



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias de la Salud

Unidad de Psicobiología

Universidad Autónoma de Barcelona

¿Puede el ejercicio físico previo a una lesión cerebral traumática reducir el déficit de memoria asociado a dicha lesión?

Carmen Longas Luque y Andrea Orejas Andrés

Trabajo de fin de grado dirigido por la Dra. Isabel Portell Cortés

Grado en Psicología

Facultad de Psicología

Universidad Autónoma de Barcelona

Bellaterra, 2013-2014

Resumen

El objetivo de este trabajo era realizar un estudio piloto con ratas Wistar para determinar si el ejercicio físico previo a una lesión cerebral traumática podría reducir el déficit de memoria asociado a dicha lesión.

Se aplicó un programa de ejercicio en rueda de actividad (n=5; 17 días) o sedentarismo (n=4). Posteriormente, todos los animales recibieron una lesión cerebral traumática por impacto cortical controlado, y 17 días después de la lesión se evaluó la memoria a corto (3 h) y a largo (24 h) plazo mediante la tarea de reconocimiento de objetos.

Los resultados mostraron que los animales sedentarios lesionados no recordaron el objeto familiar en ninguna de las sesiones de retención; en cambio, las ratas que realizaron ejercicio previo a la lesión mostraron recuerdo en la retención a 3 horas (resultados obtenidos eliminando un sujeto *outlier*), pero no en el test a 24 horas. No se observaron diferencias significativas entre grupos en ninguna de las sesiones de retención.

Estos resultados sugieren que el ejercicio previo a un traumatismo cerebral puede reducir el déficit de memoria a corto plazo, pero no el de memoria a largo plazo.

Palabras clave: ejercicio, traumatismo cerebral, memoria de reconocimiento de objetos, ratas

Abstract

The aim of this research was to conduct a pilot research with Wistar rats to determine whether exercise pre-lesion could reduce the memory impairment associated to a traumatic brain injury.

An exercise program in running wheel was applied (n=5; 17 days) or sedentarism (n=4). Subsequently, all animals received a traumatic brain injury by controlled cortical impact, and 17 days later, short and long term memory was evaluated by novel object recognition task.

Results showed that sedentary injured animals didn't remember the familiar object in any of the retention tests; however, the rats that exercised before the injury showed that they remembered the familiar object at 3 hours (results obtained eliminating an outlier subject), but not at the 24 hour retention test. No significant differences were observed between groups in any of the retention tests.

These results suggest that exercise preconditioning before a traumatic brain injury can reduce the short term, but not the long term, memory impairment.

Keywords: exercise, traumatic brain injury, object recognition memory, rats

Introducción

El daño cerebral traumático (TBI, *traumatic brain injury*) afecta aproximadamente a 10 millones de personas en todo el mundo (Koehler, Wilhelm, & Shoulson, 2011) siendo la principal causa de discapacidad en niños, adolescentes y adultos menores de 40 años (Ríos-Lago, Muñoz-Céspedes, & Paúl-Lapedriza, 2007). Las principales causas de TBI son los accidentes automovilísticos, las armas de fuego, las caídas y las actividades deportivas y recreativas (Jacotte-Simancas, 2013). Se calcula que un 90% de las personas que han sufrido un TBI van a requerir atención médica hospitalaria y presentaran un pronóstico muy variable en función de la intensidad y la ubicación de la lesión (Prieto, Pascual, Roda, Cerdán, & Barcia, 2009). Todo esto supone un importante problema socioeconómico y de salud pública a escala mundial (Roozenbeek, Maas, & Menon, 2013). El TBI se define como un daño cerebral provocado por una fuerza mecánica externa, como la causada por una rápida aceleración o desaceleración, ondas de choque o impactos (Xiong, Mahmood, & Chopp, 2013). En éstos se produce un daño primario en la región del impacto que ocurre inmediatamente después del traumatismo, seguido de un daño secundario asociado a procesos de neuroinflamación, isquemia y alteraciones neuronales y gliales (O'Connor, Smyth, & Gilchrist, 2011). El daño secundario se produce debido a las cascadas de cambios metabólicos, celulares y moleculares inducidas por el daño primario, que puede prolongarse durante semanas y meses, pudiendo afectar a diversas regiones cerebrales (Archer, Svensson, & Alricsson, 2012; O'Connor et al., 2011; Xiong et al., 2013). La introducción de mejoras en los tratamientos agudos ha dado lugar a un aumento de la supervivencia de los pacientes, pero la mayoría de los supervivientes con TBI grave o moderado presentan secuelas crónicas que afectan directamente sobre la calidad de vida del paciente, el entorno familiar y los sistemas sanitarios (Chen & D'Esposito, 2010). Dichas secuelas están caracterizadas por convulsiones, déficits cognitivos, cambios de personalidad o trastornos psiquiátricos (Archer et al., 2012). Los déficits cognitivos más frecuentes suelen darse sobre los procesos atencionales, la memoria y las funciones ejecutivas (Koehler et al., 2011). Los tratamientos destinados a la mejora de estas alteraciones dan resultados parciales debido a los múltiples factores como el tiempo desde la lesión, la etiología de ésta y la edad (Koehler et al., 2011) suponiendo todo un reto para los clínicos.

El ejercicio físico, cuyos beneficios para la salud en general están bien establecidos, se contempla como un posible tratamiento para reducir los déficits cognitivos asociados al TBI. Los datos presentados en diversas revisiones demuestran que el ejercicio físico, además de mejorar la salud física, es capaz también de proteger y mejorar las funciones cognitivas tales como el aprendizaje y la memoria (Cotman, Berchtold, & Christie, 2007; Dishman et al., 2006; Hillman, Erickson, & Kramer, 2008; Henriette van Praag, 2009).

Con el creciente interés por la relación entre los diferentes estilos de vida y la salud, también ha aumentado el número de investigaciones que estudian qué factores son los más influyentes. Uno de los factores que más se ha estudiado es el ejercicio físico, que ha demostrado ser capaz de prevenir la pérdida de capacidad cognitiva asociada a la edad y como factor preventivo de los ACV. De estos estudios se desprende que la actividad física tiene un efecto neuroprotector y neuropotenciador en un amplio rango de funciones cognitivas, sobre todo, en tareas que requieren de la función ejecutiva, como por ejemplo la organización, planificación, memoria de trabajo o la realización de múltiples tareas simultáneas (Hillman et al., 2008). En ellos, se suele preguntar a los participantes mediante un cuestionario por su nivel de actividad física para luego relacionar esta información con su ejecución en algún tipo de prueba cognitiva. Por ejemplo, en el estudio de Etgen et al. (2010), se siguió a una cohorte de personas mayores de 55 años durante dos años, de los cuales se registró el número de días semanales que realizaban ejercicio para posteriormente evaluar su ejecución en un test cognitivo. Los resultados mostraron que el ejercicio moderado a intenso estaba asociado a una menor incidencia de déficit cognitivo. Como éste, existen otros estudios, también transversales y de intervención, que incluyen variables como la intensidad, duración y frecuencia del ejercicio, que en líneas generales apoyan esta relación inversa entre ejercicio y declive de la función cognitiva (Jacotte-Simancas, 2013).

El ejercicio físico también ha sido estudiado como posible factor preventivo de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA) o la enfermedad de Parkinson ya que con el aumento de la esperanza de vida, también ha aumentado la incidencia de este tipo de enfermedades. Los datos apuntan a que el ejercicio físico podría retrasar la aparición de las enfermedades neurodegenerativas, así como frenar su evolución (Jacotte-Simancas, 2013). En un estudio prospectivo de casos y controles que duró 31 años, se encontró una fuerte relación entre el ejercicio regular a lo largo de la edad adulta y una menor probabilidad de desarrollar una demencia (Andel et al., 2008). Burns y col. (citado por Jacotte-Simancas, 2013) hallaron una correlación positiva entre la condición física en la etapa temprana de la EA y el volumen cerebral conservado. Asimismo, también se ha observado como el ejercicio físico es un factor preventivo para los accidentes cerebrovasculares (ACV), demostrándose en varios estudios longitudinales que las personas que realizan ejercicio físico regularmente presentan un menor riesgo de sufrir un ACV (Lee, Folsom, & Blair, 2003).

La mayoría de estudios con animales sobre los efectos neuropotenciadores del ejercicio físico se han realizado en tareas hipocampo-dependientes, y corroboran la existencia de dichos efectos sobre los procesos cognitivos. Los efectos facilitadores del ejercicio sobre el aprendizaje y la memoria se han observado en distintas tareas: laberinto acuático de Morris (Vaynman, Ying, & Gomez-Pinilla, 2004), laberinto de Barnes (Jacotte-Simancas, Costa-Miserachs, Torras-Garcia,

Coll-Andreu, & Portell-Cortés, 2013), laberinto radial (Langdon & Corbett, 2012), evitación pasiva (Liu et al., 2009) y memoria de reconocimiento de objetos (García-Capdevila, Portell-Cortés, Torras-Garcia, Coll-Andreu, & Costa-Miserachs, 2009). A partir de modelos animales de isquemia cerebral, se ha podido observar que el ejercicio físico previo a un ACV presenta efectos neuroprotectores, en el sentido de que aumenta la angiogénesis, reduce la respuesta inflamatoria, protege la barrera hematoencefálica (BHE) y presenta efectos antiapoptóticos (Zhang, Wu, & Jia, 2011). El estudio de Ding et al. (2006) en ratas, mostró como un programa de ejercicio de 3 semanas previo a un ACV permitió una reducción del tejido afectado por el infarto cerebral, un menor edema y además, una menor muerte neuronal.

