



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCION NEUROCIENCIAS**

**EFECTO DE UNA RUTINA DE EJERCICIO FÍSICO SOBRE LA FUNCIÓN
COGNITIVA DE RATONES ENVEJECIDOS**

Ronakarina Pires Valero

**Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

Director de Tesis:

Prof. Dr. Gonzalo Cruz

Co-Directores de Tesis:

Prof. Dra Paola Llanos

Prof. Dr Gonzalo Jorquera

Contenido

Resumen.....	4
Introducción.....	6
1.- Incremento del envejecimiento en la población.....	6
2.- Relación entre la función muscular y cognitiva durante el envejecimiento.	7
3.- Evaluación de la memoria en modelos animales.	9
4.- El entrenamiento físico como herramienta para mejorar la adquisición y consolidación de memoria en el envejecimiento	12
Hipótesis.....	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos	14
Metodología.....	15
Animales.....	15
Protocolo de Ejercicio	15
Tests de evaluación muscular:	16
Pruebas de Comportamiento:.....	16
Evaluación del estrés causado por el protocolo de ejercicio.....	17
Análisis Estadístico	17
RESULTADOS	18
1.- El ejercicio físico disminuye el peso corporal en los ratones entrenados y la masa grasa asociada al epidídimo.....	18
2.- Una rutina crónica de ejercicio mejora las capacidades físicas de resistencia y fuerza muscular en los animales envejecidos.	19
3.- La rutina de ejercicio crónico no indujo ansiedad en los animales entrenados.....	20
4.- La rutina crónica de nado forzado mejoró la memoria a corto plazo en la prueba OL y la memoria a largo plazo en la prueba OiP en ratones envejecidos	21
5.- Correlación entre las variables musculares y variables cognitivas	23

Discusión	26
Conclusión	28
Referencias Bibliografía.....	29
Anexo	37

Resumen

El envejecimiento es un proceso degenerativo, progresivo y dependiente del tiempo que afecta la calidad de vida de los individuos. Sin embargo, el ejercicio físico ha demostrado ser un estímulo que disminuye los efectos negativos de este proceso. Uno de los tejidos más afectados durante el envejecimiento es el tejido nervioso, en el cual ocurre un deterioro cognitivo, una disminución en la capacidad de aprendizaje y el almacenamiento de la memoria, y alteraciones en la actividad locomotora, entre otros. Tanto el hipocampo como la corteza prefrontal que participan en la memoria de reconocimiento de objetos han sido ampliamente estudiada en animales jóvenes, pero existen escasos estudios en animales envejecidos y entrenados. El objetivo de este estudio fue evaluar si el incremento en la fuerza y resistencia muscular inducidos por una rutina de ejercicio crónico en ratones C57BL6/J envejecidos, permite mejorar la consolidación de la memoria de reconocimiento. Para lograr este objetivo se utilizaron 12 ratones C57BL6 envejecidos de 16 meses de edad, los cuales se dividieron y estudiaron en dos condiciones físicas. Un primer grupo sedentario (n=6) y el segundo grupo que fue entrenado físicamente con nado forzado (n=6). El protocolo de ejercicios se realizó 60 min/día, 5 días/semana durante 8 semanas. Se registró el peso corporal semanalmente y se realizaron pruebas neuromusculares mediante test de resistencia y fuerza. Además, se realizaron evaluaciones cognitivas mediante dos test de reconocimiento de objetos (*Object location*, *Object-in-place*), adicionalmente se evaluó la ansiedad de los ratones por el test de *Open field*. El peso de los animales entrenados disminuyó significativamente un $10,1 \pm 1,5\%$ con respecto al grupo sedentario. La resistencia muscular aumentó en $115,8 \pm 26,6$ s/g en los animales entrenados mientras que disminuyó $14,6 \pm 23,7$ s/g en los animales sedentarios. También se observó un aumento de la fuerza muscular, en los animales entrenados, alcanzando incrementos de $31,1 \pm 8,0$ g en el peso levantado comparado al inicio del estudio, mientras que el grupo control levantó $29,6 \pm 13,9$ g menos que al inicio. Se encontraron diferencias significativas en los tiempos de exploración del test *Object Location* (OL) con 1 h de desfase, en el cual los animales entrenados exploraron los objetos durante $61,0 \pm 4,2$ s, mientras que los no entrenados emplearon $37,5 \pm 6,3$ s en la exploración; y en el test *Object-in-Place* (OiP) con 48 h de desfase los animales entrenados obtuvieron un tiempo de exploración de objetos de $147,5 \pm 16,1$ s y los no entrenados de $78,3 \pm 8,2$ s. Por último, se encontró una correlación positiva entre la fuerza muscular y la memoria a corto plazo en OL, y una correlación positiva entre la resistencia y fuerza muscular con la memoria a largo plazo en OiP. En este trabajo concluimos que la rutina de ejercicios crónico de nado forzado mejoró las condiciones musculares de los animales envejecidos aumentando su fuerza y resistencia, lo cual tuvo una influencia positiva sobre la memoria de reconocimiento de los individuos entrenados.

Palabras claves: envejecimiento, memoria, función muscular, resistencia muscular, fuerza muscular, ejercicio crónico.

Introducción

Desde el punto de vista biológico, el envejecimiento es la sumatoria gradual de una gran diversidad de daños moleculares y celulares acumulados en la vida¹. Conforme transcurre el tiempo, estos daños acumulados provocan la disminución progresiva de la capacidad de respuesta de los individuos, la capacidad de regeneración de los tejidos, la actividad motora y la memoria, entre otros². El envejecimiento según la Organización para la Cooperación del Desarrollo Económico (OECD, según siglas en inglés) se define como un conjunto de cambios fisiológicos, morfológicos y psicológicos que ocurren en los individuos de edades avanzadas².

1.- Incremento del envejecimiento en la población.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que la población mayor de 60 años está en constante crecimiento, y que para el año 2050 alcanzará los 2000 millones de personas (Figura 1A). También se reporta que la población octogenaria es aquella que presenta mayor crecimiento dentro de este grupo, pues se estima que llegará a 400 millones de personas a nivel mundial³. Tomando como referencia el reporte de “Síntesis de estimaciones y proyecciones de la población chilena”, basado en los datos obtenidos en el Censo del 2017 realizado por el Instituto Nacional de Estadísticas (INE) (Figura 1B), se observó que la población chilena mayor de 60 años representa más del 16% total del país y que en los próximos años la población mayor de 80 años experimentará un importante crecimiento respecto a los demás grupos etarios, incluso será mayor que la población infantil a partir del 2029⁴. Según el INE, en el año 2050 la población mayor de 64 años representará un 43% del total, evidenciando un crecimiento precipitado y sostenido del envejecimiento en Chile⁴.

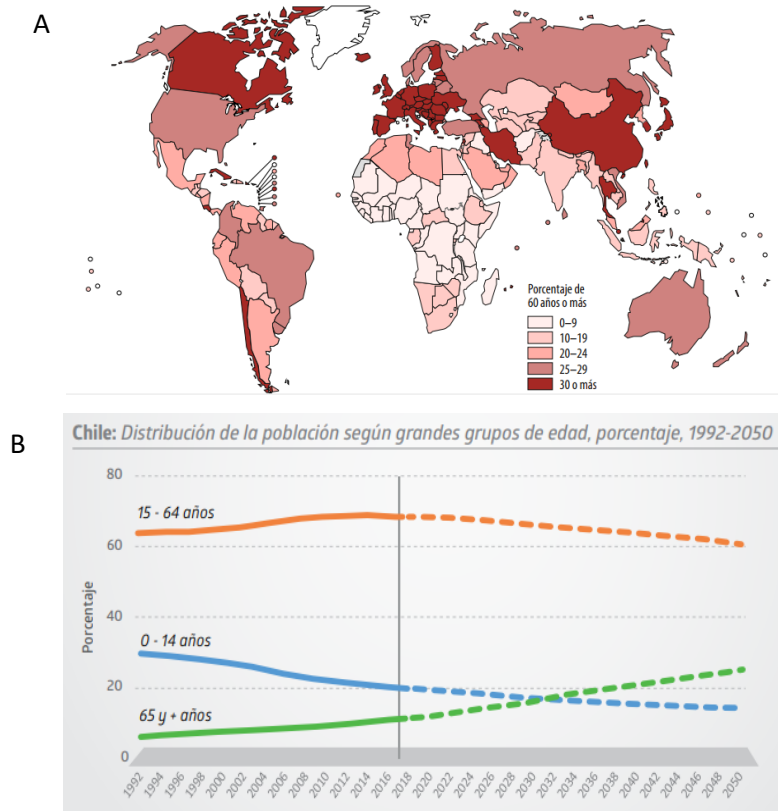


Figura 1. (A) Proporción de personas de 60 años o más, proyecciones para 2050. **Tomada de:** Reporte de OMS, 2015³. (B) Distribución de la población según grupos de edad, desde 1992-2050. **Tomada de:** Reporte de “Síntesis de estimaciones y proyecciones de la población chilena” realizada por INE en 2019⁴.

2.- Relación entre la función muscular y cognitiva durante el envejecimiento.

A nivel muscular, la sarcopenia es una de las condiciones patológicas más frecuentes durante el envejecimiento, la cual está caracterizada por la pérdida progresiva de masa y fuerza muscular asociada a la edad⁵. Hábitos de vida como el sedentarismo⁶, mala alimentación⁷ y aumento en la masa grasa del individuo mayor^{1,5} favorecen la aparición de sarcopenia, y a su vez estos mismos hábitos están asociados a problemas mentales como déficit cognitivo y depresión en el adulto mayor, razón por la que actualmente se propone que la sarcopenia mantiene una estrecha relación con procesos degenerativos a nivel mental en individuos envejecidos⁶. De hecho, algunos estudios epidemiológicos han demostrado la coexistencia entre ambas patologías⁸⁻¹⁰. Distintas investigaciones están evaluando si la

aplicación de rutinas de actividad física diseñadas para mejorar la fuerza muscular en personas envejecidas puede ayudarlos a compensar la pérdida de habilidades cognitivas⁵.

