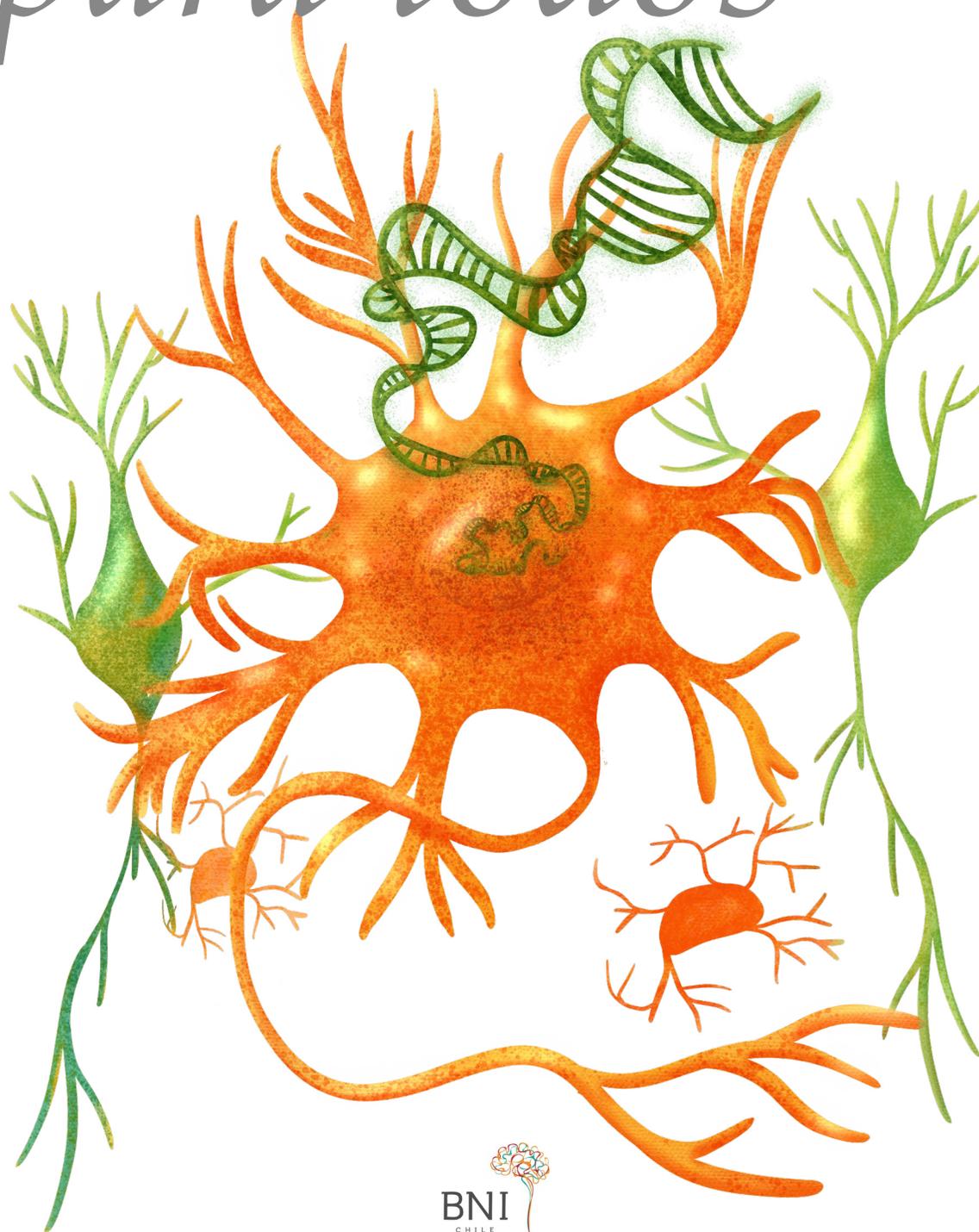




pappers

para todos



Papers para todos

Primera edición, Noviembre, 2021

Instituto de Neurociencia Biomédica (BNI), Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Independencia 1027, Santiago, Chile

Dirección editorial y corrección de textos: Felipe G. Serrano
Diagramación, ilustraciones y diseño de portada: Felipe G. Serrano

Agradecimientos

Esta revista fue financiada por la Iniciativa Científica Milenio a través de su concurso Proyección al Medio Externo 2020, adjudicado al Instituto de Neurociencia Biomédica (ICN09_015).

Impresión: Emotions SpA



Este material puede ser distribuido, copiado y exhibido por terceros si se muestra en los créditos y solo para fines educativos y de divulgación científica. No se puede obtener ningún beneficio comercial y las obras derivadas tienen que estar bajo los mismos términos de licencia que el trabajo original.



papers *para todos*



Créditos

• Directora del proyecto

Gabriela Martínez Bravo

• Directora de contenidos

Gabriela Martínez Bravo

• Diagramación y Diseño de portada

Felipe Serrano

• Ilustración e Infografías

Felipe Serrano

Equipo del proyecto

• Directora

Gabriela Martínez Bravo

• Edición

María Fernanda Álvarez

Gabriela Martínez Bravo

Yildy Utreras Mendoza

• Revisión de Contenido

Jimena Sierralta

Carolina Cubillos

• Asesoras Pedagógicas

María Fernanda Álvarez

Kimberling Correa

Roxana Nahuelcura

Eliana Pino

Constanza Villavicencio

Claudia Salazar.