Recientemente, se ha empezado a investigar sobre los efectos beneficiosos del ejercicio físico administrado después de una lesión cerebral para reducir los déficits cognitivos asociados. La mayoría de estudios con humanos no suelen medir capacidades cognitivas y se centran en estudiar las percepciones que tienen los propios pacientes sobre su estado de salud. A fecha de hoy, sólo conocemos un estudio en el que se evalúen tales atributos. En éste, se aplicó como tratamiento el ejercicio físico en un entorno de realidad virtual a un grupo de pacientes con TBI, y los resultados corroboraron que el ejercicio físico después de este tipo de lesión mejoraba las capacidades cognitivas (Grealy, Johnson, & Rushton, 1999). En cuanto a investigaciones en modelos animales, un número cada vez mayor de estudios demuestran que la aplicación de un tratamiento de ejercicio físico después de la lesión reduce los déficits cognitivos producidos por ésta. En nuestro propio laboratorio, hemos visto como aquellas ratas con lesión cerebral por impacto cortical controlado (CCI, *controlled cortical impact*) que realizan ejercicio durante 20 días, obtienen una mejor ejecución en una tarea de reconocimiento de objetos (Jacotte-Simancas, 2013). Otros estudios han mostrado efectos similares del ejercicio físico en animales lesionados en otras tareas como por ejemplo el laberinto acuático de Morris, que evalúa memoria espacial, e incluso con sólo 7 días de ejercicio (Griesbach, Hovda, & Gomez-Pinilla, 2009). Estos resultados también se obtienen cuando se aplica un programa de ejercicio forzado en animales lesionados por percusión de fluido (LFP), como muestran algunos estudios que además, han encontrado un aumento de la neurogénesis (Itoh et al., 2011a). Además, existen diversos datos que indican que el ejercicio físico presenta efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos, y aumenta la neuroplasticidad y la angiogénesis después de un TBI (Archer et al., 2012), por lo que podría tener efectos neuroreparadores y neuroprotectores.

Respecto a los efectos que el ejercicio previo a un TBI pudiera tener sobre los déficits cognitivos prácticamente no hay datos. No sabemos de estudios con humanos que hayan

examinado los efectos del ejercicio pre-lesión, pero sí se ha visto que en modelos animales de TBI se observan beneficios a nivel celular. Un estudio con ratas demostró que cuatro semanas de ejercicio previo a un TBI reducía significativamente la inflamación subsecuente (Mota et al., 2012), y en otro trabajo se demostró que el ejercicio físico voluntario ofrecía neuroprotección frente a una lesión por un agente químico en el hipocampo (Funk et al., 2011).

Los efectos del ejercicio sobre los procesos cognitivos, tanto en individuos sanos como con lesión cerebral, parecen estar relacionados principalmente con un aumento en los factores de crecimiento y de la neurogénesis. Los principales factores de crecimiento conocidos en la modulación de los efectos del ejercicio son: las neurotrofinas (NT), el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) y el factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF) (Cotman et al., 2007). Las neurotrofinas son una familia de proteínas implicadas en la neuroplasticidad, la neurogénesis y la supervivencia neuronal (Cotman et al., 2007). Cabe destacar el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) ya que presenta un papel clave sobre la función hipocampal y la modulación de los procesos de neuroprotección, plasticidad sináptica (potenciación a largo plazo), aprendizaje y memoria (Hötting & Röder, 2013). Se ha observado que la actividad física incrementa los niveles de BDNF tanto en humanos (Griffin, Bechara, Birch, & Kelly, 2009; Hopkins, Davis, Vantighem, Whalen, & Bucci, 2012) como en animales (Griffin et al, 2009; Neeper et al, 1996). Además, se ha comprobado que este aumento es el responsable de los efectos potenciadores de la función cognitiva del ejercicio. Diferentes estudios con modelos animales han reportado que si se bloquea la acción del BDNF, se deteriora la mejora producida por el ejercicio sobre las funciones cognitivas en diferentes tareas (Ding & Pinilla, 2011; Griesbach, Allen, Gomez-Pinilla, 2009; Vaynman, Ying, & Gomez-Pinilla, 2004). También se ha visto que si después de un TBI se aplica un tratamiento con ejercicio demasiado pronto no se observa dicho aumento de BDNF hipocampal y como consecuencia no se encuentran efectos neuroprotectores del ejercicio, de hecho parece dificultar los procesos moleculares de reparación de la lesión, y además, no se observa reducción del déficit de memoria asociado a la lesión (Griesbach, Hovda, Molteni, Wu, & Gomez-Pinilla, 2004a; Griesbach, Gomez-Pinilla, & Hovda, 2004). En cuanto a los otros factores de crecimiento, el ejercicio también incrementa los niveles de IGF-1 y de VEGF, capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Estos dos factores, interactúan entre sí y estimulan la neurogénesis y la angiogénesis, proliferando células endoteliales y formando nuevos capilares (Dishman et al., 2006). La neurogénesis, entendida como el proceso de generar nuevas neuronas funcionales a partir de células precursoras, tradicionalmente, se pensaba que sólo ocurría durante el período embrionario y perinatal (Ming & Song, 2011). Actualmente sabemos que en el cerebro adulto de los mamíferos existen principalmente dos núcleos sensibles a la formación de nuevas neuronas: la zona subgranular

del giro dentado (SGZ) y la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV) (Jacotte-Simancas, 2013; Ming & Song, 2011; Nithianantharajah & Hannan, 2009). La neurogénesis adulta es sensible a los factores ambientales, y el ejercicio físico puede aumentar la neurogénesis hipocampal interviniendo especialmente en la proliferación y supervivencia celular (Redila & Christie, 2006; H van Praag, Christie, Sejnowski, & Gage, 1999). Por otro lado, la angiogénesis consiste en la formación de capilares sanguíneos nuevos a partir de vasos preexistentes. Es un proceso complejo donde interactúan diferentes cascadas moleculares. La angiogénesis es sensible a dos factores: el ejercicio y el daño cerebral (Jacotte-Simancas, 2013). Se ha visto como ante el ejercicio físico aumenta la formación de nuevos capilares y se refuerzan las redes vasculares incrementando el metabolismo cerebral.

En suma, los datos presentados hasta aquí indican que el ejercicio físico mejora el aprendizaje y la memoria tanto en individuos sanos como con lesiones cerebrales, protege de la pérdida cognitiva asociada a edad, retrasa la aparición de la enfermedad de Alzheimer y de otros trastornos neurodegenerativos, y además, parece tener efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos. No obstante, no parecen existir trabajos que hayan estudiado si el ejercicio previo a un traumatismo cerebral es capaz de reducir sus secuelas cognitivas. Tomando en consideración las pruebas que demuestran la relación entre ejercicio físico y neuroprotección, hemos formulado la siguiente hipótesis: el ejercicio físico previo a una lesión cerebral traumática tiene efectos neuroprotectores, que pueden reducir los efectos de dicha lesión, tanto a nivel conductual como neuroanatómico.

Para contrastar esta hipótesis hemos realizado un experimento piloto en ratas en el que pretendemos evaluar si el ejercicio físico previo a un TBI puede reducir el déficit de memoria asociado a dicha lesión. El modelo de TBI utilizado es el CCI, que trata de reproducir las contusiones cerebrales post-traumáticas observadas en la práctica clínica (Prieto, Pascual, Roda, Cerdán, & Barcia, 2009; Xiong et al., 2013). Las ventajas del CCI residen en un mayor control de las medidas de deformación como el tiempo, la velocidad y la profundidad del impacto, haciendo que sea un modelo muy replicable. Para determinar los déficits cognitivos hemos evaluado la memoria de reconocimiento de objetos (MRO). Esta tarea está basada en la habilidad para diferenciar un objeto familiar de uno desconocido y se puede medir fácilmente ya que se basa en la tendencia natural del animal por explorar la novedad (Jacotte-Simancas, 2013) y además genera muy poco estrés. La MRO ha sido propuesta como un modelo animal de memoria episódica en la que pueden participar tres estructuras fundamentalmente: hipocampo, corteza perirrinal y córtex prefrontal medial. (Antunes & Biala, 2012). Se ha postulado que la corteza perirrinal participaría principalmente en reconocimiento de objetos codificando la información básica acerca de familiaridad o novedad de un objeto mientras que el hipocampo

estaría implicado en codificar la información sobre la experiencia del objeto (Antunes et al., 2012). El córtex prefrontal medial estaría probablemente relacionado con el componente temporal del recuerdo (Jacotte-Simancas, 2013). En nuestro estudio, el componente temporal no fue valorado debido a que solo se realizó una única sesión.

Los parámetros experimentales en relación a la lesión y la MRO son los mismos a los utilizados en anteriores experimentos realizados en el laboratorio de Psicobiología, en los que se ha visto que los animales no lesionados recuerdan el objeto familiar tanto en el test de memoria a corto como a largo plazo, mientras que los animales lesionados no recuerdan a las 24 horas (Amorós-Aguilar, 2013; Jacotte-Simancas, 2013). En la mayoría de los trabajos previos (Jacotte-Simancas, 2013; Loron-Sánchez, 2012; pero no en Amorós-Aguilar, 2013) también se observa un deterioro de la memoria a las 3 horas en los animales lesionados. Los objetivos concretos que nos planteamos en nuestro estudio son:

1. Estudiar si el ejercicio físico previo a una lesión moderada por CCI reduce el déficit en la MRO a corto (3 horas) y/o largo plazo (24 horas).
2. Determinar si existe una relación entre la cantidad de ejercicio físico previo a una lesión moderada por CCI y el recuerdo a corto y/o largo plazo.
3. Determinar, mediante un estudio macroscópico del tejido nervioso, si el ejercicio previo a una lesión moderada por CCI reduce el daño cerebral asociado a la lesión.