En el cerebro, a nivel celular el envejecimiento se caracteriza por un incremento en el estrés oxidativo que aumenta en el daño a proteínas, DNA y lípidos^{11,12}; además hay un declive importante en la función mitocondrial alterando el metabolismo energético^{11,13} que influye sobre las proteínas que intervienen en la excitabilidad neuronal, en la sinapsis y en la plasticidad neuronal afectando procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria, así como en la motricidad del individuo¹⁴⁻¹⁶. Además, afectan los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos, colinérgicos y señalización neurotrófica, los cuales están asociados a procesos de aprendizaje y recompensa¹⁷.

Por otro lado, en el cerebro el aumento en la inflamación de bajo grado asociado al envejecimiento (*Inflammaging*)¹⁸ se ha observado que afecta la inducción de LTP, la producción de moléculas neuro-protectoras como el BDNF, la plasticidad sináptica^{18,19}, favoreciendo enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la Depresión²⁰⁻²³. A su vez el sistema inmune periférico también afecta la inflamación neuronal a nivel central, puesto que las citosinas pro-inflamatorias producidas por linfocitos T y monocitos atraviesan la barrera hematoencefálica^{18,24}. Otro factor que favorece el daño neuronal durante el envejecimiento es la disminución en la expresión de protectores celulares como BDNF e Irisina²⁵⁻²⁷.

Los cambios cognitivos más frecuentes asociados a la edad se relacionan con la pérdida de la memoria, de la atención y disminución en la velocidad de procesamiento de la información^{24,28,29}. En otras palabras, en edades avanzadas hay una menor capacidad para aprender, para generar nueva memoria, para dominar tareas que impliquen manipulación, reorganización, integración o una participación activa de varios elementos de la memoria³. Sin embargo, funciones cognitivas relacionadas con el lenguaje, como el vocabulario que la persona aprendió, la capacidad de leer y de comprender, no siempre se ven afectadas porque tienden a mantenerse estables a lo largo de la vida³⁰ (figura 2). Algunas de las enfermedades neurodegenerativas más asociadas al envejecimiento son Alzheimer, depresión y Parkinson^{26,27}.

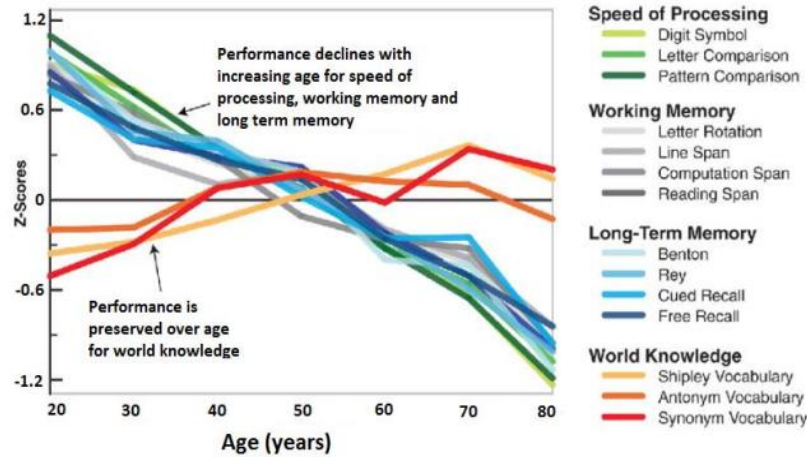


Figura 2. Efecto del envejecimiento en las funciones cognitivas de personas envejecidas evaluando la velocidad de procesamiento, memoria de trabajo, memoria a largo plazo y conocimientos sobre las palabras. Tomado desde Glorioso y cols., 2011³¹.

Evaluando el efecto del envejecimiento sobre la memoria, el grupo liderado por la Dra. Cecilia Hidalgo utilizó la técnica de memoria de reconocimiento a corto (5 minutos de desfase) y largo plazo (24 horas de desfase) en ratas Sprague Dawley envejecidas (18-24 meses), y observaron que a corto plazo los animales respondían favorablemente el test, pero cuando el desfase es de 24 horas presentaban dificultad para responderlo^{32,33}. Adicionalmente, Wimmer y cols., estudiando el efecto del envejecimiento sobre la memoria de reconocimiento de objetos a nivel hipocampal en animales jóvenes (2-4 meses) y envejecidos (18 meses), encontraron que las ratas envejecidas en la prueba de memoria hipocampal respondían al mismo nivel que las ratas jóvenes cuando el desfase es de 3 minutos, pero cuando el desfase es de 24 h las ratas envejecidas presentaban deficiencia en la memoria, mostrando que el envejecimiento afecta la memoria a largo plazo³³.

3.- Evaluación de la memoria en modelos animales.

Entender la neurobiología de la memoria, los componentes que forman parte del circuito, cómo estos se comunican entre sí y cómo el envejecimiento o enfermedades alteran este circuito ha significado un reto para los investigadores que todavía no han logrado descifrar en su totalidad³⁴. El aprendizaje y la memoria son funciones complejas que dependen de diversas estructuras del sistema nervioso central encargadas de procesar y almacenar la información, entre ellas está la corteza pre-frontal y el hipocampo. Basándose en el tiempo

de almacenamiento la memoria puede ser clasificada como de corto o largo plazo: la memoria a corto plazo ocurre en un lapso de minutos durante los cuales la información está disponible y puede ser eliminada o transferida al sistema de almacenamiento de largo plazo. La memoria a largo plazo se refiere al almacenamiento, manejo y recuperación de la información en un período largo de tiempo que puede abarcar desde días hasta años³⁵⁻³⁷

La memoria de reconocimiento se refiere a la habilidad de recordar eventos y hechos que ocurrieron en un determinado lugar y tiempo, y que a su vez modulan el comportamiento³⁸. En este sentido los modelos de estudio en animales han permitido avanzar en el área. Los primeros intentos de estudio de memoria de reconocimiento en roedores se basaron en tareas de recompensa (tareas coincidentes - no coincidentes); inicialmente estas tareas se ejecutaban con varias sesiones de entrenamiento y privando al animal de alimentos, esto último afectaba su motivación para resolver las tareas, por lo que se desarrolló una tarea de reconocimiento espontáneo de objetos (SOR, por sus siglas en inglés) la cual se basa en la tendencia natural de los roedores para explorar objetos novedosos con mayor frecuencia que los objetos familiares^{39,40}.

Este tipo de tareas tiene como principio fundamental la memoria formada por preferencia de la novedad, lo cual se logra creando condiciones no coincidentes entre la fase de aprendizaje y la fase de evaluación^{35,40}. Mediante implementos sencillos y accesibles se han desarrollado distintas variantes de estas tareas que tienen en cuenta los diferentes tipos de memoria y los diferentes componentes neurobiológicos que participan en la resolución de las mismas, lo cual ha ayudado a entender que la complejidad de las mismas en los modelos animales se asemeja a la memoria de reconocimiento en humanos³⁷. Dos de las tareas de reconocimiento de objetos estudiadas en este proyecto son (Figura 3):

- Reconocimiento de Localización de objeto (Object Location, *OL*): Esta tarea mide la habilidad de detectar el desplazamiento de un objeto en una posición familiar a un lugar nuevo. En esta tarea los roedores son expuestos a dos objetos idénticos en una posición particular, y durante la fase exploratoria, uno de los objetos es removido a una posición nueva. Este tipo de test se usa para evaluar la participación del hipocampo en la memoria de reconocimiento de objetos^{32-35,40} ya que el cambio de ubicación espacial en los objetos induce más exploración en aquel que se encuentra en la nueva posición respecto a la

posición familiar actuando directamente sobre la activación del hipocampo en la memoria espacial de reconocimiento³⁵.

La memoria espacial es aquella que está relacionada con mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de mapas y localizaciones espaciales; durante el envejecimiento este tipo de memoria se ve fuertemente afectada²⁸. En un estudio en humanos utilizando adultos jóvenes (media de 21 años) y personas sanas envejecidas (media de 78 años), estos últimos demostraron tener una capacidad espacial disminuida para localizar puntos específicos en el mapa³⁶. Este mismo déficit en la memoria espacial ha sido observado en ratas envejecidas mediante este test^{29,41}.

- Reconocimiento de Objeto en el Lugar (Object-in-Place, OiP): En esta tarea los animales deben discriminar entre objetos familiares que han sido intercambiados de posición. En la fase exploratoria se usan cuatro objetos diferentes ubicados en cuatro posiciones, luego en la fase de evaluación dos de esos objetos son intercambiados entre sí ocupando una nueva posición. Barker y cols., demostraron que este test permite evaluar la participación de la corteza pre-frontal en la memoria de reconocimiento^{34,35} puesto que esta corteza está relacionada con funciones como la toma de decisiones, asociación entre objetos o eventos, entre otras, y con esta tarea los ratones deben reconocer los objetos cambiados de posición y asociar este cambio a una nueva relación con los objetos familiares que mantienen su posición original³⁵.

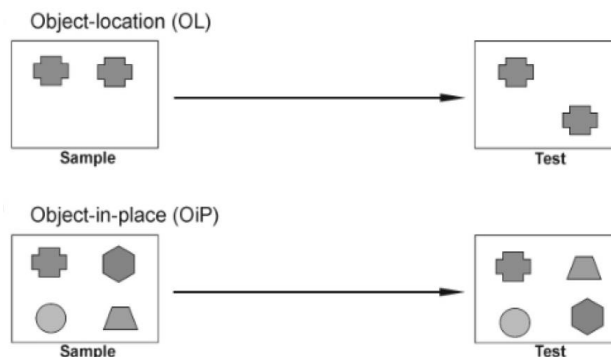


Figura 3. Tareas que permiten evaluar memoria de reconocimiento de objetos. *Fuente: Morici y col., 2015*

En la memoria de reconocimiento está descrito un circuito que comunica a la corteza pre-frontal, la corteza perirrinal y el hipocampo^{34,35,37,42}. La corteza perirrinal es esencial en la exploración y conocimiento de objetos novedosos, lesiones en esta corteza afecta tareas como el reconocimiento de objetos y la prueba Object in Place (OiP)³⁷. El hipocampo participa en la ubicación o reubicación espacial de los objetos, lesiones en la formación hipocampal afectan tareas como el Object Location, orden temporal y OiP³⁷. La corteza pre-frontal es requerida para establecer relaciones en la secuencia u orden en la presentación de los objetos, lesiones en esta corteza afectan las pruebas de OiP y orden temporal³⁷. Por su parte, la corteza perirrinal y la pre-frontal interactúan entre sí en pruebas como OiP, donde la corteza pre-frontal recibe información proveniente de la corteza perirrinal respecto al “Qué” del objeto; mientras que el hipocampo provee la información de “Dónde”, y conjuntamente con la corteza pre-frontal procesan el “Cuándo”^{35,37}.