• Investigadores

Carlos Dankert

Christ Devia

Cristopher Farías

Silvia Gleitze

Hazel Lira

Pedro Lobos

Enrique Lorca

Pedro Maldonado

Gabriela Martínez Bravo

Ignacio Muñoz

Karla Padilla

Andrea Paula-lima

Iván Plaza

Joaquín Reyes

Katherine Sagredo

Ignacio Vega

• Producción y Gestión

Carolina Cubillos

• Audiolibro

Elizabeth Caballería

Manuel Ortíz

Natalia Saez

• Sonidista y músico

Manuel Rivadeneira

• Agradecimientos

Claudio Hetz

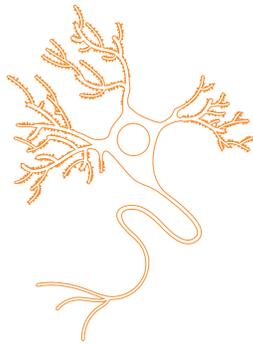
Roque Lillo

Evelyn Millar

Milangela Mogollón

Rodrigo Tapia Seaman

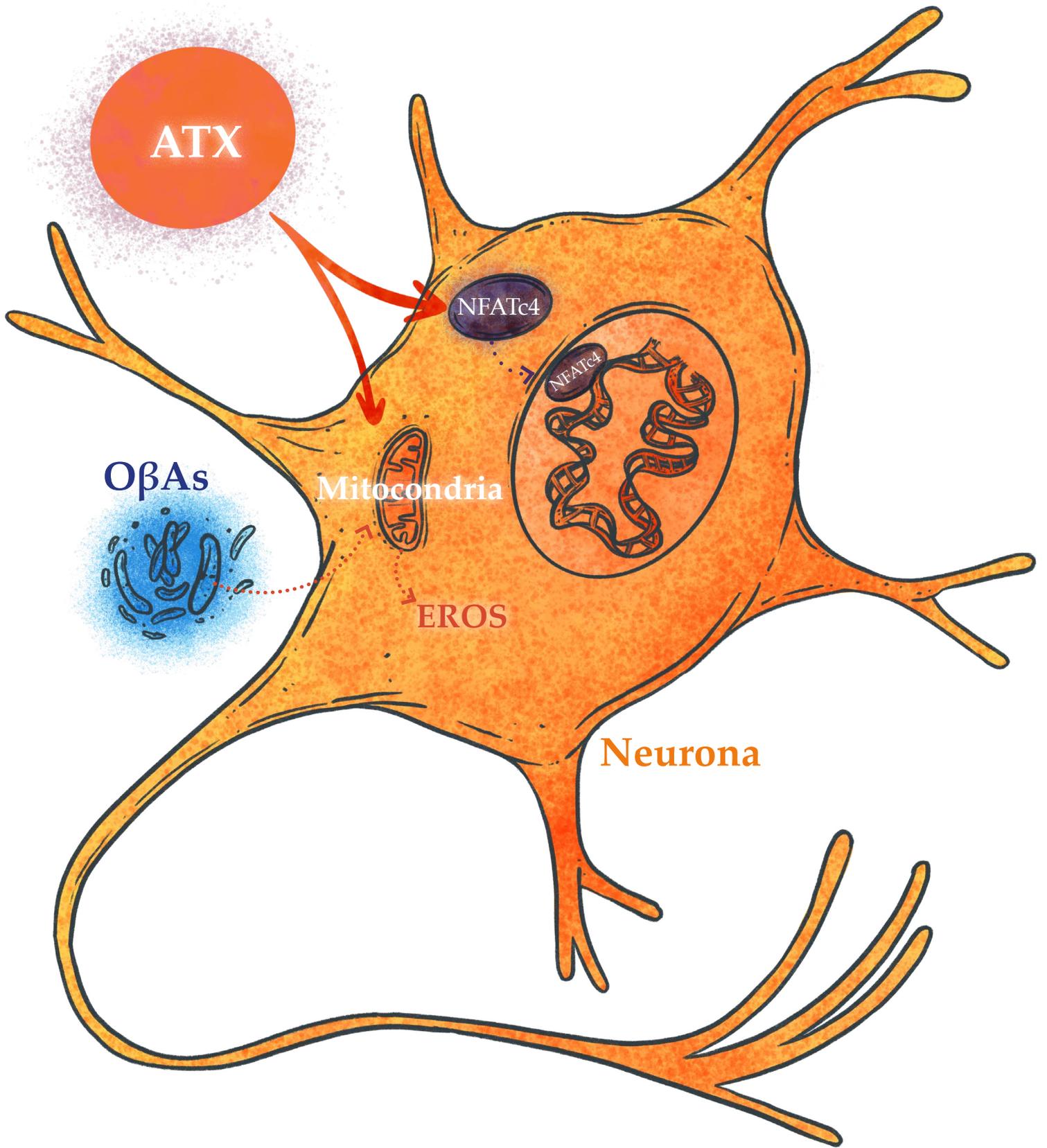
Ana Timmerman





ÍNDICE

1. Canciones y olvido	11
2. ¿Una dieta rica en antioxidantes ayuda a prevenir la enfermedad de alzheimer?	27
3. Bacteria oral podría producir inflamación y daños en el cerebro relacionados con la enfermedad de alzheimer	39
4. ¿Podemos mejorar nuestra memoria?	49
5. ¿Es real nuestra realidad?: Cuando el cerebro mira antes que los ojos	61





CANCIONES Y OLVIDO

La astaxantina protege a neuronas de cultivo primario hipocampal contra los efectos nocivos de los oligómeros de β amiloide

Adaptado por

Pedro Lobos, Ignacio Vega-Vásquez, Joaquín Reyes-González

Afiliación

Instituto de Neurociencia Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Autores

Pedro Lobos^a, Bárbara Bruna^a, Alex Córdova^a, Pablo Barattini^a, José Luis Galáz^a, Tatiana Adasme^a, Cecilia Hidalgo^{a,b}, Pablo Muñoz^c, Andrea Paula-Lima^{a,d}

Afiliación

^aInstituto de Neurociencia Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^bInstituto de Ciencias Biomédicas y Centro de Estudios Moleculares de la Célula, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^cCentro Interdisciplinario para la Innovación en Salud (CIIS), Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso, Chile.

^dInstituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

1. Introducción

“Para olvidarme de ti, voy a cultivar la tierra (1)...”, decía Violeta Parra... quizás nunca sepamos a quién se refería, pero si la escuchamos atentamente, quizás sí podremos olvidarnos de otro sujeto de complejo apellido para lenguas latinas: “Alzheimer”, o más bien de la enfermedad así denominada, en distinción al neurólogo alemán que la describió hace casi 120 años atrás (2). En el siguiente trabajo trataremos de juntar la sabiduría de las letras enunciadas por Violeta con los resultados de nuestros experimentos, como un aporte en la búsqueda de posibles soluciones de esta terrible enfermedad.

La búsqueda del buen envejecimiento parece un tema inagotable tanto para investigadores (3) como artistas. Dentro del mundo lírico, importantes intérpretes han intentado dar su perspectiva: Fleetwood Mac en “Landslide” presentaba una metáfora sobre los cambios importantes que involucran la adultez y la vida mayor (4), mientras que Pink Floyd en “Time” tenía una visión más reflexiva sobre cómo el tiempo se escapa de las manos de manera veloz (5). Los científicos no nos hemos quedado atrás, y hemos aprendido que el envejecimiento ocurre debido al daño que se acumula en nuestras células luego de muchos años, haciendo más fácil que nos enfermemos (6). El cerebro es uno de los órganos del cuerpo más afectados por este daño progresivo,

lo que facilita la aparición de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) (7).

Esta enfermedad es la forma más común de demencia en Chile y el mundo. Se presenta principalmente con alteraciones en el proceso de aprendizaje y la pérdida de memoria. Si bien el envejecimiento es la principal razón de esta enfermedad, existen otros factores de riesgo como las enfermedades cardiovasculares, diabetes, el consumo de tabaco, entre otros (8). La EA se caracteriza por la pérdida del funcionamiento de neuronas en distintas regiones del cerebro, destacando inicialmente el hipocampo, estructura que se encarga de almacenar la memoria. Este deterioro luego progresa lentamente a otras zonas del cerebro, causando que el individuo pierda la capacidad de ser independiente en su vida cotidiana (9).

En el cerebro de pacientes con EA, se acumula una molécula llamada péptido beta-amiloide, que forma agrupaciones o complejos con otras moléculas llamadas oligómeros de beta-amiloide (OβAs) (10). Estos oligómeros promueven la oxidación excesiva, una forma de deterioro de las moléculas orgánicas, en las neuronas a través de la sobreproducción de moléculas llamadas especies reactivas de oxígeno (EROs), específicamente en la *mitocondria*, donde destaca el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (11). Al igual que en una manzana

Glosario

Mitocondria: es un organelo que está formado por una doble membrana que participa en los procesos de obtención de energía para las funciones y el mantenimiento de las células.



a medio comer, esta oxidación deja una marca, que se asocia al daño y muerte neuronal. Otra forma en que los O β As provocan deterioro es mediante la activación de una proteína llamada NFATc4: esta proteína está en las neuronas y cuando se activa viaja como un predicador de desgracias hacia el ADN que se encuentra dentro del **núcleo**, y promueve la formación de proteínas que generan la pérdida de comunicación entre las neuronas (12).

Como si fuera un valioso instrumento, el cerebro debe ser afinado con sagrada regularidad para impedir que se oxide por el desuso y maltrato. Para ello se ha investigado y probado distintas drogas para evitar el daño producido en el cerebro durante el envejecimiento, y en particular la EA (13). Algunos de estos medicamentos se enfocan en prevenir el daño neuronal causado por la oxidación, para lo cual se han estudiado compuestos con propiedades antioxidantes (14). El consumo de estos compuestos podría detener y contener la acumulación de EROs, y potenciar la autodefensa antioxidante de las células (15). Los candidatos a usar en la EA son bastantes, y con periodicidad más de alguno se ha filtrado en las portadas de revistas, en donde prometen acabar de una vez por todas con esta terrible enfermedad.

En este trabajo estudiamos la astaxantina (ATX), un antioxidante natural que está presente en muchos ani-

males marinos como el salmón y las centollas, y que les otorga en parte su coloración rojiza. Estudios previos han demostrado sus propiedades antioxidantes contra el daño producido por la oxidación de las EROs, lo que nos da los primeros indicios del uso que podría tener la ATX en nuestro cerebro (16). Además, tal como un artista multifacético capaz de tocar diferentes instrumentos, la ATX también posee otros efectos positivos como prevención de la inflamación y la muerte celular (**apoptosis**) (17, 18). Todas estas propiedades presentes en la ATX la hacen una candidata atractiva para usarla como un tratamiento terapéutico o preventivo.

2. Métodos

Si nuestros experimentos fueran un álbum de música, podemos imaginar que planificar los experimentos es como escribir las notas de las futuras canciones: debemos estar seguros de lo que hacemos, afinar correctamente los instrumentos a utilizar, y seguramente probar más de una vez todo, de tal manera que todo rime y resuene en armonía. De esa manera, en esta sección detallaremos las principales decisiones que tomamos en la construcción de este álbum, y primero, les presentamos una lista que contiene los principales materiales utilizados y su origen, como toda producción.

