanzella, C., Neves, J. D., Vizuite, A. F., Aristimunha, D., Kolling, J., Longoni, A., Gonçalves, C. A. S., Wyse, A. T. S., & Netto, C. A. (2017). Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, 334, 78–85. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2017.07.034>
- Vanzella, C., Sanches, E. F., Odorcyk, F. K., Nicola, F., Kolling, J., Longoni, A., dos Santos, T. M., Wyse, A. T. de S., & Netto, C. A. (2017). Forced Treadmill Exercise Prevents Spatial Memory Deficits in Aged Rats Probably Through the Activation of Na⁺, K⁺-ATPase in the Hippocampus. *Neurochemical Research*, 42(5), 1422–1429. <https://doi.org/10.1007/S11064-017-2196-X>
- 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>
- Vedantam, A., Brennan, J., Levin, H. S., McCarthy, J. J., Dash, P. K., Redell, J. B., Yamal, J. M., & Robertson, C. S. (2021). Early versus Late Profiles of Inflammatory Cytokines after Mild Traumatic Brain Injury and Their Association with Neuropsychological Outcomes. *Journal of Neurotrauma*, 38(1), 53–62. <https://doi.org/10.1089/neu.2019.6979>
- Viano, D. C., Hamberger, A., Bolouri, H., & Säljö, A. (2012). Evaluation of three animal models for concussion and serious brain injury. *Annals of Biomedical Engineering*, 40(1), 213–226. <https://doi.org/10.1007/S10439-011-0386-2>
- Vivanco, C. E. (2019). *Reactividad microglial en el tálamo dorsal en un modelo animal de traumatismo craneoencefálico: comparación entre dos períodos post-lesión y efectos del ejercicio físico*. [Trabajo de fin de master no publicado]. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Vivar, C., Potter, M. C., Choi, J., Lee, J. Y., Stringer, T. P., Callaway, E. M., Gage, F. H., Suh, H., & Van Praag, H. (2012). Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nature Communications*, 3, 1107–1111. <https://doi.org/10.1038/ncomms2101>
- 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, H. C., Duan, Z. X., Wu, F. F., Xie, L., Zhang, H., & Ma, Y. Bin. (2010). A new rat model for diffuse axonal injury using a combination of linear acceleration and angular acceleration. *Journal of Neurotrauma*, 27(4), 707–719. <https://doi.org/10.1089/NEU.2009.1071>
- Wang, K., Cui, D., & Gao, L. (2016). Traumatic brain injury: A review of characteristics, molecular basis and management. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 21(5), 890–899. <https://doi.org/10.2741/4426>
- 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>
- Winter, B., Breitenstein, C., Mooren, F. C., Voelker, K., Fobker, M., Lechtermann, A., Krueger, K., Fromme, A., Korsukewitz, C., Floel, A., & Knecht, S. (2007). High impact running improves learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(4), 597–609. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.11.003>
- Winters, B. D., & Bussey, T. J. (2005). Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(1), 52–61. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3827-04.2005>
- Winters, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(5), 1055–1070. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2008.04.004>
- Witcher, K. G., Eiferman, D. S., & Godbout, J. P. (2015). Priming the Inflammatory Pump of the CNS after Traumatic Brain Injury. *Trends in Neurosciences*, 38(10), 609–620. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.08.002>
- Wrann, C. D., White, J. P., Salogiannis, J., Laznik-Bogoslavski, D., Wu, J., Ma, D., Lin, J. D., Greenberg, M. E., & 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>
- Yoon, K. J., & Kim, D. Y. (2018). Immediate effects of a single exercise on behavior and memory in the early period of traumatic brain injury in rats. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 42(5), 643–651. <https://doi.org/10.5535/arm.2018.42.5.643>
- Young, L., Rule, G. T., Bocchieri, R. T., Walilko, T. J., Burns, J. M., & Ling, G. (2015). When physics meets biology: Low and high-velocity penetration, blunt impact, and blast injuries to the brain. In *Frontiers in Neurology*, 6, 89. *Front Neurol*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00089>

- Yurt, K. K., Kivrak, E. G., Altun, G., Mohamed, H., Ali, F., Gasmalla, H. E., & Kaplan, S. (2018). A brief update on physical and optical disector applications and sectioning-staining methods in neuroscience. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 93, 16-29. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.02.009>
- Yu, S., Kaneko, Y., Bae, E., Stahl, C. E., Wang, Y., van Loveren, H., Sanberg, P. R., & Borlongan, C. V. (2009). Severity of controlled cortical impact traumatic brain injury in rats and mice dictates degree of behavioral deficits. *Brain Research*, 1287, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.067>
- Zetterberg, H., Smith, D. H., & Blennow, K. (2013). Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nature Reviews. Neurology*, 9(4), 201–210. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2013.9>
- Zhang, Y., Huang, Z., Xia, H., Xiong, J., Ma, X., & Liu, C. (2022). The benefits of exercise for outcome improvement following traumatic brain injury: Evidence, pitfalls and future perspectives. *Experimental Neurology*, 349. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2021.113958>
- Zhang, Z., Zhang, Z. Y., Wu, Y., & Schluesener, H. J. (2011). Immunolocalization of toll-like receptors 2 and 4 as well as their endogenous ligand, heat shock protein 70, in rat traumatic brain injury. *NeuroImmunoModulation*, 19(1), 10–19. <https://doi.org/10.1159/000326771>
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G. L., & Gage, F. H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(1), 3–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006>
- Zhao, Z., Sabirzhanov, B., Wu, J., Faden, A. I., & Stoica, B. A. (2015). Voluntary Exercise Preconditioning Activates Multiple Antiapoptotic Mechanisms and Improves Neurological Recovery after Experimental Traumatic Brain Injury. *https://Home.Liebertpub.Com/Neu*, 32(17), 1347–1360. <https://doi.org/10.1089/NEU.2014.3739>
- Zhou, Y., Shao, A., Yao, Y., Tu, S., Deng, Y., & Zhang, J. (2020). Dual roles of astrocytes in plasticity and reconstruction after traumatic brain injury. *Cell Communication and Signaling*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00549-2>
- Zhu, X. L., Poon, W. S., Chan, C. C. H., & Chan, S. S. H. (2007). Does intensive rehabilitation improve the functional outcome of patients with traumatic brain injury (TBI)? A randomized controlled trial. *Brain Injury*, 21(7), 681–690. <https://doi.org/10.1080/02699050701468941>
- Zou, J., Wang, Y. X., Dou, F. F., Lü, H. Z., Ma, Z. W., Lu, P. H., & Xu, X. M. (2010). Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochemistry International*, 56(4), 577–584. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.12.021>