4.- El entrenamiento físico como herramienta para mejorar la adquisición y consolidación de memoria en el envejecimiento

En estudios con animales, el ejercicio físico ha demostrado ser un factor que induce cambios a nivel celular favoreciendo procesos como la neurogénesis⁴³. A nivel molecular altera los sistemas de neurotransmisión e incrementa la producción de factores protectores como el BDNF^{43,44}, irisina²⁷ y disminuye niveles de componentes inflamatorios como el inflamasoma NLRP3 en el hipocampo el cual está aumentado en el envejecimiento y está asociado a enfermedades neurodegenerativas²⁰. Estos cambios moleculares tienen influencia en el sistema nervioso central modulando procesos como el aprendizaje, la memoria, el estado de ánimo, densidad dendrítica, entre otros^{9,42}. A nivel del comportamiento, se ha estudiado la influencia del ejercicio físico sobre la memoria espacial en animales jóvenes y envejecidos mediante distintas técnicas de aprendizaje y memoria^{42,45,46}.

Distintos estudios señalan el efecto positivo que tiene el ejercicio físico sobre el aprendizaje y la memoria tanto en personas sanas^{47,40} como en pacientes y modelos animales con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer^{45,48,49}. A su vez, se ha observado que el ejercicio físico puede ser usado como un tratamiento no invasivo en personas de la tercera edad para evitar o disminuir la incidencia de demencia senil^{50,51}. Adicionalmente,

se ha encontrado que la práctica continua de ejercicio físico promueve la proliferación neuronal en los hipocampos de animales envejecidos, la adquisición cognitiva y la mejora en los procesos de aprendizaje y memoria^{52,53}.

Para comprender la relación entre el ejercicio físico y su efecto en el cerebro, se ha estudiado tanto el ejercicio aeróbico y anaeróbico y la mejora en el aprendizaje y la memoria de los individuos⁵⁴⁻⁵⁶. En un estudio en humanos encontraron que los individuos que fueron sometidos a entrenamientos aeróbico tenían incrementados los marcadores de angiogénesis y un mayor flujo sanguíneo respecto a los que hacían ejercicio anaeróbico⁵⁴, en estudios con animales, ésta angiogénesis ha sido relacionada con la neurogénesis adulta⁵⁵. En modelos animales con ratones envejecidos se ha observado un incremento en la neurogénesis adulta, plasticidad sináptica, memoria espacial en aquellos individuos sometidos a ejercicio en la trotadora⁵⁴⁻⁵⁶. Lourenco y cols., recientemente estudiaron en un modelo de ratones transgénicos para Alzheimer el efecto de una rutina de nado forzado sobre el reconocimiento de objetos en animales jóvenes, para esto aplicaron la rutina de nado durante seis semanas, una hora diaria, cinco días a la semana, y mediante el test de reconocimiento de objetos novedosos, encontraron que la rutina de ejercicios mejoró la memoria de reconocimiento de objetos en los ratones entrenados respecto a los sedentarios²⁷. Por otra parte, Zarrinkalar y cols., evaluando el impacto del tipo de ejercicio sobre el aprendizaje y la memoria en ratas dependientes de morfina entre rutinas de entrenamiento de resistencia, fuerza o ejercicios combinados (fuerza y resistencia) durante 10 semanas, encontraron que si bien todos los regímenes de ejercicios ayudaban a restablecer las funciones cognitivas en los individuos dependientes de morfina, esto no implicaba que estas rutinas tuviesen el mismo impacto sobre funciones cognitivas como memoria y el aprendizaje, puesto que las ratas que tenían regímenes de ejercicio combinados o aeróbicos se recuperaban en mejor medida que las ratas solo tenían rutinas de ejercicios de fuerza⁵⁶. Aun así es relevante realizar más investigaciones que ayuden a dilucidar el papel del ejercicio sobre el aprendizaje y la memoria en el envejecimiento.

En resumen, los antecedentes disponibles muestran los efectos negativos que tiene el envejecimiento sobre el sistema muscular y procesos cognitivos como la memoria en

animales y humanos. A su vez la evidencia encontrada en la literatura sugiere que el entrenamiento aeróbico puede constituir un factor terapéutico no invasivo que mejore la función neuronal permitiendo una disminución en el deterioro de la memoria a corto o largo plazo durante el envejecimiento⁵⁷, razón por la que en este proyecto se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis

El mejoramiento del desempeño muscular mediante una rutina de ejercicio crónico en ratones C57BL6/J envejecidos, disminuye el deterioro de la memoria de reconocimiento durante el envejecimiento.

Objetivo General

Evaluar si el incremento en la fuerza y resistencia muscular inducido por una rutina de ejercicio crónico en ratones C57BL6/J de 16 meses de edad, permite mejorar la consolidación de la memoria de reconocimiento durante el envejecimiento.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de una rutina de entrenamiento crónico de nado forzado por 8 semanas sobre la fuerza y resistencia muscular en ratones envejecidos.
- Determinar si variaciones en la fuerza y resistencia muscular producto de la rutina de actividad física en ratones C57BL6/J envejecidos se correlaciona con un cambio en el desempeño en las pruebas de reconocimiento de objetos que evalúan la memoria en estos animales.

Metodología

Animales

En este estudio se utilizaron 14 ratones machos C57BL/6J de 14 meses de edad obtenidos desde el Bioterio Central de Animales de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. Los roedores fueron mantenidos en una habitación con temperatura controlada en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas, según el protocolo de bioética #1065, asociado al proyecto FONDECYT de N° 1190406 perteneciente a la Profesora Paola Llanos. Los animales se dividieron en dos grupos.

- **Grupo envejecido entrenado (entrenados).** Constituido por 7 animales que realizaron ejercicio aeróbico de nado forzado. El protocolo de nado forzado aplicado fue: 60 minutos/día, 5 días/semana durante ocho semanas, temperatura del agua $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Las medidas del recipiente fueron 45x15x20 cm con 15 cm de agua. Se les evaluó semanalmente las condiciones musculares mediante pruebas de fuerza y resistencia muscular. Al finalizar el entrenamiento de nado forzado se les aplicaron pruebas de preferencia exploratoria de objetos.
- **Grupo envejecido no entrenado (sedentarios).** Constituido por 7 animales como grupo control que no realizaron ejercicio físico durante todo el experimento. Al igual que el grupo experimental, se evaluaron las pruebas de fuerza y resistencia muscular como también las pruebas de preferencia exploratoria de objetos.

Protocolo de Ejercicio

Ejercicio de nado forzado: El protocolo de nado usado fue una adaptación del empleado por Lourenco y cols.* (2019), los animales se entrenaron 60 minutos/día cinco días a la semana durante 8 semanas⁵⁸. Una semana antes de iniciar el protocolo de entrenamiento, los animales pasaron por un proceso de acondicionamiento o fase de adaptación con el fin de reducir el estrés asociado al ejercicio. Luego de esa semana de adaptación, los animales empezaron a nadar 15 minutos al día, y se aumentó el tiempo de nado progresivamente hasta llegar a los 60 minutos diarios.

Tests de evaluación muscular:

- **Evaluación de resistencia muscular mediante agarre en malla metálica:** este ejercicio también se conoce como *Kondziela's inverted screen test*⁵⁹, y consiste en elaborar un cuadrado con bordes de madera donde una de sus caras está recubierta por una malla metálica. Todos los animales, tanto los entrenados como los sedentarios se evaluaron mediante este test. Los animales fueron puestos en la malla y posteriormente ésta se invirtió a una cierta altura sobre la caja del animal con el fin de que el ratón se sostenga en la malla durante el mayor tiempo posible. Se registró el tiempo que el animal duró sostenido. El tiempo máximo de agarre se estableció en 4 minutos sin caerse. Se estimó el tiempo de agarre del animal/peso corporal del animal.

- **Ejercicio de Levantamiento de Carga Externa:** también se conoce como *grip strength test*⁵⁹. Consistió en utilizar eslabones de cadena metálica de distintas longitudes, la de menor tamaño tenía dos eslabones y a las demás se les aumentó el tamaño progresivamente hasta llegar a 11 eslabones. El ejercicio consistió en tomar la cola de los animales hasta suspenderlos en el aire dejando solo las dos patas delanteras en contacto con una esponja de alambre que fue adaptada a un extremo de la cadena y cuando el animal se agarró firmemente de la esponja, este fue levantado completamente junto con la cadena. Cuando el animal quedó suspendido junto con la cadena se contabilizó hasta tres segundos, y si logró cargar la cadena se evaluó con la siguiente que tenía más peso. Se estimó el peso final que levantó el animal/peso del animal.

Pruebas de Comportamiento:

Se utilizó una caja rectangular de color blanco, con medidas de 65 x 50 x 50 cm con una cámara de video que registró la actividad del animal para su posterior análisis. Los animales fueron habituados a la caja sin recibir ningún estímulo durante 5 minutos antes de iniciar las pruebas de comportamiento.

- **Test de reconocimiento de objetos por localización (*Object Location*):** Los animales se familiarizaron en 1 sesión de 5 minutos y durante este tiempo fueron puestos en el centro de la caja en presencia de dos objetos diferentes. El comportamiento de exploración fue evaluado como cantidad de tiempo que tarda en explorar cada objeto.

Posteriormente, los animales son devueltos a sus cajas y reinsertados nuevamente en el aparato para una evaluación de una hora (corto plazo) y cuarenta y ocho horas (largo plazo) después de la familiarización, pero en esta oportunidad uno de los objetos se cambió de posición. Se midió la cantidad de tiempo que el animal empleó en explorar el objeto en la posición familiar y el objeto en la nueva posición. Los resultados fueron expresados como índice de discriminación entre el porcentaje de tiempo que explora el objeto en la nueva posición respecto al tiempo total de exploración^{34,35}.