Cultivo de neuronas hipocampales

No es ético ni correcto probar la ATX

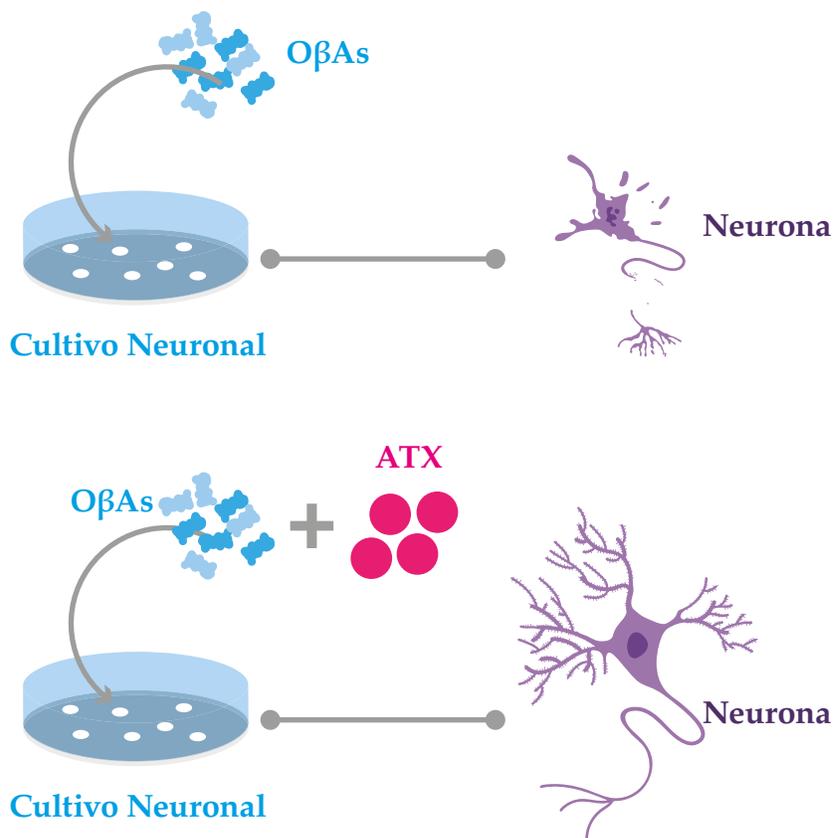
Glosario

Núcleo: Centro de control que dirige las actividades de la célula. La envoltura o carioteca lo delimita externamente. Dentro de él, encontramos la información genética o ADN en forma de cromosomas y el nucléolo.

Apoptosis: es el proceso programado de muerte celular, donde las células se autodestruyen, lo que resulta en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades.

Diseño experimental

Se aislaron células neuronales a las cuales se les administró OβAs. A continuación, a un grupo (grupo experimental) se les adicionó el tratamiento de ATX y se comparó con el grupo que no recibió el tratamiento (grupo control).



en el cerebro de una persona o animal sin hacer pruebas en modelos celulares, ya que podríamos terminar generando más daño que bien. Debemos partir lento y seguro, para que una vez que sepamos que funciona en un modelo simple, podamos aumentar la complejidad. Es por esto que utilizamos como modelo de estudio células neuronales aisladas del cerebro de ratas, las que bajo especial cuidado pueden vivir adheridas a un plástico especial. Esto se conoce como un modelo “*in vitro*”, ya que las neuronas no viven de forma natural así, y si bien se pierden innumerables características, como la rica y compleja arquitectura y conectividad del cerebro, al tener las células aisladas podemos descubrir y entender el

efecto que puede tener la ATX sin la intervención de otros factores.

Preparación de oligómeros de beta-amiloide (OβAs).

Si comparamos la vida celular con una gran orquesta, sin lugar a dudas las proteínas se llevan el rol más protagónico, no obstante, en muchas ocasiones estas no pueden lograr sus importantes funciones de manera aislada y necesitan juntarse en pares o grupos llamados oligómeros que en ocasiones pueden alcanzar cientos de miembros formando conglomerados mayores o “polímeros”. Aún así, no siempre la melodía producida por estas estructuras resuena armoniosamente para las necesidades celulares, este es el caso de la EA, en donde la acumulación



de los O β As interrumpen la delicada sincronía de la orquesta neuronal. En este trabajo replicamos este proceso, en el que a neuronas sanas les agregamos conglomerados de O β As generados sintéticamente en el laboratorio, de esta manera tratamos de modelar los procesos neurotóxicos que se producen durante la EA.

Ensayo de viabilidad

Una de las mejores formas de comprender algo es observarlo directamente, para esto utilizamos un microscopio. Sin embargo, las células son muy delgadas y no tienen color, por lo que para descubrir los secretos de las células es necesario la ayuda de compuestos coloreados o con luz emitida como fluorescencia que nos permitan seguirlas. Entonces, para evaluar un nuevo compuesto debemos saber si este podría resultar beneficioso o dañino, para esto determinamos si las células viven o mueren. Por este motivo, utilizamos Calceína-AM que nos permite identificar las células vivas en color verde, y Etidio-Homodímero que nos permite observar las células muertas en color rojo.

Determinación de especies reactivas del oxígeno (EROs).

Las EROs son como estribillos pegadizos que de manera inevitable y reiterada son producidas en todas las células por los organelos, que son los elementos que componen la célula y le permiten cumplir sus funciones, especialmente en las mitocondrias,

causando estragos y alterando la delicada función de variados componentes celulares (19). Debido a su localización específica dentro de las células, y su corta vida, las EROs nos entregan una ventana de tiempo muy pequeña para poder observarlas incluso utilizando los mejores microscopios. Para resolver este problema (20), los investigadores de otras partes del mundo lograron modificar las células para que produzcan una proteína denominada Hyper-Mito (21) que detecta los aumentos dentro de las células de EROS emitiendo luz. Entonces, nosotros le entregamos las instrucciones a las células para sintetizar y localizar esta proteína en sus mitocondrias, y cuando aumentan las EROs, específicamente H₂O₂, aumenta la emisión de luz en la célula, a través de Hyper-Mito, y de esa manera podemos observar y medir los cambios de EROs en un microscopio especialmente diseñado para esto.

En particular, obtuvimos y comparamos imágenes de Hyper-Mito en neuronas controles, tratadas con O β As y/o ATX para determinar las diferencias en la producción de EROs entre estas condiciones. Luego graficamos la amplitud (tamaño) de las señales generadas como una razón respecto de la señal que se observa antes de agregar el tratamiento (división) F/F₀, a través del tiempo (F/F₀ v/s tiempo); de esta manera podemos seguir los cambios en la producción de EROs. Un valor superior a 1 indicará un au-

Glosario

Citoplasma:

corresponde a la parte interior de la célula entre la membrana plasmática y el núcleo, está compuesta por agua, sales, diversas moléculas orgánicas y donde se encuentran los organelos como las mitocondrias.

mento y un valor menor a 1 indica una disminución.

Determinación de la translocación nuclear de NFATc4

Tal como un buen grupo musical, las neuronas cuentan en su interior con diferentes agentes que las ayudan a realizar sus funciones con la mejor puesta en escena posible. Uno de estos agentes es la proteína llamada NFATc4, quien con su viaje desde el *citoplasma* hacia el núcleo (proceso conocido como traslocación) transmite y controla la información que desencadena el terrible destino que depara a las neuronas producto del daño producido por los OβAs (12). Con este panorama, y dentro del pequeño y densamente poblado espacio que presentan las neuronas, ¿cómo distinguir algo entre todos los agentes que vienen y van dentro de las células? Para lograr esto, modificamos las neuronas para que produzcan un equivalente de NFATc4 que emite luz de color verde (denominado NFATc4-eGFP) (22) de esta manera podemos seguirlo y localizarlo en su viaje al núcleo mediante microscopía. Así, obtuvimos imágenes de NFATc4-eGFP en neuronas controles, tratadas con OβAs y/o ATX y comparamos la localización de este en el núcleo o citoplasma entre estas condiciones.

Estadística

En los juegos de azar, ganar el pozo

acumulado será una cuestión de suerte, en cambio cuando un cantante gana un Grammy depende netamente de su talento. Al realizar cualquier tipo de experimento queremos tener la seguridad de que los resultados observados corresponden efectivamente al efecto que estudiamos y no al azar, es por eso que recurrimos a las matemáticas, específicamente a la estadística, la cual logrará diferenciar entre estas dos situaciones. En los gráficos de los resultados verás un símbolo (* o #) que indica cuando estamos seguros de que las diferencias encontradas son verdaderas y no “*un golpe de suerte*” (23). Específicamente, esto lo logramos al aplicar una prueba estadística llamada “ANOVA de una vía”, seguido del “test Bonferroni de comparación” (** p <0,001 en comparación con el control; #p <0,05 en comparación con la condición indicada).

Bioética

En la ciencia, tener la autorización para poder trabajar con animales es un proceso largo y riguroso, en donde la prioridad es el bienestar de los animales por sobre cualquier objetivo. Este trabajo contó con la autorización del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile en base a los reglamentos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos.



3. Resultados

a) La astaxantina (ATX) no provoca toxicidad en las neuronas del hipocampo.