Este último objetivo no pudo llevarse a cabo, ya que no fue posible obtener muestras del tejido nervioso de los animales del presente experimento. Sin embargo, las autoras del trabajo han querido llevar a cabo todos los procedimientos del experimento, incluidos los necesarios para la obtención y el análisis de muestras de tejido cerebral. Para ello se han utilizado muestras de cuatro animales con TBI que no pertenecen al presente experimento, dos de los cuales habían recibido ejercicio como tratamiento post-lesión, y no antes de la misma, mientras que los otros dos animales habían permanecido en la condición sedentaria. Se han analizado los datos como si se trataran de los sujetos reales del experimento, no obstante, en la discusión de los resultados estos datos no se han tenido en cuenta. Los diferentes procedimientos llevados a cabo en el experimento han sido realizados por experimentadores acreditados (intervención quirúrgica, sacrificio y perfusión intracardiaca) o por las autoras del trabajo bajo la supervisión de experimentadores (pruebas conductuales).

Materiales y métodos

Consideraciones éticas

Los procedimientos utilizados en este experimento se han realizado siguiendo la normativa vigente de la Unión Europea sobre la protección de los animales empleados en la experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE, de 24 de noviembre de 1986) y el decreto regulador sobre aspectos éticos de cuidado y control de animales experimentales de la Generalitat de Catalunya (DOG 2450-7/08/1997). El procedimiento está aprobado por la CEEAH de la Universidad Autónoma de Barcelona y por el DAAM de la Generalitat de Catalunya (nº de orden 7179).

Sujetos

La muestra total fue de 9 ratas albinas macho de la cepa Wistar, criadas en el laboratorio de Psicobiología. A los tres meses, se separaron en jaulas individuales y se asignaron aleatoriamente al grupo sedentario (SED-L) o al grupo ejercicio (EJE-L). El peso medio al inicio del experimento fue de 377,5 gramos.

En todo momento, se mantuvieron constantes las condiciones de temperatura (20-22°C) y humedad (40-70%). Además, se las mantuvo bajo un ciclo controlado de 12 horas de luz (8 a.m. a 8 p.m.) y 12 horas de oscuridad (de 20 p.m. a 8 a.m.), y recibieron agua y comida *ad libitum*.

Ejercicio físico

El grupo EJE-L estuvo compuesto por un total de 5 sujetos que fueron estabulados en jaulas de policarbonato transparente de 48 x 26 x 20 cm conectadas las 24 h a una rueda de actividad con un diámetro de 37 cm (Rat Wheel, ENV-042, Med Associates, Inc. USA). Cada rueda de actividad disponía de un cuenta-kilómetros que registraba diariamente el tiempo de ejercicio físico y los kilómetros recorridos. El grupo SED-L estuvo formado por 4 animales que se estabularon en jaulas de policarbonato transparente de 52 x 28 x 18 cm, equivalentes a las anteriores pero sin acceso a una rueda de actividad. Las ratas permanecieron en su condición de ejercicio/sedentario hasta el día de la intervención quirúrgica (17 días).

Intervención quirúrgica

Todos los animales fueron sometidos a una intervención quirúrgica en la que se les aplicó una lesión traumática por CCI (Pittsburgh Precision Instruments, Inc, USA). La intervención quirúrgica se realizó bajo anestesia de gases. Para ello, se introdujo a cada rata durante 6 minutos en la caja de inducción (20 cm x 13 cm x 13 cm) y se les administró isoflurano al 5% mezclado con oxígeno (flujo de 2l/min).

Una vez anestesiado, se situaba al sujeto en el aparato estereotáxico (David Hopf Instruments, Tujunga, CA, USA) y se mantenía la anestesia a lo largo de toda la intervención mediante una máscara situada en el hocico del animal (isoflurano al 2%, flujo de oxígeno de 1 l/min). A continuación se le afeitaba la cabeza y se practicaba una incisión en la piel para exponer el cráneo. Seguidamente, se limpiaba con suero fisiológico y se establecían las coordenadas estereotáxicas de la lesión (anteroposterior: -4.5 mm desde Bregma; lateral: -3mm desde la línea media). Mediante un pequeño taladro se realizaba una craneotomía de 5 mm de diámetro sobre el hemisferio derecho, evitando dañar en todo momento la duramadre.

El brazo del dispositivo de ICC estaba fijado en un ángulo de 15° y al final del mismo había un pistón con una punta plana de 3 mm de diámetro, que se situaba sobre la duramadre. A continuación, se hacía impactar el pistón, accionado neumáticamente sobre el cerebro de la rata, a una velocidad de 6 m/s, durante 150 mseg y una profundidad de 2 mm, produciendo una lesión moderada. Una vez realizado el impacto, se limpiaba la zona, se suturaba y se aplicaba un antiséptico tópico. Finalmente, se aplicaba una inyección subcutánea de 0,2 ml de buprenorfina (Buprex, Schering-Plough, SA), un analgésico opiáceo.

Tras la intervención quirúrgica se iniciaba un período de dos semanas de postoperatorio antes de iniciar la tarea conductual. Para controlar la evolución postoperatoria, se pesó a cada animal antes de las intervenciones, a las 24 h de la lesión y a las 72 h. Tras el último control se procedió a pesar a los sujetos una vez por semana.

Tarea de memoria de reconocimiento de objetos (MRO)

Material experimental

El aparato experimental consistió en una caja cuadrada de 65,5 x 65,5 x 35 de conglomerado forrado de melamina marrón oscuro que simulaba un campo abierto. La caja estaba en el interior de una caja de aislamiento de 157 x 71,5 x 71,5 cm que disponía de una luz que proporcionaba una iluminación de 30 luxes y una cámara de video Canon MVX10i. Los videos se registraban automáticamente a partir del programa informático ANY-maze version 4.72 (Stoelting Co., IL, USA) que consiste en un sistema de seguimiento de vídeo diseñado para automatizar las pruebas en los experimentos conductuales. Posteriormente, a partir de las grabaciones se midieron manualmente, a partir de cronómetros, los tiempos de exploración durante las sesiones de retención, con el fin de obtener mediciones más precisas a las proporcionadas por el sistema automático.

Para la prueba de neofobia se utilizó una pieza de Lego compleja, y para la MRO se utilizaron tres objetos por duplicado, consistentes en una lata de refresco, un colgador y otro objeto hecho con piezas de Lego. Todos los objetos eran totalmente desconocidos para el animal, y fueron escogidos por no tener ningún valor etológico conocido para la rata. Además, los datos contrastados por diversos experimentos previos corroboran que los animales no presentan

ningún tipo de preferencia hacia ninguno ellos. Para evitar la presencia de señales olfativas, antes de que el primer animal iniciase la prueba, y después de cada uno de ellos, se limpiaban los objetos y la caja experimental con una solución de alcohol al 70%.

Habitación

Pasadas dos semanas después de la intervención, los animales realizaban dos sesiones de habitación separadas por un intervalo de 2 horas. Las sesiones consistían en colocar al animal en el aparato experimental vacío y se le permitía explorarlo libremente durante 12 minutos.

Prueba de neofobia

Un día después de las sesiones de habitación, se realizaba la prueba de neofobia para determinar el grado de ansiedad de los animales hacia un objeto nuevo situado en un entorno familiar (García-Capdevila et al, 2009).

Para ello, se colocaba en la parte central de la caja experimental un objeto compuesto por piezas de Lego y se introducía al animal en la caja, de espaldas al objeto, para luego dejar que explorase libremente durante 10 minutos. En esta sesión, se midieron tanto la latencia de exploración como el tiempo de exploración del objeto.

Adquisición del aprendizaje

Veinticuatro horas después de la prueba de neofobia, se realizaba la sesión de adquisición en la que se situaban dos objetos idénticos, cada uno a 10 cm de las esquinas posteriores de la caja. El animal se colocaba dentro de la caja experimental mirando al centro de la pared opuesta a los objetos y se le dejaba explorar los dos objetos durante 15 minutos.

Tanto en esta como en las siguientes pruebas se consideró que el animal había explorado el objeto cuando lo tocaba con su hocico o se situaba a menos de 2 cm.

Retención 1

A las 3 horas de la prueba de adquisición, se realizó la primera sesión de retención de 5 minutos, donde se mantenía uno de los objetos familiares, previamente utilizado en la prueba de adquisición, y se colocaba también un objeto nuevo. Los objetos eran situados en las mismas localizaciones que durante la adquisición y se colocaba al animal dentro de la caja experimental con el morro mirando a la pared opuesta a los objetos.

Retención 2

Por último, 24 horas después de la sesión de adquisición se realizó la segunda retención, también de 5 minutos, en la que se volvía a mostrar el objeto familiar (previamente presentado en la prueba de adquisición y en el primer test de memoria) y se colocaba otro objeto nuevo, diferente al presentado en la primera retención. La prueba tenía una duración de 5 minutos.

Para analizar la ejecución en las retenciones, se calculó un índice de discriminación aplicando la siguiente fórmula: (tiempo de exploración del objeto nuevo - tiempo de exploración del objeto familiar / tiempo de exploración total empleado en los dos objetos) x 100].

Esta prueba se fundamenta en la tendencia natural de los roedores a explorar objetos nuevos. Un índice de discriminación significativamente superior a 0 (que corresponde a una mayor exploración del objeto nuevo) es indicativo de recuerdo del objeto familiar, mientras que valores cercanos a 0 (que suponen una exploración similar de ambos objetos) es indicativo de falta de recuerdo del objeto familiar. La presentación de los objetos y su localización (derecha o izquierda) fue contrabalanceada, de acuerdo con lo indicado en la tabla 1, para controlar posibles preferencias por el tipo de objeto y/o por su localización.