- **Test de reconocimiento de objetos por ubicación (*object in place*):** Se usó el aparato conductual para familiarizar a los animales con cuatro objetos distintos ubicados en las cuatro esquinas del aparato en una sesión de 5 minutos. El comportamiento de exploración fue evaluado como cantidad de tiempo que tardó el animal en explorar cada objeto. Posteriormente, los animales fueron devueltos a sus cajas y reinsertados nuevamente en el aparato para una evaluación de una hora (corto plazo) y cuarenta y ocho horas (largo plazo) después de la familiarización, pero en esta oportunidad dos de los objetos se intercambiaron de posición. Se midió la cantidad de tiempo que el animal empleó en explorar los objetos en la posición familiar y los objetos en la nueva posición. Los resultados fueron expresados como índice de discriminación entre el porcentaje de tiempo que explora los objetos en la nueva posición respecto al tiempo total de exploración^{34,35}.

Evaluación del estrés causado por el protocolo de ejercicio

- **Oasis Maze:** consistió de un círculo con diámetro de 1.4 m con paredes de 20 cm de alto, y ubicado a una altura del suelo de 50 cm⁶⁰. El animal fue colocado en el centro del círculo, y con una cámara que estaba ubicada en el parte superior del *oasis maze*, se registró la distancia total recorrida y el tiempo de exploración en el centro como medidas de actividad locomotora durante 5 minutos en una sesión de campo abierto.

Análisis Estadístico

Los resultados de los experimentos fueron expresados como valor promedio \pm error estándar de la media (SEM). Se usaron los tests de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk

para comprobar normalidad. Se usó el test de Mann-Whitney con datos no pareados. Para todos los test se consideró un valor de $p < 0,05$ para indicar diferencias significativas.

RESULTADOS

1.- El ejercicio físico disminuye el peso corporal en los ratones entrenados y la masa grasa asociada al epidídimo.

Ha sido ampliamente reportado que el ejercicio aeróbico promueve la pérdida de peso corporal en los individuos además de favorecer la reducción de grasa abdominal y visceral^{6,61-63}. Con la finalidad de evaluar el entrenamiento físico de nado forzado medimos los parámetros morfométricos como el peso corporal y la grasa epididimal. Como se observa en la Figura 4, los animales entrenados ($n=6$) disminuyeron su peso en $10,1\% \pm 1,5$ mientras que el peso en el grupo sedentario ($n=6$) varió un $0,8 \pm 0,8\%$ (figura 4A). La disminución de peso fue significativamente menor en los animales entrenados con respecto a los no entrenados.

Dado que el envejecimiento favorece la pérdida de masa muscular^{6,64,65} fue necesario determinar si el cambio de peso corporal observado en los animales entrenados se debía a la disminución en la masa grasa del animal, o por el contrario, se debía a pérdida de masa muscular. La relación peso grasa/peso corporal para el grupo ejercitado fue ($n = 6$) de $0,03 \pm 0,0015$ g mientras que para el grupo sedentario ($n = 6$) alcanzó valores de $0,04 \pm 0,004$ g (figura 4B). Estos resultados sugieren que la disminución del peso corporal observada en los animales entrenados se debe principalmente a la pérdida de tejido grasa. En la tabla I del anexo se muestran los resultados obtenidos de la batería de pruebas realizadas a los grupos de estudio.

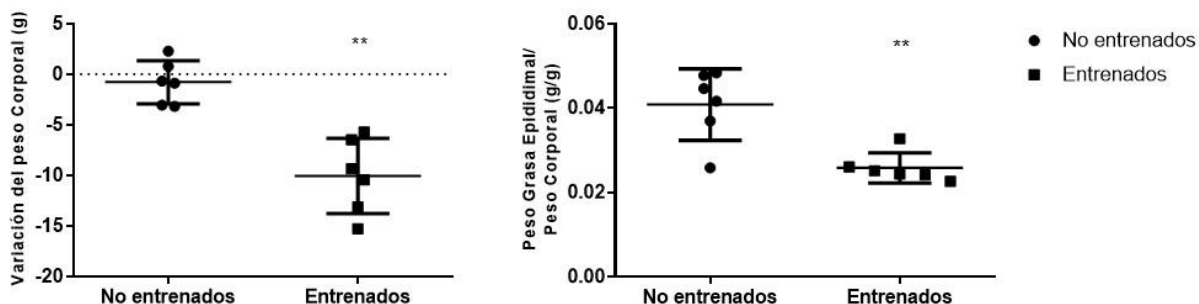


Figura 4. Evaluación del peso corporal de los animales C57BL/6 envejecidos sedentarios y entrenados mediante ejercicio aeróbico de nado forzado. A) Variación del peso corporal. B) Relación entre el peso de la grasa epididimal y el peso corporal. Los resultados se representan como el promedio \pm error estándar de la media. n=6 por grupo. * $p < 0.05$.

2.- Una rutina crónica de ejercicio mejora las capacidades físicas de resistencia y fuerza muscular en los animales envejecidos.

Los cambios plásticos del músculo esquelético son relativamente conservados hasta entrada la vejez, sin embargo, en edades avanzadas el número de fibras musculares disponibles disminuyen significativamente por lo que la función de este tejido se ve afectada^{6,65}. En este sentido se decidió aplicar las pruebas musculares *Kondziela's inverted screen* y Levantamiento de carga externa (Grip Test) para evaluar el efecto que el ejercicio de nado tuvo sobre la función muscular. Como se muestra en la figura 5, tanto en la prueba de resistencia (figura 5A) como la prueba de levantamiento de carga externa (figura 5B) los animales entrenados tuvieron un mejor rendimiento en comparación con aquellos animales sedentarios.

El ejercicio aumentó la fuerza y la resistencia muscular en el grupo ejercitado (n= 6), quienes al finalizar el protocolo de nado sostenían hasta $115,8 \pm 26,62$ s/g de peso corporal más que al inicio del experimento, mientras que el grupo sedentario (n=6) desmejoró su condición muscular puesto que el tiempo sosteniéndose disminuyó en $14,6 \pm 23,7$ s/g de peso corporal respecto al inicio (figura 5A).

Adicionalmente la fuerza muscular de los animales entrenados (n=6) respecto a los sedentarios (n= 6) aumentó significativamente. El grupo experimental levantó hasta $31,1 \pm 8,00$ g/g más carga que al inicio del estudio, mientras que el grupo control levantó $29,6 \pm$

13,88 g/g menos que al inicio del experimento (figura 5B). Ambas pruebas neuromusculares demuestran que el ejercicio de nado forzado ejerció una influencia positiva sobre el tejido muscular de los animales entrenados, esto evidenciado por el aumento reflejado en su fuerza y resistencia.

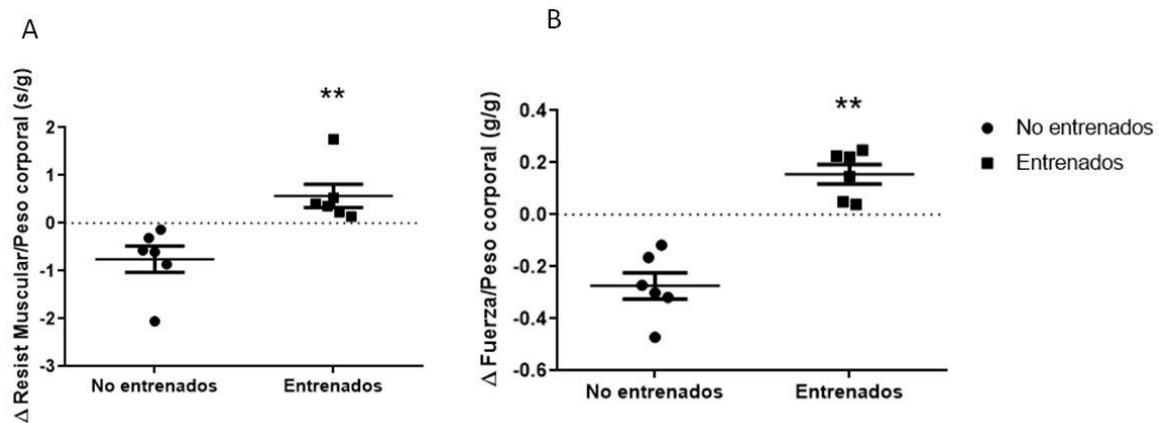


Figura 5. (A) Evaluación de Resistencia Muscular mediante el Test *Kondziela's inverted screen* en ratones C57BL6/J envejecidos entrenados y sedentarios. El cero representa el valor en la semana inicial (B) Evaluación de Prueba de Levantamiento de Carga Externa en animales C57BL6/J envejecidos entrenados y sedentarios. El cero representa el valor en la semana inicial, los demás resultados van respecto a este último. ** $p < 0.05$. Test de Mann-Whitney.

3.- La rutina de ejercicio crónico no indujo ansiedad en los animales entrenados

Para evaluar si la ansiedad causada por el ejercicio de nado forzado pudiese influir en los resultados de las pruebas cognitivas se aplicó una prueba de campo abierto (*Open Field*)⁶⁶ y se estimó la distancia recorrida y el tiempo en el centro del oasis.

En la figura 6A se observa que los dos grupos tienden a explorar durante el mismo tiempo el centro del *maze* sugiriendo que ejercicio de nado forzado no indujo un nivel de ansiedad que pudiera afectar en el desarrollo y conducción de las pruebas cognitivas. Por otra parte, se tomó un ejemplar por grupo y se evaluó la trayectoria recorrida en el *maze* por cada uno de ellos (Figuras 6B y 6C), en los gráficos se observa que hubo más recorrido en la periferia que en el centro del *maze*.