Cuando una banda necesita una nueva o un nuevo vocalista, deben asegurarse de elegir a alguien que traiga beneficios al grupo y que no dañará la música que los caracteriza. Lo mismo sucede con una nueva terapia, si se quiere utilizar este antioxidante (ATX) como un potencial tratamiento contra el avance de la EA, debemos asegurarnos de que no será dañino para las neuronas que queremos tratar.

Por lo tanto, lo primero que hicimos fue observar si este compuesto no afecta la sobrevivencia de las neuronas realizando un ensayo de viabilidad celular, luego de exponerlas por 24 horas con distintas concentraciones de ATX (10^{-9} M a 10^{-4} M). En este ensayo evaluamos la cantidad de células vivas en comparación a las muertas: las primeras presentarán una fluorescencia verde debido a la calceína, mientras que las segundas presentarán un color rojo debido al etidio. Los resultados mostraron que concentraciones de ATX inferiores a 10^{-6} M no disminuyen la viabilidad de las neuronas al compararlas con neuronas que no recibieron ATX.

b) La astaxantina (ATX) previene el aumento en la producción de H_2O_2 mitocondrial (EROs) inducida por los O β As (oligómeros de beta-amiloide).

Como se mencionó anteriormente, los O β As inducen un aumento de H_2O_2 en la mitocondria, y para evaluar la capacidad antioxidante de ATX en la prevención de este evento, logramos que las neuronas produjeran HyperMito, el cual funciona como un sensor de los niveles de producción de EROs, de forma específica en las mitocondrias. Un ejemplo de los cambios de luz en forma de fluorescencia que detectamos en las diferentes condiciones las mostramos visualmente en la **Figura 1 (A-D)**. Además, se graficó en la **Figura 1E**, un promedio de los cambios observados en muchas células.

Primero, nos debemos asegurar de que el disolvente o la sola acción mecánica asociado al tratamiento de las células no produzca un aumento de la fluorescencia. Esta condición la denominamos control, en la cual no añadimos ningún tratamiento, sólo el líquido en que están disueltos los compuestos que probamos después, como se muestra en la **Figura 1A**, y es representado por la línea negra en la **Figura 1E**, concluyendo que no hay cambios significativos al comparar antes y después de la adición de este líquido.

Luego, cuando agregamos los O β As sintéticos, observamos que se produce un aumento en la fluorescencia, lo que indica un aumento en la producción de EROs, tal como se muestra en la **Figura 1B** y la línea azul de **1E**. Para ver si ATX puede prevenir el aumento de fluorescencia, previo a la adición

de O β As (y durante 90 minutos) se mantuvieron a las neuronas con la ATX. En esta oportunidad las células no generaron un aumento de la señal fluorescente al adicionar O β As, lo que se muestra en la **Figura 1C** y la línea

verde de **1E**. Como control interno del experimento, evaluamos si el tratamiento de ATX por sí sólo genera un cambio en el estado oxidativo de las mitocondrias de las neuronas, sin observar cambios comparado con la

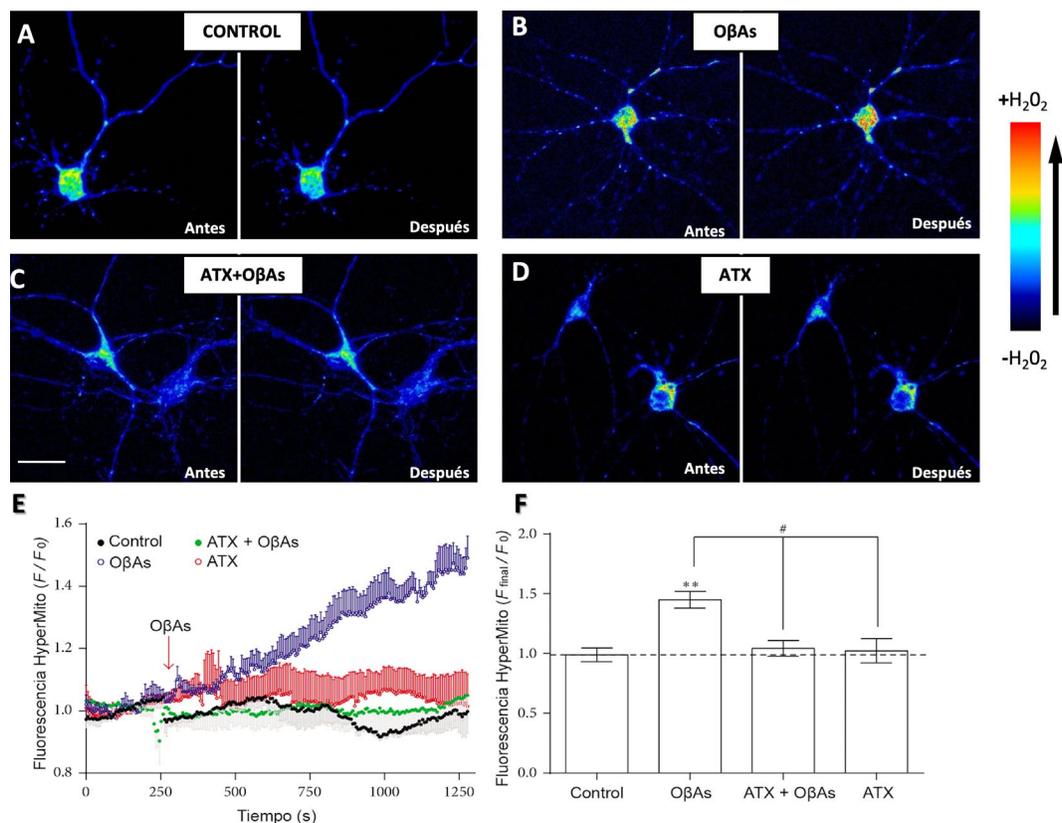


Figura 1.

En las imágenes A-D se ilustran en una escala artificial de colores las neuronas que expresan la proteína sensor HyperMito. A mayor intensidad de señal fluorescente emitida la señal será más roja, mientras que, a menores valores, se observará una señal azul-negra. La barra blanca en la esquina inferior izquierda representa una distancia de 10^{-5} metros. En cada letra (A-D), la imagen de la izquierda es una foto adquirida a los 4 minutos de iniciado el experimento (antes de agregar O β As o el líquido en el que está disuelto). La imagen de la derecha es 1000 segundos después de agregar O β As o el líquido en el que está disuelto. El gráfico E muestra líneas que indican la emisión de fluorescencia de HyperMito a lo largo del tiempo, adquiridas desde las neuronas. La condición control está representada con una línea negra (sin O β As ni tratamiento con ATX); la condición que simula la enfermedad de Alzheimer sin tratamiento es representada por una línea azul (sólo adición de O β As); la adición de sólo ATX a las neuronas se muestra con una línea roja y, finalmente, la condición que simula la enfermedad con el tratamiento (O β As con ATX) se observa con una línea verde.

La concentración de los compuestos adicionados fueron las siguientes: O β As $0,5 \cdot 10^{-6}M$ y ATX $0,1M$. Los cambios en la fluorescencia (promedio \pm error estándar) se expresan como (F/F_0) , donde F_0 corresponde a la fluorescencia basal (antes de la adición de O β As), y F la fluorescencia a cada momento del tiempo. Los resultados corresponden de la medición en dos regiones neuronales provenientes de cuatro experimentos independientes. El gráfico F muestra los valores de F/F_0 obtenidos al final del experimento (tiempo de 1250 s) de cada condición. Las barras representan el promedio \pm error estándar.



condición control, como se observa en la **Figura 1D** y la línea roja de **1E**.

Con el fin de visualizar y comparar de mejor manera todo lo anterior, en la **Figura 1F** observamos en forma de barras cuánto cambia la fluorescencia a un tiempo de 20 minutos, respecto a los valores iniciales (F/F₀). Aquí, se puede ver nuevamente que la única condición en la que se observa un aumento de la señal, y por ende, de la producción de EROs, es en donde se agregan O β As. Las líneas que se grafican en cada punto representa la dispersión de los datos obtenidos.

c) Astaxantina (ATX) previene la activación de NFATc4 mediada por O β As (oligómeros de beta-amiloide)

Se cree que la activación de NFATc4 por parte de los O β As conduce a las neuronas por una verdadera “carretera al infierno” (24), iniciando los primeros pasos que provocarán gran parte de la muerte de las neuronas o neurodegeneración que caracteriza la EA. Una señal de que este factor se activó es que NFATc4 encontró su camino al ADN que se encuentra en el núcleo de las neuronas.