Adquisición		Retención 1		Retención 2	
Fanta	Fanta	Fanta	Lego	Colgador	Fanta
Lego	Lego	Lego	Colgador	Fanta	Lego
Colgador	Colgador	Colgador	Fanta	Lego	Colgador
Fanta	Fanta	Lego	Fanta	Fanta	Colgador
Lego	Lego	Colgador	Lego	Lego	Fanta

Tabla 1. Combinación de los objetos para las diferentes pruebas de la MRO.

Histología¹

Sacrificio y perfusión intracardiaca

Posteriormente a la segunda retención, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal, 200mg/kg; Vetoquinol S.A; Madrid-España) y perfundidos intracardiácamente con paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich, Madrid) disuelto en PBS. Se extrajeron los cerebros y se sumergieron en una solución de PFA al 4%. A las tres horas, se realizaron tres lavados con tampón fosfato, con un intervalo entre cada uno de 20 minutos. Finalmente fueron conservados a -80°C en una solución crioprotectora (sacarosa al 30% en tampón fosfato).

Medición macroscópica de la lesión: tinción de Nissl

Se obtuvieron cortes coronales de 40 µm de grosor, mediante un criostato (Shandon Cryotome FSE, Thermo electron corporation, Waltham, USA), tomando 1 de cada 10 de estas secciones a lo largo de toda la extensión anteroposterior de la lesión, se procedió a realizar una tinción con violeta de cresilo. Los cortes se incubaron en una solución de violeta de cresilo al 0,5% luego de lo cual se deshidrataron en alcohol al 70%, 95%, 100% consecutivamente, para ser finalmente montados en los portaobjetos, usando DPX (Sigma Aldrich, Madrid).

Para calcular el volumen de la lesión y cómo ésta había afectado al tejido cerebral del hemisferio dañado, se escanearon (HP Scanjet G4050) las secciones de tejido y mediante el software de análisis de imágenes Fiji (Schindelin et al., 2012), se dibujó el área de la lesión, del hipocampo, del ventrículo lateral y del tejido intacto de ambos hemisferios para obtener los diferentes volúmenes. Las secciones cerebrales de los 4 animales fueron analizadas por separado por las dos experimentadoras. Tras comprobar que no existían diferencias significativas entre los valores obtenidos por ambas evaluadoras, se calcularon los valores medios para cada variable, y los posteriores análisis se realizaron tomando esos valores medios.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SPSS 21.0. (Armonk, NY, USA). Una vez valorada la simetría de los grupos tanto por gráficos como por índices estadísticos, se decidió utilizar la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar la ejecución en la MRO de los dos grupos. También se utilizaron pruebas t de Student para una sola muestra para determinar si los valores obtenidos eran significativamente distintos del valor de referencia (0 o 100, en función de la variable analizada), así como correlaciones de Spearman para explorar posibles relaciones entre la cantidad de ejercicio físico realizada y otras variables.

¹ Recordamos que los procedimientos de histología no fueron realizados con los animales del presente experimento, sino con 4 animales lesionados que pertenecían a otro trabajo.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a partir de una significación igual o inferior a 0,05.

Resultados

Estado de los sujetos

No se encontraron diferencias significativas en el peso de los animales al inicio del experimento, ni tampoco al final del período de ejercicio o al inicio de la fase de aprendizaje.

Nivel de ejercicio

Durante los 17 días de ejercicio, se fueron registrando a diario las distancias recorridas por cada animal. Tal como se muestra en la figura 1, los animales del grupo ejercicio fueron aumentando la distancia diaria recorrida, alcanzando los niveles máximos durante la última semana, de manera que en los últimos 7 días antes de la lesión la media fue de 0,76 km diarios, oscilando entre 0,6 y 1 km por día.

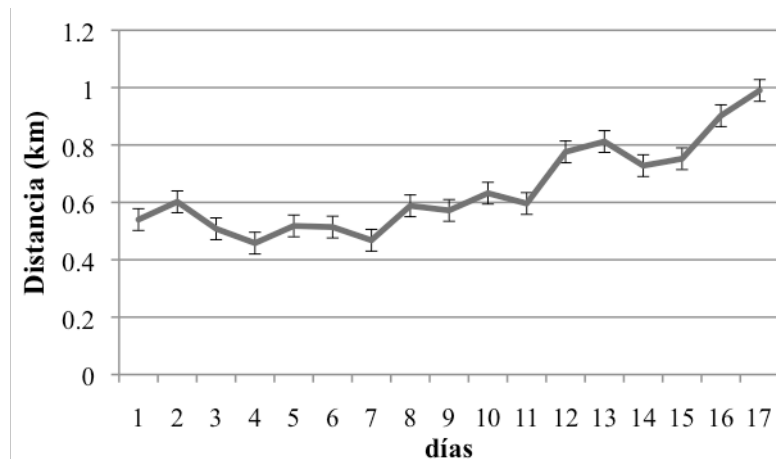


Figura 1. Distancia media en kilómetros recorrida por los animales del grupo EJE-L. Los datos se presentan en media más error estándar.

Memoria de reconocimiento de objetos (MRO)

Neofobia

El tiempo empleado en explorar el objeto en la sesión de neofobia fue significativamente superior en los animales que realizaron ejercicio que en los sedentarios (Figura 2) [U= 1.000, z = -2,214, p = 0.027].

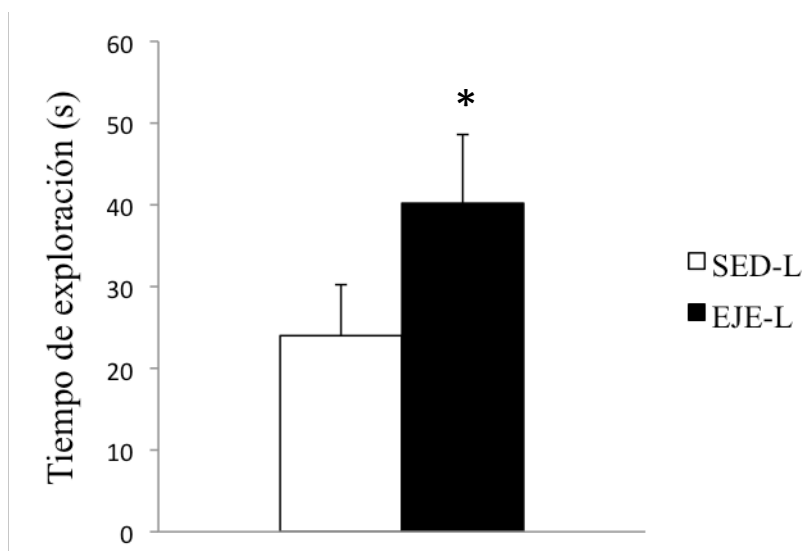


Figura 2. Tiempo de exploración durante la prueba de neofobia en función del grupo experimental. Los datos se muestran como media más error estándar. (* indica significación estadística respecto al grupo SED-L).

Actividad exploratoria durante la sesión de adquisición

La prueba de Mann Whitney no mostró diferencias significativas entre los grupos en cuanto al tiempo total empleado en la exploración de los objetos durante la sesión de adquisición.

Retención 1 (3 horas)

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los resultados de la muestra total no indicaron ningún efecto significativo del ejercicio físico, ni recuerdo del objeto familiar. Uno de los animales del grupo EJE-L mostró una conducta muy diferente al resto de la muestra, de forma que después de analizar los datos gráficamente a partir de un boxplot y de comprobar mediante una prueba T para muestras independientes que el índice de discriminación de este animal era significativamente diferente al del resto de animales de su grupo (p=0,03), se decidió excluirlo del análisis de la retención 1. Se puede apreciar en la figura 3 como el índice de discriminación de este animal representa un valor alejado. Considerando que dicho animal no mostró valores muy diferentes del resto ni en la prueba de neofobia ni en la sesión de adquisición, creemos que pudo existir un factor no controlado que afectara su ejecución en la retención 1.

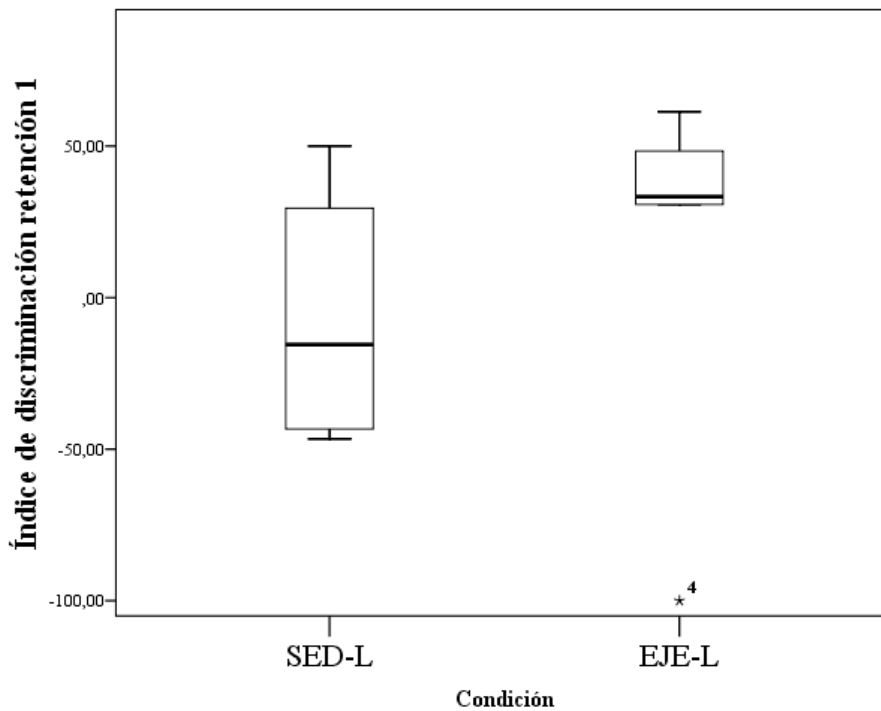


Figura 3. Boxplots para los índices de discriminación en la retención 1 (3 horas), donde se puede observar el animal con valores *outlier*.