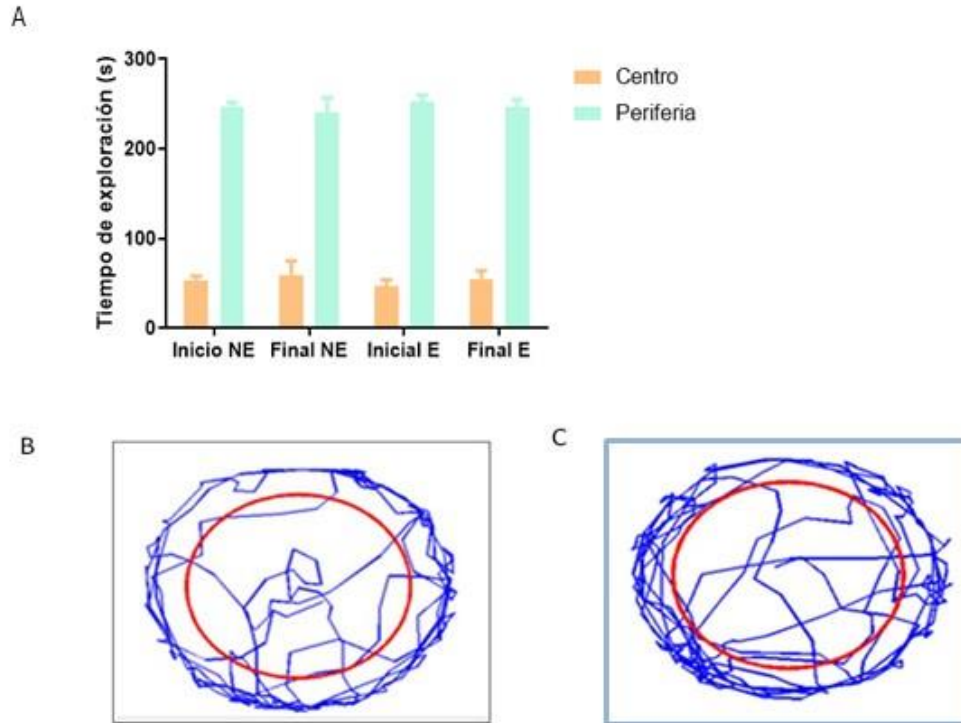


Figura 6. (A) Tiempo de exploración en el oasis maze de los ratones C57BL6/J envejecidos sedentarios y entrenados por nado forzado, (B). Recorrido de animal control en el oasis maze (C) Trayectoria recorrida por un ratón entrenado. El Open Field se realizó en el oasis maze grabando durante 5 minutos el recorrido de cada ratón por separado. Las barras están acompañadas por el error estándar. n=6 por grupo.

4.- La rutina crónica de nado forzado mejoró la memoria a corto plazo en la prueba OL y la memoria a largo plazo en la prueba OiP en ratones envejecidos

Las pruebas se escogieron teniendo en cuenta el paradigma de crear un ambiente no coincidente entre la fase de aprendizaje (fase inicial) y la fase de consolidación de la memoria (fase final). Con este tipo de reconocimiento el animal muestra la memoria adquirida durante la fase inicial mediante la preferencia por explorar los estímulos novedosos frente a los estímulos conocidos^{39,40}.

La prueba *Object location* (OL) se realizó familiarizando a cada roedor con dos objetos idénticos durante cinco minutos en un espacio delimitado. El test fue evaluado a 1 y a 48 h después de su respectiva familiarización, y en esta oportunidad uno de los objetos fue cambiado a una nueva ubicación (Figura 7A). El tiempo de exploración de la prueba de OL con una hora de desfase para el grupo control fue de $37,5 \pm 6,3$ s mientras que para el grupo entrenado fue de $61,0 \pm 4,2$ s, siendo significativa esta diferencia ($p < 0.05$ Mann Whitney

Test) (Figura 7C). Respecto a la evaluación de la memoria a largo plazo evaluada a las 48 h según el test de Mann Whitney no hubo diferencias significativas en el tiempo de exploración entre ambos grupos, puesto que el grupo control exploró los objetos durante $45,5 \pm 7,4$ s y para los entrenados fue de $58,0 \pm 7,9$ s (Figura 7E). Estos resultados sugieren que el ejercicio de nado forzado tiene un impacto positivo sobre la memoria a corto plazo en la prueba OL permitiendo que los animales entrenados exploren por más tiempo los objetos presentados.

Por otra parte, la prueba de OiP se realizó familiarizando a cada animal con cuatro objetos distintos y posteriormente el test fue evaluado a 1 h y 48 h invirtiendo dos objetos de lugar (Figura 7B). Para el análisis se tomó en cuenta el tiempo que los animales usaron en explorar los objetos. Con 1 h de desfase no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de exploración entre el grupo control y el grupo entrenado, $146,2 \pm 10,3$ s y $147,2 \pm 11,8$ s respectivamente (Figura 7D). Respecto a la evaluación con 48 h de desfase se obtuvo que había diferencias entre los tiempos de exploración de ambos grupos siendo para el grupo no entrenado de $78,3 \pm 8,2$ s y para los entrenados de $147,5 \pm 16,1$ s (Figura 7F).

En conjunto, estos resultados sugieren que los ratones C57BL6/J sedentarios de 16 meses de edad tienen dificultad para consolidar la memoria de reconocimiento de objetos a corto y largo plazo en la prueba OL y en la OiP. Adicionalmente, observando los resultados del grupo entrenado muestran que el ejercicio físico es capaz de prevenir el efecto causado por el envejecimiento sobre la memoria a corto plazo en la prueba OL y a largo plazo en la prueba OiP.

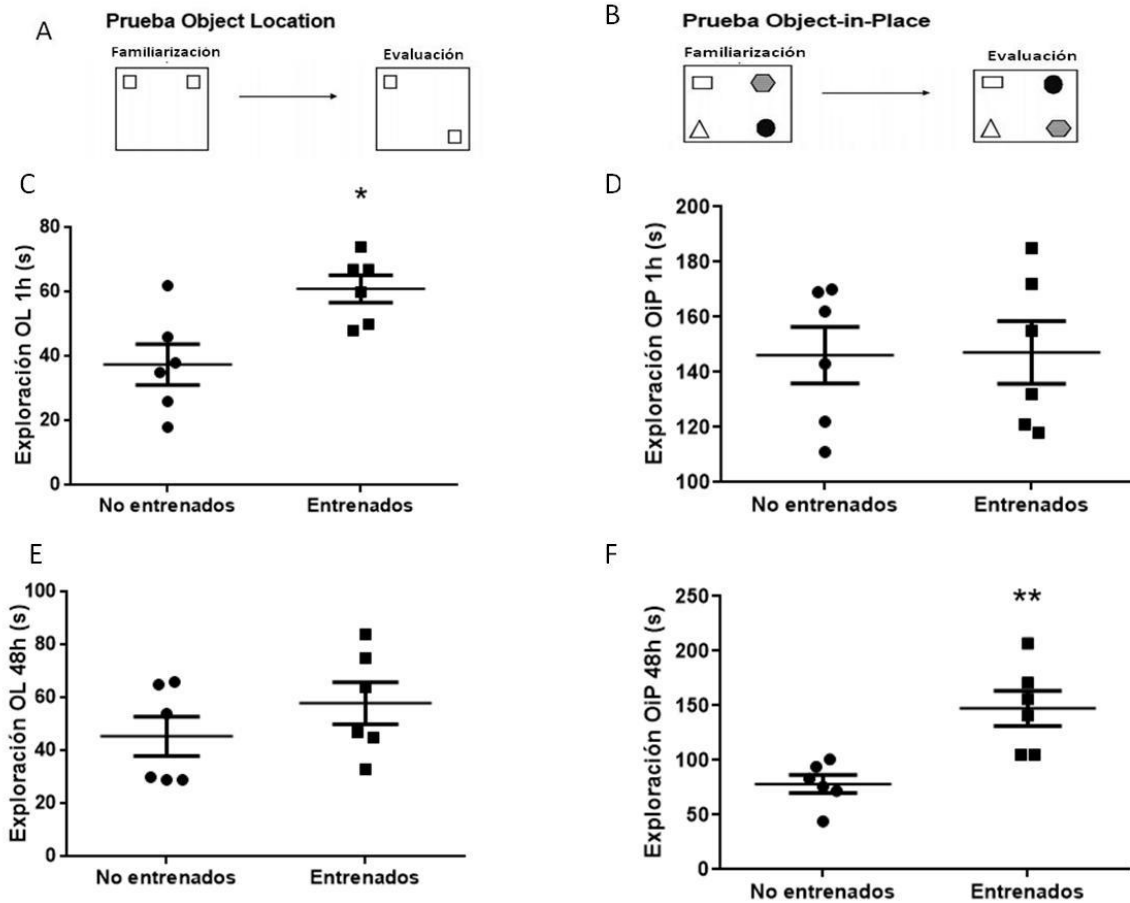


Figura 7. Pruebas conductuales de reconocimiento de objetos en ratones C57BL6/J entrenados con nado forzado y ratones sedentarios de 16 meses de edad. Representación esquemática de la prueba de comportamiento según la ubicación del objeto (OL) (A) y según la relación del objeto con su entorno (OiP) (B). El tiempo de exploración durante la evaluación de la memoria a corto (C) y largo (E) plazo en la prueba OL medido en segundos. El tiempo de exploración en segundos durante la evaluación de la memoria a corto (D) y largo (F) plazo en la prueba OiP. El tiempo de exploración fue de 5 minutos para ambas fases. La muestra fue de n=6 para cada grupo. * $p < 0.05$. Test de Mann Whitney

5.- Correlación entre las variables musculares y variables cognitivas

Dado que en algunos estudios han observado una relación positiva entre el ejercicio físico y la memoria en animales y humanos^{50,51,67,68}, para finalizar se hizo un estudio de correlación entre las variables musculares y el tiempo que los animales exploraron en cada prueba, ya que es de nuestro interés evaluar cual variable física está más relacionada con procesos cognitivos como la memoria.

En la figura 8, se observan los resultados obtenidos al evaluar el tiempo de exploración en cada prueba en relación con la resistencia muscular normalizada por el peso de cada animal. En cuanto a la prueba OL, con $p=0,22$ para la evaluación a memoria a corto plazo y un $p=0,45$ para la evaluación a memoria a largo plazo no hubo una correlación positiva entre un mejor desempeño asociado a la resistencia muscular y la memoria espacial. En cuanto a la prueba OiP, en la evaluación de la memoria a corto plazo se obtuvo que no había relación entre las variables ($p=0,49$); mientras que en la evaluación de la memoria a largo plazo se observó (con un $p=0,0002$) que a mayor resistencia muscular los animales exploraban más tiempo los objetos que se relacionaban de una manera novedosa con su entorno.