Por ello, el propósito de este experimento fue observar si la ATX podía evitar o disminuir la cantidad de NFATc4 que viaja hacia el núcleo (NFATc4 activado). Para visualizar el movimiento de este factor se observó la versión fluorescente de NFATc4 (verde). Cuando sólo está en el cito-

plasma se observa una señal verde, pero cuando se mueve al núcleo se puede observar en color azul, por lo tanto si llega al núcleo observaremos un color celeste.

En la **Figura 2** se observó en las neuronas control que la señal verde se detecta principalmente fuera del núcleo, indicando que NFATc4 no estaría activado en condiciones basales (**Figura 2A**). Cuando se realizó la incubación con O β As (por 6 horas) se observó una mayor localización de la señal verde en el núcleo, evidenciando que NFATc4 se encontraría activado en esta condición (**Figura 2B**) al haber viajado desde el citoplasma hacia el núcleo. Al realizar el tratamiento con ATX, previo a la incubación con O β As, se observó una menor cantidad de este factor en el núcleo (**Figura 2C**). Nuevamente se evaluó si ATX por sí sola produce algún cambio, evidenciando resultados similares al control (**Figura 2D**).

Finalmente, en la **Figura 2E**, se presentan en un gráfico de barras los valores promedio de la relación entre la señal detectada en el núcleo y en el citoplasma para cada condición. Los valores sobre 1 indican una mayor señal en el núcleo, interpretándose como una mayor activación de NFATc4, mientras que menores a 1 corresponde a menor activación en comparación a la encontrada en las neuronas controles, indicando una mayor señal en el citoplasma. Se puede observar que cuando se incubaba a las neuronas con O β As,

NFATc4 se encuentra principalmente ubicado en el núcleo (valores significativamente mayores a 1), lo cual se previene al administrar previamente el antioxidante ATX, observando valores cercanos al control y distintos a la sola adición de O β As.

4. Discusión

Por varias décadas, varios antioxidantes han sido estudiados como estrate-

gias para tratar o prevenir la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento (14), sin embargo, aún no ha sido posible encontrar una molécula que sea realmente efectiva para prevenir o retrasar estas enfermedades (25), aunque abundan mitos y percepciones infundadas acerca del uso de algunas de estas sustancias (26).

Tal como es difícil mantener un equilibrio de instrumentos en un concier-

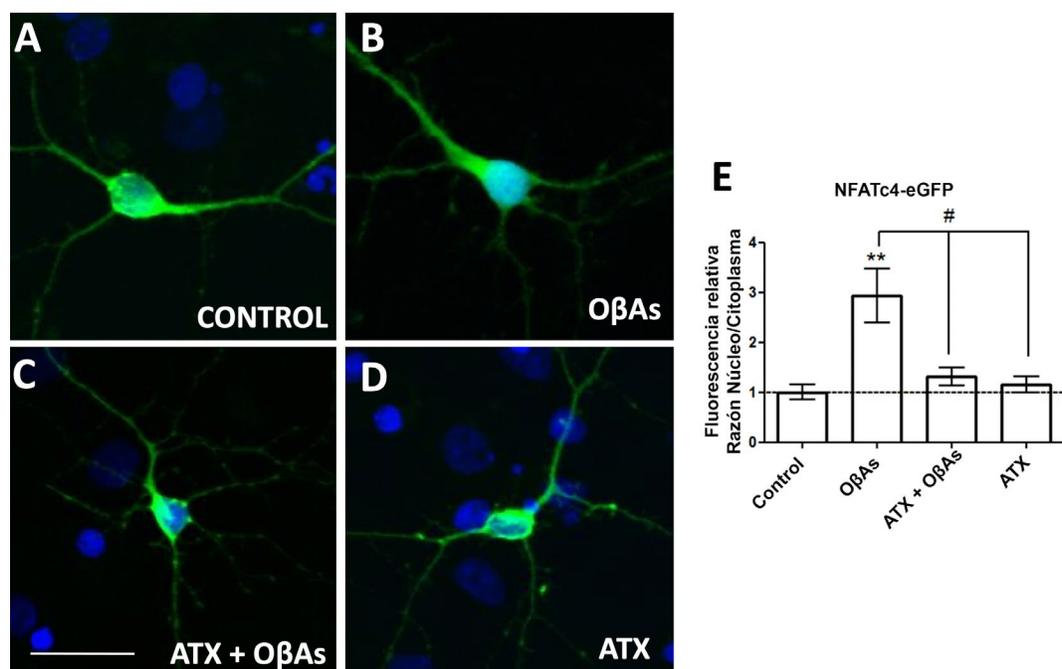


Figura 2.

Se incorporó a las neuronas la proteína NFATc4 fusionada a GFP (proteína fluorescente verde), lo que permitió hacer su seguimiento en la célula mediante la medición de la intensidad de fluorescencia. Los paneles A-D muestran la localización de NFATc4 (verde) y la de los núcleos (azul). En el gráfico E se ilustró en barras la intensidad de la fluorescencia del núcleo en relación a la del citoplasma, y a su vez comparadas al control (línea horizontal punteada). Se observó un aumento del promedio de la intensidad cuando las células fueron tratadas con los O β As, situación que no ocurrió en aquellas neuronas pretratadas con ATX.

La concentración de los compuestos adicionados fueron las siguientes: O β As $0,5 \cdot 10^{-6}$ M y ATX 0,1M. La barra blanca en la esquina inferior izquierda representa una distancia de 10^{-5} metros. Los valores de la relación de fluorescencia núcleo/citoplasma (presentados como promedio \pm error estándar) corresponden a la división de fluorescencia en el núcleo con la fluorescencia del citoplasma. Además, todas las condiciones se dividen nuevamente por el valor promedio de la condición control, de tal manera que nuestro valor de referencia, el control, sea 1. Los resultados corresponden a la medición en dos regiones neuronales proveniente de cuatro experimentos independientes, midiendo 15-25 neuronas para cada condición.



to, es complicado manejar el balance entre la producción EROs y su eliminación. Hoy sabemos que también un exceso de antioxidantes puede ser dañino (27), dado que varias funciones celulares requieren de un mínimo nivel de oxidación (28). Por lo tanto, es necesario conocer profundamente los posibles mecanismos y procesos afectados por los antioxidantes para definir apropiadamente sus efectos y dosificación.

En este trabajo, estudiamos los potenciales efectos protectores del antioxidante ATX en un modelo *in vitro* de neurotoxicidad (daño neuronal), asociada a la exposición de O β As (29). Los resultados muestran que el pretratamiento con ATX, por tiempos cortos, previene la producción de EROs mitocondriales y la translocación al núcleo de NFATc4 inducidos por los O β As, lo que supondría una especie de freno a la oxidación causada por los O β As, y una protección a la neurodegeneración que surge de la activación de NFATc4. Además, la ATX a las concentraciones trabajadas no provocó un efecto por sí misma, teniendo comportamientos muy parecidos a la condición control.

Para que este compuesto sea una terapia faltan muchos pasos. Estos resultados deben replicarse en sistemas más complejos. Para luego usar la droga en animales como ratas o ratones, luego en animales más parecidos a humanos y finalmente llevar a cabo ensayos en humanos que pueden to-

mar varios años. Hay que considerar que el sistema nervioso central es un blanco difícil de alcanzar para muchos compuestos, ya que está protegido de la exposición a sustancias tóxicas por la denominada **barrera hematoencefálica** (30). Si bien parecería muy difícil derribar este muro, la ATX al menos, en estructura y función, parece estar bien equipada para traspasar esta barrera (16).

La lista de artistas que participan en el proceso de estrés oxidativo es amplia, pero en este trabajo nos concentramos en la producción de H₂O₂ mitocondrial (31). Este lugar es la principal fuente de EROs en las células, aunque no la única, y si bien el H₂O₂ es menos dañino que otros EROs, posee algunas características que la hacen una molécula importante de estudiar. En particular, tiene una vida media más larga que otras EROs y posee una mayor movilidad (32), por lo tanto, puede afectar lugares lejanos a sus sitios de producción, en “*un largo tour*” (33) en distintos sitios dentro de la célula, perturbando el delicado equilibrio presente. Aún así, las propiedades atribuidas a la ATX tienen la posibilidad de alcanzar y detener este tour del terror, especialmente debido a su amplia distribución en la célula (34).

“Al final de este viaje” (35) es importante recordar que todos estos resultados son realizados en un contexto *in vitro*, por lo tanto, aún están lejos de representar un verdadero camino a la cura de la EA. No obstante, nos gusta-

Glosario

Barrera hematoencefálica: *corresponde a una estructura de tejido y vasos sanguíneos que actúa como barrera física y metabólica que separa al sistema nervioso central de la periferia.*

ría destacar uno de los versos de “*For Reasons Unknown*” - The Killers: “*Mis ojos ya no te reconocen más*”, forma en que, Brandon Flowers, relata la batalla de su abuela contra la EA (36); homenaje bastante adecuado considerando que pacientes avanzados en la enfermedad pueden recordar e incluso tararear canciones.