La figura 4 muestra las medias de los índices de discriminación más el error estándar de los dos grupos, una vez excluido el animal outlier, siendo la del grupo EJE-L superior a la del sedentario. La prueba t de Student para una sola muestra indicó que el índice de discriminación del grupo EJE-L fue significativamente superior a 0 ($p=0,009$), indicando recuerdo del objeto familiar, mientras que la misma prueba para el grupo SED-L indicó falta de recuerdo del objeto familiar.

La prueba de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre los índices de discriminación de los dos grupos.

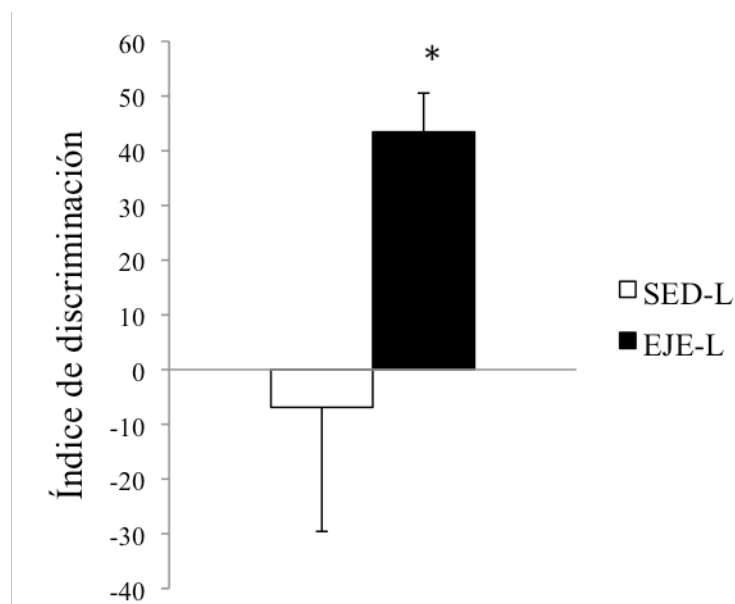


Figura 4. Índice de discriminación para cada grupo experimental en la retención 1 (3 horas). Los datos se muestran como media más error estándar. (* indica diferencias significativas respecto a cero).

Retención 2 (24 horas)

La figura 5 muestra las medias de los índices de discriminación más el error estándar de los dos grupos en la segunda retención. La prueba t de Student para una sola muestra mostró que ninguno de los grupos recordaba el objeto familiar.

La prueba de Mann Whitney determinó que no había diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

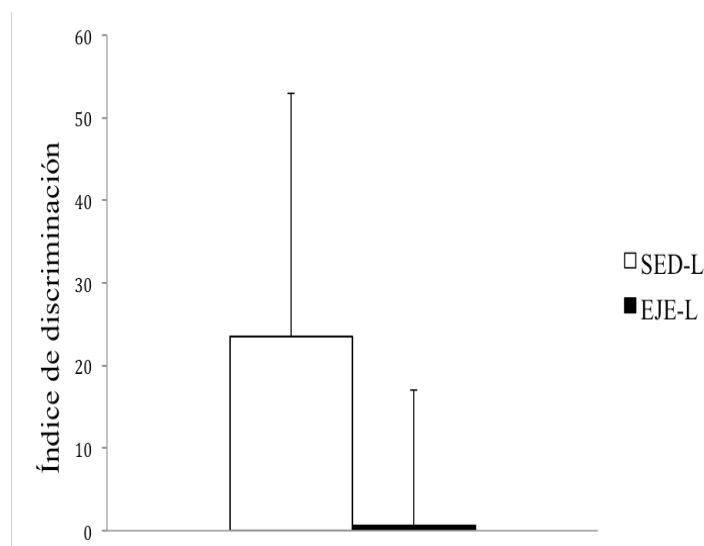


Figura 5. Índice de discriminación para cada grupo experimental en la retención 2 (24 horas). Los datos se muestran como media más error estándar.

Correlaciones entre el recuerdo a las 3 horas y a las 24 horas y cantidad de ejercicio físico

No se hallaron correlaciones significativas entre el ejercicio medio total realizado por cada animal y el índice de discriminación a las 3 h² ni a las 24 h.

Se realizaron los mismos análisis tomando en cuenta sólo los kilómetros recorridos la última semana de ejercicio, ya que durante este último período de tiempo la cantidad de ejercicio suele ser mayor, pero se hallaron resultados similares.

² Uno de los animales fue excluido del análisis de la retención a las 3 h por ser un *outlier*.

Correlaciones entre la exploración en la neofobia y cantidad de ejercicio físico

Se encontró una correlación positiva entre la cantidad de ejercicio total realizado por cada animal y el tiempo empleado en explorar el objeto durante la sesión de neofobia, con tendencia a la significación estadística ($\rho=0,800$; $p=0,052$). Los resultados fueron similares utilizando sólo los kilómetros recorridos la última semana de ejercicio.

Correlaciones entre la exploración en la neofobia y el recuerdo a las 3 horas y a las 24 horas

No se halló ninguna correlación significativa entre el tiempo de exploración en la sesión de neofobia y los índices de discriminación, ni a las 3 h ni a las 24 h.

Correlaciones entre la exploración en la adquisición y el recuerdo a las 3 horas y a las 24 horas

Valoración histológica³

La muestra para determinar el volumen de la lesión y de otros parámetros del tejido lesionado fue de 4 animales, dos de los cuales fueron sedentarios y los otros dos realizaron ejercicio. La figura 6 muestra un corte coronal del cerebro de uno de los animales lesionados en la que se observa afectación de la corteza, el ventrículo lateral y el hipocampo.

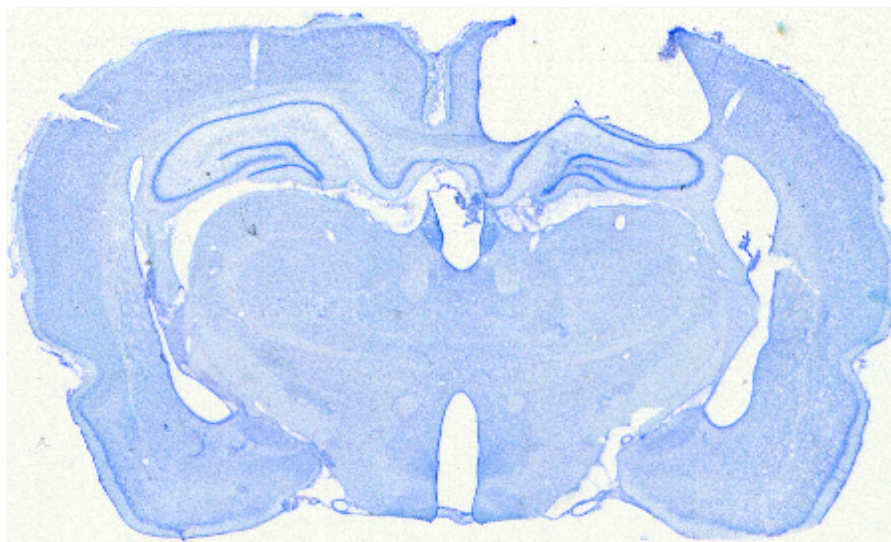


Figura 6. Corte coronal del cerebro de una rata lesionada en la que se aprecian cambios morfológicos.

³ Los datos pertenecientes al apartado de histología son de animales que no provienen del presente trabajo.

En la tabla 2 se muestran las medias y la desviación típica de los diferentes parámetros estudiados. Los datos corresponden al promedio de los datos obtenidos por dos evaluadoras distintas, una vez comprobado que no existían diferencias significativas entre ambas evaluaciones.

En la muestra total, se observó una disminución del volumen de la formación hipocampal del hemisferio ipsilateral y un aumento del volumen del ventrículo lateral del hemisferio lesionado. El hipocampo derecho presentaba una reducción del 11,4% respecto al volumen total del hipocampo izquierdo mientras que el ventrículo lateral derecho aumentó un 19,51% respecto al ventrículo del hemisferio no lesionado. Los dos grupos mostraron una disminución del volumen de la formación hipocampal del hemisferio ipsilateral a la lesión. En cuanto a la ratio de volumen ventricular, se produjo un aumento en el grupo sedentario pero no en el grupo con ejercicio que disminuyó.

Para comprobar si las diferentes variables histológicas consideradas eran diferentes al valor de referencia (100%), se realizaron pruebas t para una sola muestra en ambos grupos. Estas diferencias no fueron significativamente diferentes al valor de referencia en ninguno de los grupos, y para ninguna de las variables estudiadas.

Los análisis estadísticos para la comparación entre grupos (U de Mann Whitney) no han mostrado diferencias estadísticamente significativas. A pesar de ello, el volumen de la cavidad de la lesión fue mayor en el grupo SED-L.