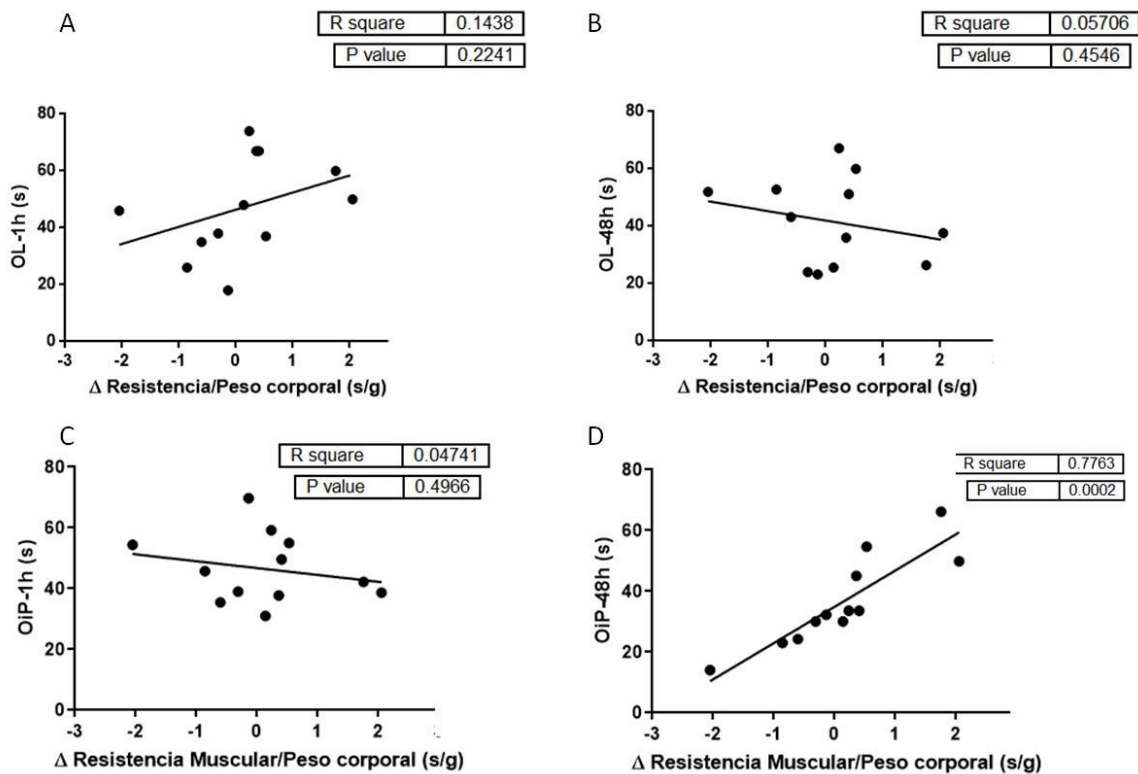


Figura 8. Estudio de correlación entre el tiempo de exploración y la resistencia muscular normalizada por el peso en las pruebas de comportamiento OL (A, B) y OiP (C, D) a corto y largo plazo en ratones C57BL6/J de 16 meses de edad. $n=12$.

En la figura 9 se observa los resultados obtenidos al evaluar el tiempo de exploración en cada prueba en relación con la fuerza normalizada por el peso de cada animal. En cuanto a la prueba OL en la evaluación de la memoria a corto plazo se encontró una correlación

positiva ($p=0,0328$) entre el aumento de la fuerza inducido por el ejercicio y el tiempo de exploración en los ratones de 16 meses, sin embargo, a las 48 h de evaluado el test de OL no se encontró ($p=0,979$) relación entre ambos. En cuanto a la prueba OiP la evaluación de la memoria a corto plazo se obtuvo que no se encontró relación entre las variables ($p=0,209$), mientras que a largo plazo se observó que a mayor fuerza muscular más tiempo empleaban los animales en la exploración de los objetos ($p=0,038$).

Por otra parte, cuando se observa las figuras A y D se aprecia que los resultados estadísticos indican un R^2 bajo pero un p valor significativo; según estudios estadísticos esto indica que aun cuando la dispersión sea alta en los resultados (lo cual se aprecia por el valor de R), estos son aceptables puesto que el p-valor determina la significancia de los mismos⁶⁹.

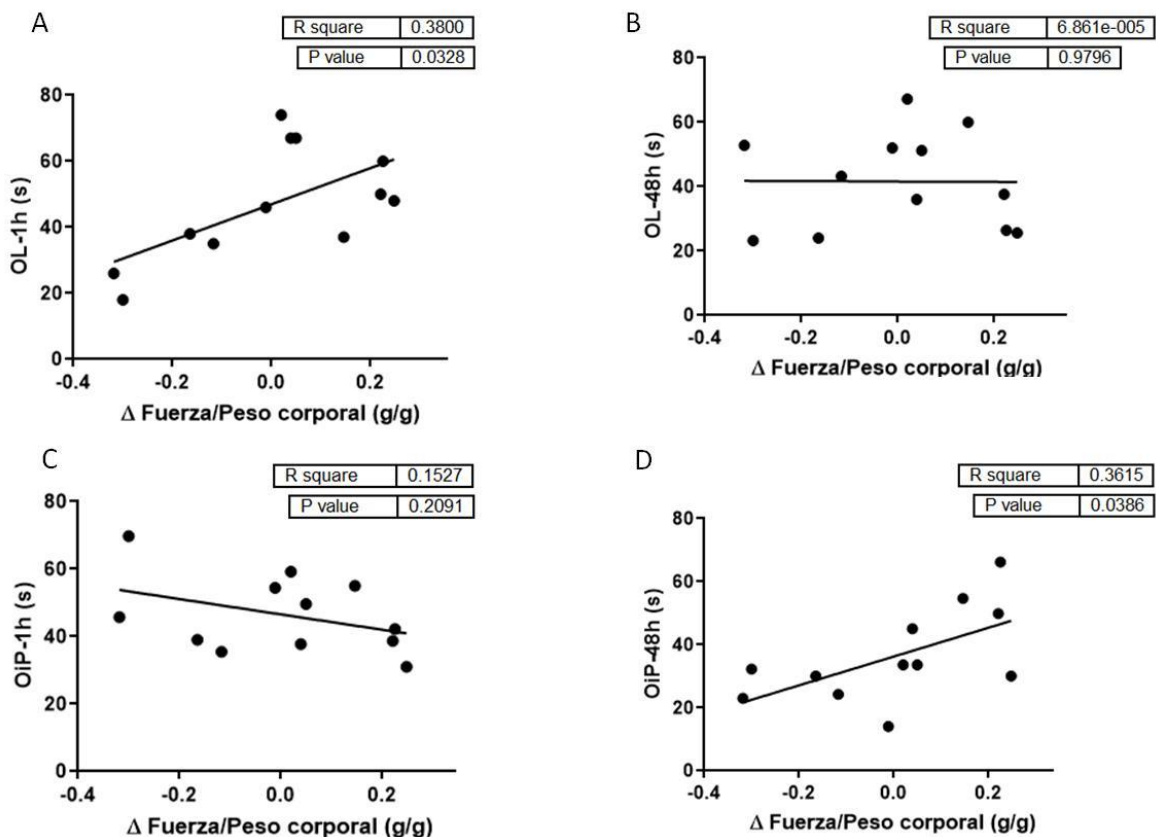


Figura 9. Estudio de correlación entre el tiempo de exploración y la fuerza normalizada por el peso en las pruebas de comportamiento OL (A, B) y OiP (C, D) a corto y largo plazo en ratones C57BL6/J de 16 meses de edad. n=12.

Discusión

El envejecimiento sumado a un estilo de vida sedentario está relacionado a un deterioro celular debido entre otros factores al aumento en los niveles de las especies reactivas del oxígeno, daño mitocondrial, disminución de la autofagia, aumento en la inflamación mediante la activación del inflamasoma NLRP3⁷⁰, el cual está relacionado con enfermedades como sarcopenia⁶⁵, depresión²⁰, Alzheimer²³, entre otras. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran el deterioro muscular y cognitivo causados por el envejecimiento y el sedentarismo. Nosotros encontramos que los ratones envejecidos sedentarios, presentaron menos resistencia y fuerza muscular que al inicio del experimento y la relación entre su peso corporal y peso graso aumentó conforme el tiempo transcurría. A su vez en la evaluación de la memoria a corto y largo plazo en las pruebas de OL y OiP los animales sedentarios presentaron menor desempeño que los entrenados. En nuestros experimentos, el grupo de ratones sedentarios tanto a corto como a largo plazo presentaron dificultad para discriminar entre los estímulos nuevos y familiares, sugiriendo que los cambios en la memoria inducidos por el envejecimiento pueden estudiarse desde los 16 meses de edad en los ratones C57BL6/J. Diversos estudios han sugerido que la práctica constante de actividad física puede mitigar los efectos negativos del sedentarismo dado que aumenta los niveles de enzimas anti-oxidantes⁷¹, mejora el proceso de autofagia⁷¹, tiene efectos anti-inflamatorios⁷⁰, promueve mayor consumo de oxígeno y demanda más gasto energético⁷² y reduce la grasa abdominal lo que con lleva a la pérdida del peso corporal⁷³, aumentando la longevidad y mejorando la capacidad mental⁴⁵. Además, también se ha sugerido que el ejercicio preserva la fuerza muscular y las funciones cognitivas, reduce la ansiedad y la depresión; previene y reduce el riesgo de cardiopatía coronaria, diabetes, enfermedades cardiovascular, reduce los síntomas de la sarcopenia^{5,74} entre otros^{70,75}.

Realizar una rutina de ejercicio físico con una frecuencia de al menos 3 veces por semana durante 6 meses en humanos, ha demostrado que promueve cambios en el patrón molecular del músculo esquelético aumentando la expresión de mioquinas como BDNF e irisina, las cuales están implicadas en la regulación del metabolismo energético, en la respuesta neurobiológica y en la adaptación del músculo esquelético al ejercicio⁹. Lourenco y col., en un estudio sobre Alzheimer demostraron que el ejercicio de nado incrementaba la producción de irisina y mejoraba las funciones cognitivas como aprendizaje y memoria en

animales jóvenes de dos meses²⁷. A su vez, en animales de 13 meses de edad se encontró que el ejercicio de la trotadora mejoraba la memoria asociada al aumento de BDNF en el hipocampo⁷⁶. Estos resultados evidencian que el ejercicio físico por medio de factores tróficos ejerce una influencia positiva sobre el cerebro.