Futuros trabajos podrían confirmar este rol protector, además de ampliar los efectos de la ATX a otras especies oxidantes que han mostrado también una gran relevancia en el desarrollo de distintas enfermedades, tanto sistémicas como enfermedades neurodegenerativas, siendo un blanco atractivo para el desarrollo de futuros tratamientos (37). Esperamos que la ATX represente una incipiente guerrera en esta batalla, pero como “se hace camino al andar”(38), las investigaciones con este particular antioxidante deberán continuar, para que así, más pronto que tarde, podamos utilizar a esta roja exiliada del sur (39).

Referencias

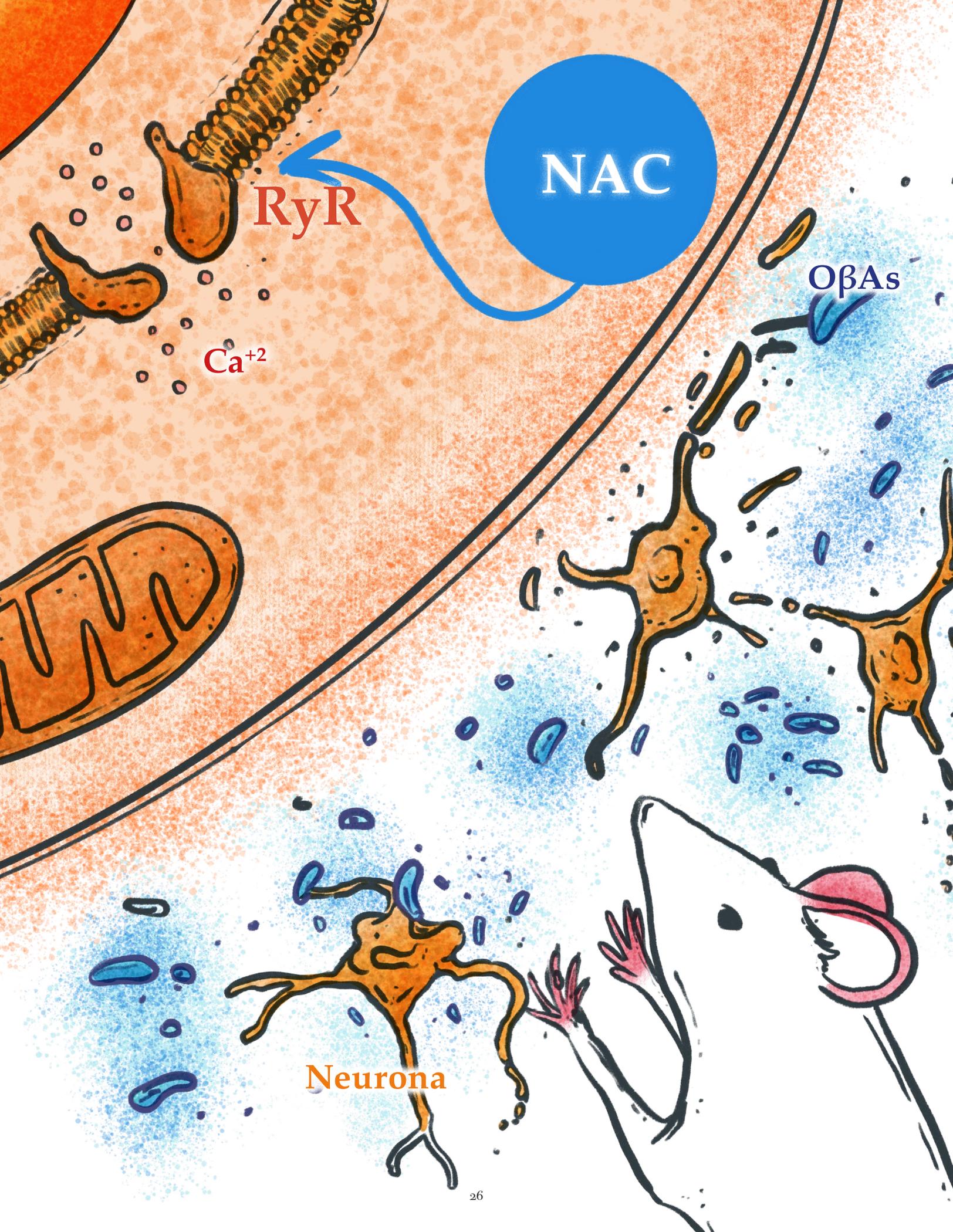
1. V. Parra, La Jardinera. <http://www.violetaparra100.cl/cancionero/la-jardinera/>.
2. K. A. Jellinger, Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research. *J Neural Transm (Vienna)* 113, 1603-1623 (2006).
3. C. Lopez-Otin, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, The hallmarks of aging. *Cell* 153,

- 1194-1217 (2013).
4. F. Mac, *Landslide*.
5. P. Floyd, *Time*.
6. J. A. Sorrentino, H. K. Sanoff, N. E. Sharpless, Defining the toxicology of aging. *Trends Mol Med* 20, 375-384 (2014).
7. B. A. Yankner, T. Lu, P. Loerch, The aging brain. *Annu Rev Pathol* 3, 41-66 (2008).
8. 2020 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, (2020).
9. C. L. Masters et al., Alzheimer’s disease. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15056 (2015).
10. S. T. Ferreira, M. V. Lourenco, M. M. Oliveira, F. G. De Felice, Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer’s disease. *Front Cell Neurosci* 9, 191 (2015).
11. C. D. SanMartin et al., RyR2-Mediated Ca(2+) Release and Mitochondrial ROS Generation Partake in the Synaptic Dysfunction Caused by Amyloid beta Peptide Oligomers. *Front Mol Neurosci* 10, 115 (2017).
12. H. Y. Wu et al., Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. *J Neurosci* 30, 2636-



- 2649 (2010).
13. W. V. Graham, A. Bonito-Oliva, T. P. Sakmar, Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu Rev Med* 68, 413-430 (2017).
14. F. Di Domenico, E. Barone, M. Perluigi, D. A. Butterfield, Strategy to reduce free radical species in Alzheimer's disease: an update of selected antioxidants. *Expert Rev Neurother* 15, 19-40 (2015).
15. K. J. Barnham, C. L. Masters, A. I. Bush, Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3, 205-214 (2004).
16. C. Galasso et al., On the Neuroprotective Role of Astaxanthin: New Perspectives? *Mar Drugs* 16, (2018).
17. X. Zhou et al., Inhibition of inflammation by astaxanthin alleviates cognition deficits in diabetic mice. *Physiol Behav* 151, 412-420 (2015).
18. Y. J. Kim, Y. A. Kim, T. Yokozawa, Protection against oxidative stress, inflammation, and apoptosis of high-glucose-exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin. *J Agric Food Chem* 57, 8793-8797 (2009).
19. W. Droge, Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95 (2002).
20. D. S. Bilan, V. V. Belousov, New tools for redox biology: From imaging to manipulation. *Free Radic Biol Med* 109, 167-188 (2017).
21. V. V. Belousov et al., Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3, 281-286 (2006).
22. M. Ichida, T. Finkel, Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276, 3524-3530 (2001).
23. L. Jara, Un golpe de suerte. <https://letraschile.com/luis-jara/golpe-de-suerte>. , (1992).
24. A. Young, Young, M. & Scott, B. , Highway To Hell. . <https://web.archive.org/web/20061020042215/http://www.acdcrocks.com/highwaytohell.html>. , (1979).
25. H. H. Schmidt et al., Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid Redox Signal* 23, 1130-1143 (2015).
26. A. Bast, G. R. Haenen, Ten misconceptions about antioxidants. *Trends Pharmacol Sci* 34, 430-436 (2013).
27. E. R. Miller, 3rd et al., Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142, 37-46 (2005).
28. C. A. Massaad, E. Klann, Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 14, 2013-2054 (2011).