Parámetros		Grupo Les-sed	Grupo Les-eje	Muestra total
Ratio_hpc Porcentaje de volumen hipocampo ipsilateral/hipocampo contralateral	<i>Media</i>	91,65	86,26	88,96
	<i>Desv. típ.</i>	10,08	9,98	8,76
Ratio_ventrículo Porcentaje de volumen ventrículo lateral ipsilateral/volumen ventrículo lateral contralateral.	<i>Media</i>	160,19	78,84	119,51
	<i>Desv. típ.</i>	72,67	27,61	64,96
Ratio_intacto Porcentaje de volumen tejido intacto ipsilateral/volumen tejido contralateral.	<i>Media</i>	98,33	97,88	98,08
	<i>Desv. típ.</i>	1,62	0,70	1,055
%hpc_HD Porcentaje de volumen hipocampo ipsilateral/volumen tejido ntacto ipsilateral.	<i>Media</i>	6,51	7,15	6,83
	<i>Desv. típ.</i>	0,58	0,57	0,60
%_vent_HD Porcentaje de volumen ventrículo lateral ipsilateral/volumen tejido intacto ipsilateral.	<i>Media</i>	2,35	1,70	2,02
	<i>Desv. típ.</i>	0,77	0,05	0,58
Lesión_D Porcentaje de volumen cavidad de la lesión en el hemisferio derecho.	<i>Media</i>	17,53	12,19	14,86
	<i>Desv. típ.</i>	3,07	3,20	4,01

Tabla 2. Valores descriptivos del daño cerebral producido por la lesión de los dos grupos experimentales y la muestra total. Datos en media y desviación típica.

Discusión

Nuestra hipótesis de partida era que el ejercicio físico previo a una lesión cerebral traumática presenta efectos neuroprotectores que pueden reducir los efectos de dicha lesión, tanto a nivel conductual como neuroanatómico. Dado el limitado número de sujetos, los resultados obtenidos en este estudio no permiten establecer resultados concluyentes, aunque si hemos podido observar mejoras en la memoria a corto plazo así como una relación entre el ejercicio físico y la reactividad emocional.

El primer objetivo del estudio era determinar si el ejercicio físico previo a una lesión moderada por CCI mejoraba la ejecución en la MRO, tanto a corto (3 horas) como a largo (24 horas) plazo. No hemos encontrado diferencias significativas en la ejecución en la MRO entre los dos grupos ni a las 3 ni a las 24 horas. A pesar de ello, los resultados obtenidos muestran que los animales del grupo EJE-L recordaron el objeto familiar en la retención a las 3 horas, mientras que el grupo SED-L no. De confirmarse estos resultados en una muestra más amplia, la mejor ejecución en la retención a las 3 horas observada en los animales lesionados estaría indicando que el ejercicio previo a un traumatismo cerebral puede reducir el déficit de memoria a corto plazo. En cambio, en la retención a las 24 horas ninguno de los grupos recordó el objeto familiar, lo cual parece indicar que el ejercicio previo al TBI no es capaz de mejorar la MLP.

El efecto del ejercicio sobre el déficit de memoria parece ser diferente cuando este tratamiento se aplica antes de la lesión o después de la misma. En este sentido, en otro estudio realizado por el mismo laboratorio (Jacotte-Simancas, 2013), en el que el tratamiento con ejercicio físico se realizó después de la lesión, se halló una reducción del déficit de la MRO a las 24 horas, pero no a las 3 horas. El hecho de que la retención a corto plazo no se vea siempre afectada cuando se aplica esta lesión (Amorós-Aguilar, 2013) sugiere que la MRO a corto plazo resulta menos afectada por este tipo de lesión, y puede ser más fácilmente recuperable que la memoria a largo plazo, de manera que un tratamiento de ejercicio previo consigue prevenir el déficit de esta memoria, pero no así el de la memoria a largo plazo. Por otro lado, mientras que el tratamiento con ejercicio pre lesión puede tener sus efectos fundamentalmente protegiendo de la muerte neuronal, el ejercicio post lesión puede reducir el déficit de memoria facilitando procesos de neuroreparación y actuando sobre substratos neurales más relacionados con la memoria a largo plazo, como el hipocampo.

Otro de nuestros objetivos era determinar si existía una relación entre la cantidad de ejercicio físico realizado y el recuerdo a corto y/o largo plazo. Según los resultados obtenidos, no se puede concluir que una mayor cantidad de ejercicio facilite la tarea.

Un factor importante que podría dar explicación a los resultados obtenidos es la duración del programa de ejercicio, de forma que no hubiera sido capaz de producir los cambios neuroquímicos y morfológicos necesarios para proteger las capacidades cognitivas frente al TBI. Debido a la falta de estudios sobre ejercicio anterior a una lesión cerebral no existen datos que recojan la cantidad de ejercicio necesaria para observar efectos sobre la neuroprotección ante un TBI. Podría ser que cuando el ejercicio es administrado como tratamiento posterior a la lesión, sea suficiente una menor cantidad de ejercicio para producir efectos, como se ha mostrado en diferentes estudios (Griesbach et al., 2009; Hicks et al., 1998; Itoh et al., 2011b; Jacotte-Simancas, 2013). El estudio llevado a cabo por Mota et al. (2012) mostró que a las 4 semanas de un programa de ejercicio anterior a un TBI se producía una reducción de la inflamación cerebral en ratas. Este dato sugiere que la duración del programa de ejercicio es una variable relevante a la hora de obtener efectos neuroprotectores significativos, ya que un mayor tiempo de entrenamiento implica una cantidad superior de kilómetros totales recorridos.

Otra variable que pudo afectar a la falta de un efecto claro del ejercicio físico podría ser la distancia temporal entre el momento de la lesión y la evaluación conductual. En nuestro caso, las pruebas de la MRO fueron llevadas a cabo a los 14 días de la lesión, mientras que en otros estudios que sí han mostrado un efecto significativo del ejercicio, aunque con la aplicación de ejercicio post-lesión, éste lapso de tiempo fue de 21 días (Jacotte-Simancas, 2013). Esta cercanía entre TBI y evaluación de la memoria podría ser significativa, ya que el paso del tiempo podría reducir en cierta medida los efectos de la lesión, y hacer más factible que un tratamiento preventivo, como en este caso el ejercicio previo, pudiera reducir el déficit. El ejercicio aplicado antes de la lesión podría tener efectos neuroprotectores no suficientemente potentes como para reducir el déficit de memoria a largo plazo en momentos próximos a la lesión, en el que quizás el efecto de la lesión sería más potente, pero sí tras un mayor periodo post-lesión, cuando el efecto de la misma quizás se hubiera reducido un poco por los propios mecanismos plásticos que parecen activarse tras una lesión (Saha, Jaber, & Gaillard, 2012).

Otra variable analizada en nuestro experimento es la neofobia. En este test, hemos encontrado diferencias significativas entre grupos en el tiempo total de exploración, siendo el grupo que realizó ejercicio el que exploró por más tiempo el objeto presentado. Además, hemos observado una correlación con tendencia a la significación estadística entre la cantidad de ejercicio físico realizado y la exploración durante la sesión de neofobia. Estos dos últimos datos, sugieren una menor reactividad emocional de las ratas en la condición ejercicio. Otras investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio han mostrado una ligera reducción de la reactividad emocional en los sujetos lesionados (Amorós-Aguilar, 2013), por lo que es posible que el

ejercicio revierta el efecto de la lesión, aunque no exista un acuerdo general al respecto, ya que en otros estudios se han encontrado datos contradictorios respecto a que el TBI afecte la reactividad emocional. Sería interesante comprobar este efecto en otro estudio con grupo control no lesionado para poder dilucidar si el ejercicio físico previo puede contribuir a la reducción de los efectos de la lesión sobre la reactividad emocional. También sería necesario tener en cuenta otros parámetros sobre la reactividad emocional como la latencia en el tiempo de la primera exploración del objeto en el test de neofobia ya que ayudaría a tener un mayor control en los resultados.

Finalmente, nuestro tercer objetivo, que no llegamos a poder cumplir, era determinar, a partir de un análisis macroscópico del tejido nervioso, si el ejercicio físico previo a la lesión por CCI reducía el daño cerebral asociado. Dado que no tenemos resultados de las ratas del presente experimento, no podemos saber si la reducción de algunos de los déficits conductuales producidos por la lesión se acompañaron también de una reducción a nivel del daño cerebral. Dado que cuando el ejercicio se aplica después de la lesión sí que se han observado efectos neuroprotectores (Jacotte-Simancas, 2013), creemos que es posible que en el caso de que el tratamiento con ejercicio sea previo a la lesión también es posible.

Este estudio presenta limitaciones importantes, como son el limitado tamaño muestral, así como la falta de un grupo control de lesión que permita corroborar la existencia, por un lado, de un déficit de memoria provocado por la lesión cerebral, y por otro, de efectos neuropotenciadores que reduzcan dicho déficit. Por otro lado, por lo que sabemos éste es el primer estudio experimental en el que se ha investigado el papel que puede jugar el ejercicio físico realizado con anterioridad a una lesión cerebral en la recuperación de ésta, lo que podría ser muy práctico a la hora de realizar una prognosis en pacientes con TBI. Creemos que sería interesante que futuras investigaciones aportaran más luz en esta línea de estudio, por ejemplo, determinando la cantidad e intensidad de ejercicio necesario previo a una lesión cerebral para poder observar un efecto beneficioso, así como estudiar a nivel microscópico los mecanismos subyacentes, como por ejemplo los efectos antiinflamatorios.