En nuestros resultados los animales entrenados al final de la rutina lograron levantar mayor peso, sostenerse durante más tiempo, disminuir su peso graso. En la evaluación de la memoria a corto plazo en la prueba OL y en la memoria a largo plazo del aprueba OiP aumentó el tiempo de exploración de los objetos respecto a los sedentarios. En cuanto a los resultados de la prueba OL en investigaciones previas se ha observado que los roedores envejecidos de 18 meses de edad, interactúan y pueden discriminar entre los objetos usados en el test cuando el desfase está en un rango de 3-5 minutos^{32,33}. En nuestro trabajo con ratones C57BL/6 envejecidos de 16 meses de edad ejercitados mediante nado forzado, obtuvimos una respuesta significativa con 1 hora de desfase entre las fases del test. Respecto a la prueba OiP nosotros obtuvimos que aquellos ratones que fueron entrenados durante las ocho semana con nado forzado fueron capaces de consolidar la memoria con 48 h de desfase, mientras que Wimmer y cols., estudiando la consolidación de la memoria en ratones C57BL/6 envejecidos de 18 meses a nivel de corteza cerebral solo obtuvieron resultados significativos a las 24 horas³³. Estos resultados demuestran del nado forzado puede ser usado como terapia no invasiva para contrarrestar los efectos del envejecimiento sobre el cerebro.

Evaluando cual capacidad física entre la resistencia muscular y la fuerza contribuye más a potenciar las funciones cognitivas como la memoria de reconocimiento, encontramos que ambas variables físicas favorecen este proceso. Nagamatsu y cols. (2012), evaluando en mujeres de 70-80 años con demencia senil cual tipo de rutina de ejercicios entre fuerza o resistencia tenía mejor efecto sobre la memoria asociativa, habilidad para resolver problemas, plasticidad neuronal y desempeño físico de las mismas; los investigadores encontraron que si bien todas las participantes que entrenaron mejoraron respecto al grupo control, aquellas que tenían rutinas de fuerza dos veces por semana tuvieron mejora en la memoria asociativa, en la resolución de problemas, y las que tuvieron rutinas aeróbicas solo mejoraron sus condiciones físicas aunque asumen que esto pudo deberse a la baja

intensidad de los ejercicios⁵¹. Por su parte, Busse y cols., estudiando el efecto de una rutina de mejora en la fuerza muscular sobre las funciones cognitivas en personas sedentarias de 60 años, obtuvieron una mejora significativa entre los test de memoria y el incremento en la fuerza muscular al cabo de 9 meses de entrenamiento⁵⁰. Adicionalmente, diversos investigadores han encontrado que las rutinas de resistencia muscular ayudan a incrementar la memoria a corto y largo plazo en personas de 79 años⁶⁸. En ratas que recibían infusiones intracerebro-ventricular de agregados A β han observado que los ejercicios de resistencia muscular ayudaban a mejorar la memoria de reconocimiento de los animales⁶⁷.

Para finalizar, las Figura 8 y 9 muestran resultados que sugieren que aún cuando la fuerza muscular haya sido mejorada por el ejercicio de nado forzado e influye de manera significativa sobre la memoria a corto plazo en la prueba OL y la memoria a largo plazo en la prueba OiP, la relación entre esta variable física y las pruebas cognitivas realizadas es más débil que la obtenida entre la variable de resistencia muscular y la prueba cognitiva OiP. Esto último es deducido por los bajos valores R² en la correlación de medición de fuerza vs test cognitivo.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el entrenamiento de nado forzado en ratones C57BL6/J envejecidos de 16 meses de edad induce adaptaciones a nivel muscular mejorando la resistencia y fuerza, a su vez induce adaptaciones diferenciales a nivel cognitivo que favorecen la memoria a corto plazo en la prueba OL y la memoria largo plazo en la prueba OiP, dichas adaptaciones musculares y cognitivas que son producto del ejercicio pueden estar relacionadas a mecanismos moleculares asociados a la producción de BDNF e Irisina que no fueron estudiados en este proyecto pero que abren un abanico de posibilidades para estudios posteriores.

Referencias Bibliográficas

1. Vasto, S. *et al.* Biomarkers of aging. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, **2**, 392–402 (2010).
2. OECD. *Pensions at a Glance 2017. Pensions at a Glance 2017: OECD and G20 Indicators* (2017) doi:https://doi.org/10.1787/pension_glance-2017-en.
3. OMS. *Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud*. (2015).
4. INE. *Estimaciones y proyecciones de la población de Chile 2002-2035. Totales regionales, población urbana y rural*. (2019).
5. Sanchis-Gomar, F., Pareja-Galeano, H., Mayero, S., Perez-Quilis, C. & Lucia, A. New molecular targets and lifestyle interventions to delay aging sarcopenia. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 1–4 (2014).
6. Cartee, G. D., Hepple, R. T., Bamman, M. M. & Zierath, J. R. Exercise Promotes Healthy Aging of Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **23**, 1034–1047 (2016).
7. Cruz-Jentoft, A. J. *et al.* Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing* **39**, 412–423 (2010).
8. Kwak, J. Y. *et al.* Prediction of sarcopenia using a combination of multiple serum biomarkers. *Sci. Rep.* **8**, 1–7 (2018).
9. Kim, S. *et al.* Roles of myokines in exercise-induced improvement of neuropsychiatric function. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **471**, 491–505 (2019).
10. Chang, J. S. *et al.* Circulating irisin levels as a predictive biomarker for sarcopenia: A cross-sectional community-based study. *Geriatr. Gerontol. Int.* **17**, 2266–2273 (2017).
11. Calvo Rodríguez, M. Remodelado del Calcio Intracelular y Susceptibilidad a la Muerte Neuronal en el Envejecimiento y en la Enfermedad de Alzheimer. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, (2015). Disponible en: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/158301/1/Tesiscalcintracelular.pdf>

12. Domínguez González, M. Daño oxidativo y regulación redox en el envejecimiento cerebral : vulnerabilidad regional. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, (2017). Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/122580>
13. Toescu, E. C., Myronova, N. & Verkhratsky, A. Age-related structural and functional changes of brain mitochondria. *Cell Calcium* **28**, 329–338 (2000).
14. Akhmedov, K. *et al.* Decreased response to acetylcholine during aging of Aplysia neuron R15. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
15. Sibille, E. Molecular aging of the brain, neuroplasticity, and vulnerability to depression and other brain-related disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* **15**, 53–65 (2013).
16. Kempzell, A. T. & Fieber, L. A. Aging in sensory and motor neurons results in learning failure in Aplysia californica. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
17. Millan, M. J. *et al.* The serotonin1A receptor partial agonist S15535 [4-(benzodioxan-5-yl)1-(indan-2-yl)piperazine] enhances cholinergic transmission and cognitive function in rodents: A combined neurochemical and behavioral analysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 190–203 (2004).
18. Di Benedetto, S., Müller, L., Wenger, E., Düzel, S. & Pawelec, G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **75**, 114–128 (2017).
19. Deleidi, M., Jäggle, M. & Rubino, G. Immune ageing, dysmetabolism and inflammation in neurological diseases. *Front. Neurosci.* **9**, 1–14 (2015).
20. Wang, Y., Xu, Y., Sheng, H., Ni, X. & Lu, J. Exercise amelioration of depression-like behavior in OVX mice is associated with suppression of NLRP3 inflammasome activation in hippocampus. *Behav. Brain Res.* **307**, 18–24 (2016).
21. Pan, Y., Chen, X. Y., Zhang, Q. Y. & Kong, L. D. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain. Behav. Immun.* **41**, 90–100 (2014).

22. Yue, N. *et al.* Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *J. Neuroinflammation* **14**, 1–15 (2017).
23. Tejera, D. *et al.* Systemic inflammation impairs microglial A β clearance through NLRP 3 inflammasome. *EMBO J.* **38**, (2019).
24. Liang, Z. *et al.* Impact of aging immune system on neurodegeneration and potential immunotherapies. *Prog. Neurobiol.* **157**, 2–28 (2017).
25. Pang, P. T. & Lu, B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: Role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res. Rev.* **3**, 407–430 (2004).
26. Phillips, H. S. *et al.* BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* **7**, 695–702 (1991).
27. Lourenco, M. V. *et al.* Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. *Nat. Med.* **25**, 165–175 (2019).
28. Uptake, C., Impaired, D. & Gallagher, M. An Age-Related Spatial Learning Deficit : and " Unimpaired " Rats. **9**, 363–369 (1988).
29. Barnes, C. A. Memory Deficits Associated With Senescence : A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. **93**, 74–104 (1979).
30. Henry, J. D., Macleod, M. S., Phillips, L. H. & Crawford, J. R. A Meta-Analytic Review of Prospective Memory and Aging. **19**, 27–39 (2004).
31. Glorioso, C. & Sibille, E. Between destiny and disease: genetics and molecular pathways of human central nervous system aging. *Prog. Neurobiol.* **93**, 165–181 (2011).
32. Arias-Cavieres, A., Adasme, T., Sánchez, G., Muñoz, P. & Hidalgo, C. Aging impairs hippocampal- dependent recognition memory and LTP and prevents the associated RyR up-regulation. *Front. Aging Neurosci.* **9**, 1–16 (2017).