29. P. Lobos et al., Astaxanthin Protects Primary Hippocampal Neurons against Noxious Effects of Abeta-Oligomers. *Neural Plast* 2016, 3456783 (2016).
30. G. C. Terstappen, A. H. Meyer, R. D. Bell, W. Zhang, Strategies for delivering therapeutics across the blood-brain barrier. *Nat Rev Drug Discov* 20, 362-383 (2021).
31. R. B. Hamanaka, N. S. Chandel, Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* 35, 505-513 (2010).
32. J. R. Stone, S. Yang, Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 8, 243-270 (2006).
33. S. Lluvia, Un largo tour. <https://www.youtube.com/watch?v=v-9MoV1Ny23s>, (1989).
34. E. Rodrigues, L. R. Mariutti, A. Z. Mercadante, Scavenging capacity of marine carotenoids against reactive oxygen and nitrogen species in a membrane-mimicking system. *Mar Drugs* 10, 1784-1798 (2012).
35. S. Rodriguez, Al final de este viaje. https://es.wikipedia.org/wiki/Al_final_de_este_viaje.
36. T. Killers, For Reasons Unknown. https://es.wikipedia.org/wiki/For_Reasons_Unknown.
37. A. I. Casas et al., On the Clinical Pharmacology of Reactive Oxygen Species. *Pharmacol Rev* 72, 801-828 (2020).
38. J. M. Serrat, Caminante no hay camino. <https://www.youtube.com/watch?v=mGN3ekbC-6g>.
39. V. B. Parra, L. , La exiliada del Sur. <https://www.youtube.com/watch?v=8c0ec9snZHE>.



NAC

RyR

Ca⁺²

OβAs

Neurona



¿UNA DIETA RICA EN ANTIOXIDANTES AYUDA A PREVENIR LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER?

La N-acetilcisteína previene los déficits de memoria espacial y la disminución de RyR2 dependiente de redox mostrada por un modelo de rata con enfermedad de Alzheimer.

Adaptado por

Silvia Gleitze, Karla Padilla, Iván Plaza Andrea Paula-Lima*

Afiliación

Instituto de Neurociencia Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

**Departamento de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile*

Autores

Jamileth More^a, Nadia Galusso^b, Pablo Veloso^c, Luis Montecinos^d, José Pablo Finkelstein^d, Gina Sanchez^{d,e}, Ricardo Bull^f, José Luis Valdés^{a,g}, Cecilia Hidalgo^{a,d,f,g} y Andrea Paula-Lima^{a,c,g,h}

Afiliación

^aFacultad de Medicina, Instituto de Neurociencia Biomédica, Universidad de Chile, Santiago, Chile,

^bDepartamento de Neuroquímica, Stockholm University, Stockholm, Sweden,

^cInstituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile,

^dCEMC, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile,

^ePrograma de Fisiopatología, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile,

^fPrograma de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile,

^gDepartamento de Neurociencia, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Glosario

Retículo endoplasmático (RE): es un organelo celular, que forma una red de estructuras parecidas a bolsas y tubos, que se encuentra en el citoplasma, cuya superficie exterior puede ser lisa o rugosa. El RE rugoso tiene ribosomas en su superficie y es el lugar donde se sintetiza alrededor del 30% de todas las proteínas de una célula. En el RE liso es donde se sintetizan lípidos y carbohidratos (azúcares).

Citoplasma: corresponde a la parte interior de la célula entre la membrana plasmática y el núcleo, está compuesta por agua, sales, diversas moléculas orgánicas y donde se encuentran los organelos como las mitocondrias.

1. Introducción

¿Desearías vivir muchos años? si así fuese, ¿te gustaría conservar todos tus recuerdos? La mayoría de nosotros tiene grandes expectativas en los avances que la medicina ofrece hoy en día. Sin embargo, el aumento en la esperanza de vida se ve acompañado de un deterioro en el funcionamiento del cerebro, como por ejemplo, la pérdida de memoria que se observa en la enfermedad de Alzheimer (EA). Pero ¿qué tan frecuente es esta enfermedad?, en la actualidad 1 de cada 10 personas sobre los 65 años ha sido diagnosticado con Alzheimer, y esta probabilidad aumenta con los años (datos obtenidos de Alzheimer 's Association). En Chile, aproximadamente el 1% de la población presenta algún tipo de demencia y se ha descrito que tanto la edad avanzada como los estilos de vida poco saludables favorecen que se desarrolle este deterioro cerebral progresivo.

¿Qué síntomas caracterizan la enfermedad? La EA es neurodegenerativa, es decir, mueren las células nerviosas del cerebro, llamadas neuronas. Entre los síntomas más conocidos está la pérdida de memoria y la alteración de la orientación espacial (1).

¿Cuáles son las causas de la enfermedad? Estudios científicos han descrito que ciertas proteínas del cerebro no trabajan de forma normal y afectarían el funcionamiento de las neuronas. Estas proteínas, que son tóxicas para las

neuronas, en realidad son fragmentos de proteína, o péptidos, conocidos como oligómeros beta-amiloide (OβAs) (2, 3). Los OβAs provocan un proceso llamado "estrés oxidativo", causado por un aumento de las especies reactivas de oxígeno (EROs), el cual ya no es reparable por las neuronas del hipocampo, la región del cerebro responsable de la memoria, afectando así mecanismos claves para la memoria y la orientación espacial (4-7).

Uno de estos mecanismos claves es el desequilibrio del ión calcio dentro de la célula. En la membrana del **retículo endoplasmático** existe una proteína, llamada canal receptor de rianodina (RyR), que tiene como función regular el paso del **ión calcio** desde el interior de este organelo al **citoplasma** (8, 9). Cuando RyR es modificado por los EROs, cambia la frecuencia con la cual este canal permite la salida descontrolada de calcio al citoplasma, generando un impacto negativo en las neuronas que permiten el acceso a las memorias y la formación de éstas, que incluso puede inducir la muerte neuronal (10-12).

La buena noticia es que diferentes grupos de científicos y científicas se encuentran en la búsqueda de diferentes formas de prevenir y de tratar la EA. En las últimas décadas, surgió la idea de que los antioxidantes podrían ser buenos candidatos terapéuticos para prevenir y/o enlentecer el desarrollo de la enfermedad (13). De-



bido a que los efectos de los O β As no han sido estudiados en modelos animales, en este trabajo se investigó si la inyección de O β As en el hipocampo de ratas, la región del cerebro que es requerida para la formación de nuevas memorias, afecta la orientación espacial debido al cambio de las señales de calcio. Adicionalmente, se evaluó si una dieta con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) puede evitar los efectos causados por los O β As, previniendo así la EA.

2. Métodos

Animales

Se utilizaron ratas macho jóvenes de 7 semanas de edad entre 150 y 170 gramos de la cepa Sprague-Dawley del Centro de Cuidado Animal de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Las ratas fueron cuidadas individualmente en un entorno controlado con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a 21-23 grados celsius, con comida y agua a libre demanda. Los protocolos experimentales utilizados fueron aprobados por el Comité de Bioética en Investigación Animal, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Cirugías para implantar cánulas cerebrales para la inyección de O β As en el hipocampo.

Para estudiar la EA en modelos animales como las ratas que no la desarrollan naturalmente, es ne-

cesario simular la enfermedad. En este caso particular se utilizaron fragmentos de O β As, los cuales se inyectaron a través de cánulas en los hipocampos de ratas jóvenes. Como condición control se inyectó solución salina. Con este objetivo se realizó una cirugía y se siguieron coordenadas específicas para lograr instalar cánulas que permitan llegar a este tejido. Durante tres días consecutivos, posterior a la cirugía de canulación, se administraron medicamentos para evitar algún tipo de infección o inflamación. El tiempo de recuperación de las ratas fue de 7 días antes de iniciar las sesiones de pre-entrenamiento y pruebas conductuales.

Alimentación con NAC

Se suministró por medio de la alimentación el antioxidante NAC con el fin de evaluar un posible tratamiento en los efectos de la EA. Las ratas fueron alimentadas durante 21 días consecutivos con jalea comercial (1 mL) que contiene el antioxidante NAC (200 mg/kg) o solución salina que corresponde al grupo control sin NAC. La alimentación NAC se mantuvo durante todos los procedimientos indicados en las próximas secciones.