Referencias

- Amorós-Aguilar, L. (2013). *Efectes del dany cerebral traumàtic en la memòria de reconeixement d'objectes i en la reactivitat emocional en rates: influència del temps transcorregut des del dany inicial*. Institut de Neurociències i Departament de Psicobiologia i Metodologia de les Ciències de la Salut. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Andel, R., Crowe, M., Pedersen, N. L., Fratiglioni, L., Johansson, B., & Gatz, M. (2008). Physical Exercise at Midlife and Risk of Dementia Three Decades Later: A Population-Based Study of Swedish Twins. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(1), 62–66.
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110.
- Archer, T., Svensson, K., & Alricsson, M. (2012). Physical exercise ameliorates deficits induced by traumatic brain injury. *Acta Neurologica Scandinavica*, 125(5), 293–302.
- Chen, A. J.-W., & D'Esposito, M. (2010). Traumatic brain injury: from bench to bedside to society. *Neuron*, 66(1), 11–24.
- Cotman, C. W., Berchtold, N. C., & Christie, L.-A. (2007, September). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in neurosciences*, 30(9), 464–472.
- Ding, Y. H., Li, J., Yao, W. X., Rafols, J. a, Clark, J. C., & Ding, Y. (2006). Exercise preconditioning upregulates cerebral integrins and enhances cerebrovascular integrity in ischemic rats. *Acta Neuropathologica*, 112(1), 74–84
- Dishman, R.K., Berthoud, H.R., Booth, F. W., Cotman, C.W., Edgerton, V.R., Fleshner, M.R., Gandevia, S.C., Gomez-Pinilla, F., Greenwood, B.N., Hillman, C. H., Kramer, A.F., Levin, B.E., Moran, T.H., Russo-Neustadt, A.A., Salamone, J.D., Van Hoomissen, J.D., Wade, C.E., York, D.A. & Zigmond, M. J.(2006). Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 14(3), 345–356.
- Etgen, T., Sander, D., Huntgeburth, U., Poppert, H., Förstl, H., & Bickel, H. (2010). Physical activity and incident cognitive impairment in elderly persons: the INVADE study. *Archives of Internal Medicine*, 170(2), 186–193.
- Funk, J. a, Gohlke, J., Kraft, A. D., McPherson, C. a, Collins, J. B., & Jean Harry, G. (2011). Voluntary exercise protects hippocampal neurons from trimethyltin injury: possible role of interleukin-6 to modulate tumor necrosis factor receptor-mediated neurotoxicity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(6), 1063–1077.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- Griesbach, G. S., Hovda, D. A., Molteni, R., Wu, A., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. *Neuroscience*, *125*(1), 129–139.
- Griffin, E. W., Bechara, R. G., Birch, A. M., & Kelly, A. M. (2009). Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism. *Hippocampus*, *19*(10), 973–980.
- Hicks, R. R., Boggs, A., Leider, D., Kraemer, P., Brown, R., Scheff, S. W., & Seroogy, K. B. (1998). Effects of Exercise Following Lateral Fluid Percussion Brain Injury in Rats. *Restorative Neurology and Neuroscience*, *12*(1), 41–47.
- Hillman, C. H., Erickson, K. I., & Kramer, A. F. (2008). Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nature Reviews. Neuroscience*, *9*(1), 58–65.
- Hopkins, M. E., Davis, F. C., Vantighem, 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.
- Hötting, K., & Röder, B. (2013). Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *37*(9), 2243–2257.
- Itoh, T., Imano, M., Nishida, S., Tsubaki, M., Hashimoto, S., Ito, A., & Satou, T. (2011a). Exercise increases neural stem cell proliferation surrounding the area of damage following rat traumatic brain injury. *Journal of Neural Transmission*, *118*(2), 193–202.
- Itoh, T., Imano, M., Nishida, S., Tsubaki, M., Hashimoto, S., Ito, A., & Satou, T. (2011b). Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves cerebral function following rat traumatic brain injury. *Journal of Neural Transmission*, *118*(9), 1263–1272.
- Jacotte-Simancas, A. (2013). *La citicolina y el ejercicio físico revierten el déficit en la memoria de reconocimiento de objetos en ratas con daño cerebral traumático*. Instituto de Neurociencias. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Jacotte-Simancas, A., Costa-Miserachs, D., Torras-Garcia, M., Coll-Andreu, M., & Portell-Cortés, I. (2013). Effect of voluntary physical exercise and post-training epinephrine on acquisition of a spatial task in the Barnes maze. *Behavioural Brain Research*, *247*, 178–181.
- Koehler, R., Wilhelm, E., & Shoulson, I. (2011). Cognitive rehabilitation therapy in traumatic brain injury. *Lancet*, *378*(9801), 1440.
- Langdon, K. D., & Corbett, D. (2012). Improved working memory following novel combinations of physical and cognitive activity. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, *26*(5), 523–532.

- Lee, C. Do, Folsom, A. R., & Blair, S. N. (2003). Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 34(10), 2475–2481.
- Liu, Y.-F., Chen, H., Wu, C.-L., Kuo, Y.-M., Yu, L., Huang, A.-M., Jen, C. J. (2009). Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *The Journal of Physiology*, 587(13), 3221–3231.
- Loron-Sánchez, A. (2012). *Facilitación de la memoria de reconocimiento de objetos mediante la administración de adrenalina postentrenamiento, en animales con daño cerebral traumático*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Ming, G., & Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 70(4), 687–702.
- Mota B.C., Pereira L., Souza M.A., Silva L.F., Magni D.V., Ferreira A.P., Oliveira M.S., Furian A.F., Mazzardo-Martins L., Duarte da Silva, M., Santos, A.R., Ferreira, J. Fighera M.R. et Royer, L.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.
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2009). The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Progress in Neurobiology*, 89(4), 369–382.
- O'Connor, W. T., Smyth, A., & Gilchrist, M. D. (2011). Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacology & Therapeutics*, 130(2), 106–113.
- Prieto, R., Pascual, J. M., Roda, J. M., Cerdán, S., & Barcia, J. M. J. A. (2009). Modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico, *Neurocirugía*, 20, 225–244.
- Redila, V. a, & Christie, B. R. (2006). Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience*, 137(4), 1299–307.
- Ríos-Lago, M., Muñoz-Céspedes, J. M., & Paúl-Lapedriza, N. (2007). Alteraciones de la atención tras daño cerebral traumático : evaluación y rehabilitación. *Revista de neurología*, 44(5), 291–297.
- Roozenbeek, B., Maas, A. I. R., & Menon, D. K. (2013). Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nature Reviews. Neurology*, 9(4), 231–236.
- Saha, B., Jaber, M., & Gaillard, A. (2012). Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, (6), 14.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch T., Rueden S., Saalfeld C., Schmid S., Tinevez B., White JY., Hartenstein, D.J., Eliceiri V., Tomancak K., Pavel-Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Van Praag, H. (2009). Exercise and the brain: something to chew on. *Trends in Neurosciences*, 32(5), 283–290.

- Van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., & Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(23), 13427–13431.
- Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *The European Journal of Neuroscience*, *20*(10), 2580–2590.
- Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews. Neuroscience*, *14*(2), 128–142.
- Zhang, F., Wu, Y., & Jia, J. (2011). Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. *Neuroscience*, *177*, 170–176.



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias de la Salud

Unidad de Psicobiología

Universidad Autónoma de Barcelona

¿Puede el ejercicio físico previo a una lesión cerebral traumática reducir el déficit de memoria asociado a dicha lesión?

Nota de prensa

Las personas físicamente activas podrían sufrir menores secuelas después de un traumatismo cerebral

- **Un estudio llevado a cabo con ratas sugiere que el ejercicio físico realizado antes de una lesión cerebral podría reducir sus secuelas.**
- **La lesión cerebral traumática afecta a unos 10.000.000 de personas en el mundo y es la principal causa de discapacidad en menores de 40 años.**
- **Concretamente, el ejercicio contribuiría a un menor deterioro de la memoria a corto plazo.**

El departamento de Psicobiología de la Universidad Autónoma de Barcelona ha llevado a cabo un estudio con ratas, en el que se ha demostrado que la realización de ejercicio físico durante un periodo previo a una lesión cerebral traumática puede reducir el déficit de memoria a corto plazo producido por dicha lesión. Los efectos protectores del ejercicio físico frente al declive cognitivo asociado al envejecimiento, así como su capacidad para retrasar la aparición de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer son bien conocidos, pero hasta el momento ningún laboratorio había estudiado el papel preventivo que el ejercicio podía tener frente a una lesión cerebral traumática.

El experimento consistió en permitir que un grupo de ratas tuviera acceso a una rueda de actividad durante aproximadamente dos semanas; después se les practicaba una intervención quirúrgica, bajo anestesia, en la que recibían una lesión cerebral por impacto cortical controlado, y finalmente, después de un periodo post operatorio de 17 días, se evaluaba su memoria a corto y largo plazo mediante una tarea llamada *memoria de reconocimiento de objetos*. Esta tarea se basa en la tendencia natural de los roedores por explorar objetos novedosos. La memoria se evaluaba a partir del tiempo que los animales dedicaban a explorar un objeto desconocido en comparación a un objeto que se les había presentado 3 h o 24 h antes. Paralelamente, se evaluaba la memoria de otro grupo de ratas cuya única diferencia con las primeras era que no habían tenido acceso a la rueda de actividad, esto es, no habían realizado ejercicio físico.

En la prueba a corto plazo, los resultados mostraron que el grupo de ratas que realizó ejercicio durante el periodo previo a la lesión exploraban durante más tiempo los objetos desconocidos que los que ya conocían. En cambio, este patrón no se observó en los animales del grupo sedentario, sugiriendo que fue el ejercicio físico realizado antes de la lesión el factor que contribuyó a reducir el déficit de memoria. El experimento también ha demostrado que el ejercicio físico puede atenuar la ansiedad que acompaña al daño cerebral traumático.