33. Wimmer, M; Hernandez, Pepe; Blackwell, Jennifer; Abel, T. Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice. *Neurobiol Aging* **33**, 2220–2224 (2013).
34. Morici, J. F., Bekinschtein, P. & Weisstaub, N. V. Medial Prefrontal Cortex Role in Recognition Memory in Rodents. *Elsevier B.V.* (2015) doi:10.1016/j.bbr.2015.06.030.
35. Barker, G. R. I. & Warburton, E. C. When is the hippocampus involved in recognition memory? *J. Neurosci.* **31**, 10721–10731 (2011).
36. Sharps, M. J. & Gollin, E. S. Memory for Object Locations in Young and Elderly Adults. **42**, 336–341 (1987).
37. Warburton, E. C. & Brown, M. W. Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* **48**, 2262–2272 (2010).
38. DeVito, LM; Eichenbaum, H. Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the “what-where-when” components of episodic-like memory in mice. *Behav Brain Res* **215**, 318–325 (2010).
39. Steckler, T., Drinkenburg, W. H. I. M., Sahgal, A. & Aggleton, J. P. Recognition memory in rats - I. Concepts and classification. *Prog. Neurobiol.* **54**, 289–311 (1998).
40. Lesburguères, E., Tsokas, P., Sacktor, T. C. & Fenton, A. A. The Object Context-place-location Paradigm for Testing Spatial Memory in Mice. *Bio-protocol.* **7**, pii: e2231 (2017).
41. Birren, J. E. & Ph, D. Age Differences In Learning A Two-Choice Water Maze By Rats. (1962).
42. Denninger, J. K., Smith, B. M. & Kirby, E. D. Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. *J. Vis. Exp.* **2018**, 1–10 (2018).

43. Liu, P. Z. & Nusslock, R. Exercise-mediated neurogenesis in the hippocampus via BDNF. *Front. Neurosci.* **12**, 1–6 (2018).
44. De la Rosa, A. *et al.* Long-term exercise training improves memory in middle-aged men and modulates peripheral levels of BDNF and Cathepsin B. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
45. Mandolesi, L. *et al.* Effects of physical exercise on cognitive functioning and wellbeing: Biological and psychological benefits. *Front. Psychol.* **9**, 1–11 (2018).
46. Wu, C. W. *et al.* Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J. Appl. Physiol.* **105**, 1585–1594 (2008).
47. Radák, Z. *et al.* Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem. Int.* **38**, 17–23 (2001).
48. Vreugdenhil, A., Cannell, J., Davies, A. & Razay, G. A community-based exercise programme to improve functional ability in people with Alzheimer’s disease: A randomized controlled trial. *Scand. J. Caring Sci.* **26**, 12–19 (2012).
49. Nithianantharajah, J. & Hannan, A. J. Enriched environments , experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **7**, 697–709 (2006).
50. Busse, A. L. *et al.* Effects of resistance training exercise on cognitive performance in elderly individuals with memory impairment: results of a controlled trial. *Einstein-Sao Paulo* **6**, 402–407 (2008).
51. Nagamatsu, L. *et al.* P3-192: Resistance training promotes cognitive functions and functional plasticity in senior women with probable mild cognitive impairment: A six-month randomized controlled trial. *Alzheimer’s Dement.* **8**, P522–P523 (2012).
52. Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C. & Gage, F. H. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J. Neurosci.* **25**, 8680–8685 (2005).
53. Kronenberg, G. *et al.* Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell

- activity in the mouse dentate gyrus. **27**, 1505–1513 (2006).
54. Corrigendum: Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in Neurosciences* **30** (2007) **9**, 464-472 (DOI:10.1016/j.tins.2007.06.011). *Trends Neurosci.* **30**, 489 (2007).
 55. Pereira, A. C. *et al.* An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5638–5643 (2007).
 56. Zarrinkalam, E., Heidarianpour, A., Salehi, I., Ranjbar, K. & Komaki, A. Effects of endurance, resistance, and concurrent exercise on learning and memory after morphine withdrawal in rats. *Life Sci.* **157**, 19–24 (2016).
 57. Gelfo, F., Mandolesi, L., Serra, L. & Sorrentino, G. The neuroprotective effects of experience on cognitive functions: evidence from animal studies on the neurobiological bases of brain reserve,. *Neuroscience* (2017) doi:10.1016/j.neuroscience.2017.07.065.
 58. Young, M. F., Valaris, S. & Wrann, C. D. A role for FNDC5/Irisin in the beneficial effects of exercise on the brain and in neurodegenerative diseases. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **62**, 172–178 (2019).
 59. Deacon, R. M. J. Measuring the strength of mice. *J. Vis. Exp.* 1–4 (2013) doi:10.3791/2610.
 60. Salech, F. *et al.* Local Klotho enhances neuronal progenitor proliferation in the adult hippocampus. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **74**, 1043–1051 (2019).
 61. Houdebine, L. *et al.* Low-Intensity Running and High-Intensity Swimming Exercises Differentially Improve Energy Metabolism in Mice With Mild Spinal Muscular Atrophy. **10**, 1–21 (2019).
 62. Huang, W. C., Hsu, Y. J., Wei, L., Chen, Y. J. & Huang, C. C. Association of physical performance and biochemical profile of mice with intrinsic endurance swimming. *Int. J. Med. Sci.* **13**, 892–901 (2016).

63. Mardare, C. *et al.* Endurance and resistance training affect high fat diet-induced increase of ceramides, inflammasome expression, and systemic inflammation in mice. *J. Diabetes Res.* **2016**, (2016).
64. Sayed, R. K. A. *et al.* Identification of morphological markers of sarcopenia at early stage of aging in skeletal muscle of mice. *Exp. Gerontol.* **83**, 22–30 (2016).
65. Sayed, R. K. A. *et al.* Lack of NLRP3 inflammasome activation reduces age-dependent sarcopenia and mitochondrial dysfunction, favoring the prophylactic effect of melatonin. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **74**, 1699–1708 (2019).
66. Liu, Y. *et al.* Short-term resistance exercise inhibits neuroinflammation and attenuates neuropathological changes in 3xTg Alzheimer’s disease mice. *J. Neuroinflammation* **17**, 1–16 (2020).
67. Farzi, M. A., Sadigh-Eteghad, S., Ebrahimi, K. & Talebi, M. Exercise Improves Recognition Memory and Acetylcholinesterase Activity in the Beta Amyloid-Induced Rat Model of Alzheimer’s Disease. *Ann. Neurosci.* **25**, 121–125 (2019).
68. Santos, S. *et al.* The effect of physical exercise on the memory of elderly - an intervention study. (2019).
69. Minitab, S. E. Cómo Interpretar un Modelo de Regresión con un R- cuadrado Bajo y Valores P Bajos Otras publicaciones que podrían interesarte. *Blog de Minitab 2021* <https://blog.minitab.com/es/como-interpretar-un-modelo-de-regresion-con-un-r-cuadrado-bajo-y-valores-p-bajos> (2019).
70. Paterson, D. H. & Warburton, D. E. R. Physical activity and functional limitations in older adults: A systematic review related to Canada’s Physical Activity Guidelines. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* **7**, (2010).
71. Henríquez-olguín, C. *et al.* NOX2 Inhibition Impairs Early Muscle Gene Expression Induced by a Single Exercise Bout. **7**, 1–12 (2016).
72. Stampfer, M. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Rimm, E. B. & Willett, W. C. Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle. *N. Engl. J.*

Med. **343**, 16–22 (2000).

73. Coqueiro, R. da S. *et al.* Therapeutic and preventive effects of exercise on cardiometabolic parameters in aging and obese rats. *Clin. Nutr. ESPEN* **29**, 203–212 (2019).
74. Kim, J. S., Jeon, J., An, J. J. & Yi, H. K. Interval running training improves age-related skeletal muscle wasting and bone loss: Experiments with ovariectomized rats. *Exp. Physiol.* **104**, 691–703 (2019).
75. Pahor, M. *et al.* Effect of structured physical activity on prevention of major mobility disability in older adults: The LIFE study randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **311**, 2387–2396 (2014).
76. Maejima, H., Kanemura, N., Kokubun, T., Murata, K. & Takayanagi, K. Effects of aging and treadmill exercise on cognitive function and the expression of BDNF in the hippocampus. *FASEB J.* **31**, 3–5 (2017).

Anexo

Tabla I. Análisis estadístico de las variables evaluadas. Los resultados están expresados con la media y su error estándar, indica el test estadístico usado en cada prueba, el p-valor obtenido y en las pruebas de correlación el R².

Parámetros	Entrenados ($\mu \pm \text{SEM}$)	No entrenados ($\mu \pm \text{SEM}$)	Test estadístico	p-valor ($p < 0,05$)	R ²
Variación del Peso corporal	-10,07 ± 1,517	-0,7867 ± 0,8696	Mann-Whitney	0,0022	-
Peso grasa/Peso corporal	0,02580 ± 0,001455	0,04082 ± 0,003460	Mann-Whitney	0,0043	-
Resistencia Muscular/Peso corporal (s/g)	115,8 ± 26,62	14,6 ± 23,7	Mann-Whitney	0,0022	-
Fuerza Muscular/Peso corporal (g/g)	31,1 ± 8,00	29,6 ± 13,88	Mann-Whitney	0,0022	-
Tiempo exploración 1 h en OL (s)	61,0 ± 4,2	37,5 ± 6,3	Mann-Whitney	0,0152	-
Tiempo exploración 48 h en OL (s)	58,0 ± 7,9	45,5 ± 7,4	Mann-Whitney	0,29	-
Tiempo exploración 1 h en OiP (s)	147,2 ± 11,8	146,2 ± 10,3	Mann-Whitney	0,9372	-
Tiempo exploración 48 h en OiP (s)	147,5 ± 16,1	78,3 ± 8,2	Mann-Whitney	0,0022	-
Correlación Resistencia Muscular vs Tiempo exploración 1 h en OL	-	-	Pearson r	0,22	0,1438

Correlación Resistencia Muscular vs Tiempo exploración 48 h en OL	-	-	Pearson r	0,4546	0,057
Correlación Resistencia Muscular vs Tiempo exploración 1 h en OiP	-	-	Pearson r	0,4966	0,04741
Correlación Resistencia Muscular vs Tiempo exploración 48 h en OiP	-	-	Pearson r	0,0002	0,7763
Correlación Fuerza Muscular vs Tiempo exploración 1 h en OL	-	-	Pearson r	0,0328	0,3836
Correlación Fuerza Muscular vs Tiempo exploración 48 h en OL	-	-	Pearson r	0,979	$6,861 \cdot 10^{-5}$
Correlación Fuerza Muscular vs Tiempo exploración 1 h en OiP	-	-	Pearson r	0,209	0,1527
Correlación Fuerza Muscular vs Tiempo exploración 48 h en OiP	-	-	Pearson r	0,038	0,3615