Aunque estos hallazgos son preliminares puesto que se han obtenido en una muestra pequeña, en caso de confirmarse, tendrían importantes implicaciones a nivel sanitario, puesto que permitiría realizar pronósticos más precisos en pacientes que acaban de sufrir un traumatismo cerebral, así como el diseñar planes de recuperación más personalizados, en función del historial de ejercicio físico del paciente. Por otro lado, este dato se suma a la larga lista de estudios que demuestran la importancia de un estilo de vida activo y sería un dato a tomar en cuenta por los organismos responsables de llevar a cabo campañas de prevención y promoción de la salud y el ejercicio físico.



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias de la Salud

Unidad de Psicobiología

Universidad Autónoma de Barcelona

¿Puede el ejercicio físico previo a una lesión cerebral traumática reducir el déficit de memoria asociado a dicha lesión?

Resumen ejecutivo

Introducción

El daño cerebral traumático (TBI) es una de las causas más comunes de discapacidad en la población afectando aproximadamente a 10 millones de personas en todo el mundo (Institute of Medicine, 2011). Gracias a la introducción de mejoras en el tratamiento agudo se ha conseguido reducir la mortalidad, aunque este tipo de lesiones acostumbran a generar secuelas crónicas que resultan altamente incapacitantes para el sujeto y afectan tanto a su calidad de vida como a su entorno familiar y suponen un alto coste para los sistemas sanitarios. Estas secuelas consisten en déficits cognitivos, cambios de personalidad o trastornos psiquiátricos. Los déficits cognitivos más frecuentes son las alteraciones atencionales y en las funciones ejecutivas así como déficits mnésicos. Los tratamientos dirigidos a la reducción de estas secuelas a día de hoy son limitados y presentan resultados parciales.

Un tratamiento que podría ser útil es el ejercicio físico realizado de manera regular, ya que se ha comprobado que no sólo es beneficioso para la salud física, sino también para las funciones cognitivas presentando efectos neuropotenciadores y neuroprotectores tanto en humanos como en modelos animales. Varias investigaciones han observado que el ejercicio protege de la pérdida cognitiva asociada a la edad (Etgen et al., 2010), y puede servir como factor preventivo frente al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Andel et al., 2008),) o los accidentes cerebrovasculares (Lee, Folsom & Blair, 2003). En cuanto a los traumatismos cerebrales, se ha visto que el ejercicio realizado de forma preventiva reduce la inflamación y la muerte celular asociadas al trauma posterior (Mota et. al, 2012), pero no existen estudios sobre sus efectos a nivel cognitivo.

Teniendo en cuenta la importante relación que parece tener el ejercicio sobre la neuroprotección, hemos considerado relevante la realización de un estudio piloto partiendo de la hipótesis siguiente: el ejercicio físico previo a una lesión cerebral traumática tiene efectos neuroprotectores, que pueden reducir los efectos de ésta a nivel conductual.

Los objetivos concretos que nos hemos planteado han sido:

1. Estudiar si el ejercicio físico previo a una lesión traumática moderada reduce el déficit mnésico a corto (3 horas) y/o largo plazo (24 horas).
2. Determinar si existe una relación entre la cantidad de ejercicio físico previo a dicha lesión y el recuerdo a corto y/o largo plazo.

Para contrastar nuestra hipótesis y dar respuesta a los diferentes objetivos hemos realizado un estudio piloto en un modelo animal de lesión cerebral traumática por impacto cortical controlado. Para evaluar el déficit mnésico se siguió el paradigma de memoria de reconocimiento de objetos. Esta tarea puede utilizarse como un modelo de memoria episódica, la cual suele quedar afectada después de un traumatismo cerebral. Además, resulta un tipo de

memoria poco costosa y fácil de evaluar debido a la tendencia exploratoria natural del animal, y puede aplicarse se forma equivalente en personas.

Este proyecto va dirigido, por un lado, a todas aquellas instituciones sanitarias interesadas en la prevención de traumatismos cerebrales, ya que el ejercicio previo a una lesión cerebral traumática podría suponer una posible herramienta preventiva de déficit cognitivo, además de promover la salud física y un estilo de vida saludable.

Por otro lado, también va dirigido a aquellas fundaciones interesadas en la investigación de nuevos tratamientos y factores relacionados para atenuar las secuelas para este tipo de problemática puesto que sería necesario seguir indagando en esta línea ya que de esta forma se podrían valorar de forma más precisa a los pacientes y así delimitar mejor los diferentes pronósticos y los tratamientos posteriores en función de sus características personales.

Metodología

Para la realización de este estudio piloto se contó con una muestra de 9 ratas Wistar que se asignaron aleatoriamente a un grupo con ejercicio o sedentarismo. Los animales con ejercicio tuvieron acceso libre a una rueda de actividad durante 17 días. Una vez finalizado el programa de ejercicio, ambos grupos se sometieron a una intervención quirúrgica en la que se les practicó una lesión cerebral traumática por impacto cortical controlado, que consiste en un aparato con un pistón que realiza una lesión moderada afectando el córtex y la formación hipocampal.

Pasadas dos semanas después de la lesión, se realizó la prueba de memoria de reconocimiento de objetos.

En primer lugar, se realizaban dos sesiones de habituación a la jaula de aprendizaje para que el animal se familiarizase con el entorno. A continuación, se aplicaba una prueba de neofobia en la que se colocaba una pieza compleja de Lego, que servía para determinar el grado de ansiedad del animal hacia un objeto nuevo en un entorno familiar. Finalmente, se realizaba propiamente la tarea de reconocimiento de objetos, consistente en una sesión de adquisición de 15 minutos, en la que se colocaba al animal con dos objetos idénticos y se le dejaba explorar libremente, y dos pruebas de memoria, la primera a las 3 horas y la segunda a las 24 horas de la prueba de adquisición. En cada una de ellas, se mostraba uno de los objetos familiares (presentado durante la sesión de adquisición) y un objeto nuevo, diferente para cada sesión de retención, y se medía el tiempo dedicado a explorar cada objeto. En estas sesiones, se calculó el índice de discriminación (% de tiempo de exploración del objeto nuevo dividido entre el tiempo de exploración total), según el cual un índice siendo necesario que fuera superior a 0 para considerar que recordaron.

Resultados

En la prueba de neofobia, los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre el grupo ejercicio y el sedentario [$U= 1.000$, $z = -2,214$, $p = 0.027$]. De forma que, el ejercicio fue un factor relevante para reducir la reactividad emocional asociada al TBI.

En la primera retención, una vez eliminado un sujeto outlier, los resultados mostraron que los animales del grupo con ejercicio recordaron el objeto familiar ($p=0,009$) mientras que los sedentarios no. En cambio, en la retención a las 24 horas ninguno de los grupos recordó el objeto familiar.

Consideraciones e implicaciones

Los resultados obtenidos sugieren que el ejercicio físico realizado durante un período previo a un traumatismo cerebral parece revertir el déficit de memoria a corto plazo ya que el grupo con ejercicio mostró que recordaba el objeto familiar en la primera retención mientras que el grupo sedentario no. Por el contrario, en la segunda retención ninguno de los grupos recordó el objeto familiar lo que sugiere que el ejercicio previo no tiene la capacidad de revertir el déficit de memoria a largo plazo. Cabe decir que sería importante estudiar si con una mayor duración del programa de ejercicio se obtendrían mayores beneficios. Por ejemplo, el estudio realizado por Mota et al. (2012) mostró que a nivel molecular se dieron efectos antiinflamatorios y una menor muerte neuronal después de 4 semanas de ejercicio (Mota et al. 2012).

Los resultados obtenidos en este estudio no permiten establecer conclusiones definitivas debido al limitado tamaño muestral y a la falta de grupos control. Pese a ello, y de confirmarse en una muestra mayor y con un grupo control, el ejercicio físico previo podría ser una herramienta preventiva para los déficits asociados de memoria a corto plazo.

En cuanto a la neofobia, parece ser que el ejercicio previo reduciría la reactividad emocional revirtiendo el efecto de la lesión. Sería muy interesante realizar una investigación con un grupo no lesionado para comprobar si la lesión aumenta la ansiedad, y poder dilucidar si el ejercicio es capaz de reducir este efecto de la lesión.

Esta nueva línea de investigación supondría un campo muy prometedor dado que el ejercicio físico normalmente se asocia a una mejor salud física y se dejan en segundo plano los beneficios cognitivos cuando éstos son uno de los efectos más importantes para la salud de la población general. Sería interesante continuar con este plan ya que el ejercicio como tratamiento preventivo parece ser una buena herramienta para la prevención no solo de diferentes enfermedades sino que también tendría efectos neuroprotectores importantes sobre los efectos posteriores de las lesiones cerebrales traumáticas. Con estudios de este tipo no sólo se

promociona la salud física sino que también se concientiza a la sociedad de la importancia de seguir un estilo de vida activo para mantener las funciones cognitivas. Además, contribuyen a desarrollar nuevas estrategias para afrontar un problema tan grave como suponen los traumatismos cerebrales ya que podrían aplicarse diferentes planes de promoción del ejercicio como herramienta para prevenir posibles alteraciones cognitivas. Como ya se ha indicado previamente, también sería útil en el ámbito sanitario y clínico porque ayudaría a ajustar el pronóstico que presentarían los pacientes teniendo en cuenta diferentes factores individuales y así personalizar sus tratamientos.