Entrenamiento y evaluación de la memoria espacial

Para medir el aprendizaje espacial en ratas, se utilizó la prueba conductual llamada laberinto Oasis (14), esta

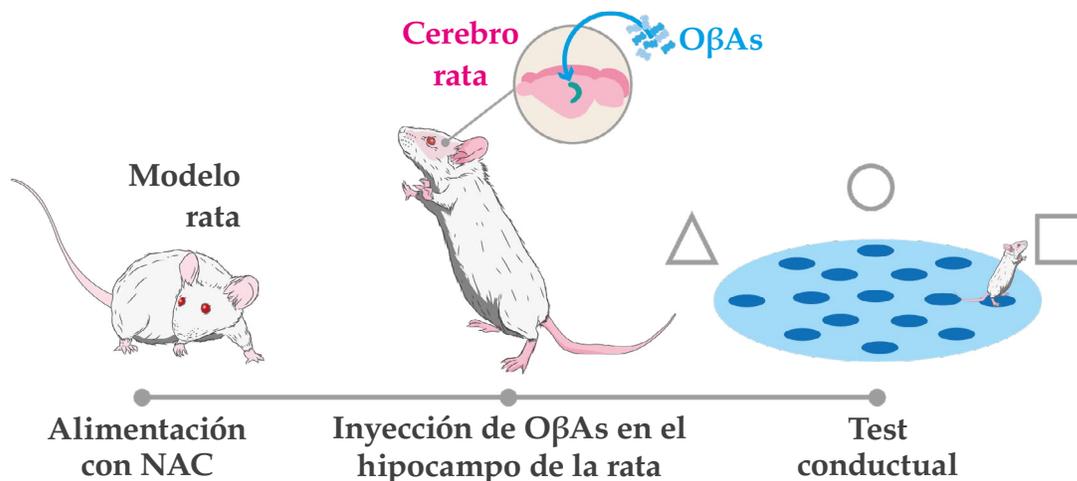
Glosario

ión calcio (Ca²⁺): se ha definido como un mensajero dentro de la célula, el cual es utilizado por distintas hormonas o neurotransmisores para activar diversas funciones en las células desde la contracción muscular, la secreción de proteínas y la transmisión del impulso nervioso en neuronas.

Diseño experimental

Diseño experimental: ratas fueron alimentadas con NAC durante 21 días.

Luego, se inyectó en el hipocampo fragmentos de oligómeros de beta amiloide (OβAs) y como grupo control se inyectó solución salina. Finalmente se evaluó la memoria espacial de las ratas a través de la prueba conductual Laberinto Oasis.



prueba utiliza una plataforma circular de 1.4 metros de diámetro localizada a 50 centímetros de altura desde el piso con un pared de 20 centímetros de altura, ésta fue ubicada en una sala aislada y con la presencia de claves espaciales, las cuales sirven como guía para la orientación del animal. La plataforma contiene 21 pocillos equidistantes en su interior donde fue ubicada la comida o el agua.

Para esta prueba se utilizaron dos grupos diferentes de ratas, los animales del grupo control, que no recibieron suplementación con NAC y las del grupo experimental que recibieron la suplementación con NAC.

¿Cómo se midió el aprendizaje espacial en ambos grupos de ratas?

Inicialmente, las ratas fueron condicionadas restringiendo su alimento o agua para aumentar su motivación para la búsqueda de comida. Posteriormente, fueron entrenadas para familiarizarse con el entorno de la

prueba (plataforma circular y señales visuales), promoviendo la búsqueda de una recompensa (comida o agua) en los 21 agujeros del laberinto.

Terminada la fase de reconocimiento, comenzó la fase de pre-entrenamiento, donde todos los pocillos contenían la recompensa. Finalizada la tercera sesión de esta fase, los animales recibieron 3 inyecciones de OβAs o solución control salina, en el transcurso de 48 horas.

La fase de formación que permitió medir el aprendizaje espacial comenzó 24h después de la primera inyección de OβAs, esta consistía en buscar la recompensa en uno de los 21 agujeros durante seis sesiones diarias de 15 ensayos de 1 minuto cada uno. La recompensa se colocó en un pocillo diferente en cada sesión para promover un nuevo aprendizaje espacial. Una hora después del final de la sexta sesión, los animales fueron sometidos a eutanasia para obtener el tejido del hipocampo y posteriormente ser analizado.

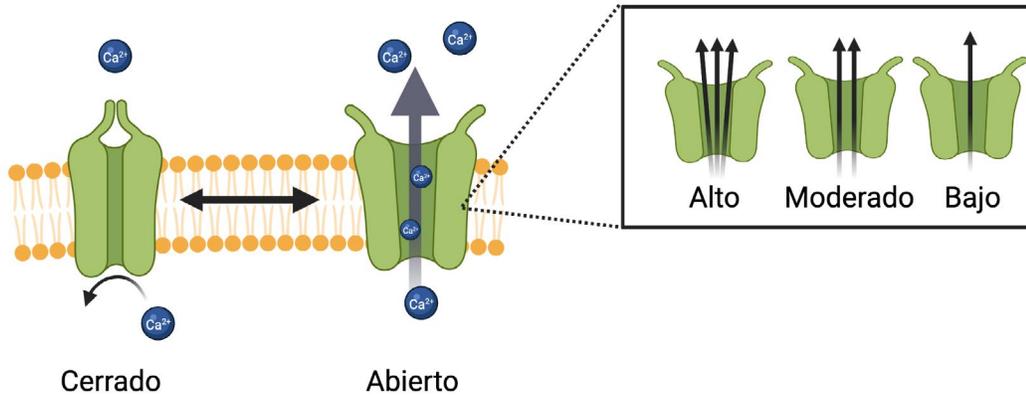


Figura 1.

Esquema representativo de la conformación cerrada o abierta de un canal iónico. Las flechas representan el flujo del ión calcio (círculos azules) de acuerdo a los tres niveles de actividad del estado abierto: alto, moderado y bajo.

Determinación de la actividad del canal único RyR

Para poder estudiar qué tan activo es el canal receptor RyR que permite el paso de calcio, se generaron “membranas artificiales” simulando un ambiente que imita las condiciones en las que se encuentra este canal en la célula. Una vez creadas las membranas, se le incorporaron los receptores RyR que se extrajeron de las neuronas del hipocampo de los distintos grupos experimentales por separado (15-17). La actividad de los canales se midió en función de cuánto calcio permitían pasar los RyR y se clasificó en tres niveles de actividad: alto, moderado y bajo (**Figura 1**).

Análisis estadístico

Para comparar el efecto de NAC a nivel celular, se comparó el grado de activación del receptor RyR entre los distintos grupos de estudio: i) salino, ii) OβAs + salino, iii) NAC + salino, iv) OβAs + NAC. Para ello se utilizaron pruebas estadísticas llamadas análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés), en donde se busca comparar qué tan diferentes son los grupos comparados. Se utilizó esta misma prueba

estadística para evaluar el efecto del NAC a nivel conductual, esta vez se compararon los tiempos que tardaron las ratas de los distintos grupos en completar la prueba de orientación espacial.

3. Resultados

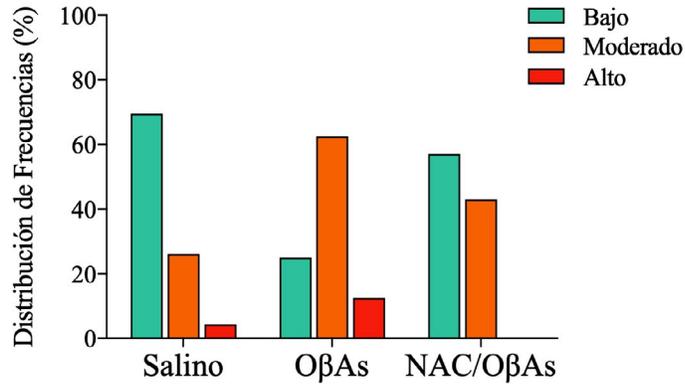
a) Inyecciones de OβAs en el hipocampo modifican la actividad de canales de calcio RyR aislados, efecto que fue disminuido por el tratamiento con NAC.

Como mencionamos, los OβAs pueden aumentar los EROs dentro de la célula, lo cual desencadena diferentes procesos, entre ellos el cambio en la actividad del canal receptor RyR para el traspaso de calcio. Como previamente hemos descrito, los RyR presentan tres tipos de actividad: baja, moderada o alta.

Con el objetivo de determinar si la presencia de los OβAs puede modificar la actividad de los RyR, y además que el tratamiento con el antioxidante NAC puede restablecer los estados de los canales se analizó la distribución de frecuencia de los tres tipos de actividad de RyR. Es decir, del total de canales

Figura 2.

NAC disminuye el efecto de los O β As que aumentan la actividad de RyR. El gráfico indica la distribución de frecuencia de la incorporación de canales individuales con actividad baja (barras verdes), moderada (barras naranjas) o alta (barras rojas) inducida por calcio. Los resultados están mostrados del grupo control (salina), del grupo inyectado con O β As y del grupo inyectado con O β As y alimentados con NAC. $n = 3$ animales para cada grupo experimental.



presentes en la muestra se determinó cuántos de ellos correspondían a bajo, moderado o alto en los distintos grupos experimentales.

Como se observa en la **Figura 2** en la condición control o salino, el 70% de los canales observados corresponden a canales de baja actividad. En el grupo de ratas inyectadas con O β As se observa una redistribución de la frecuencia de los canales evidenciando un mayor porcentaje de canales con actividad moderada y alta para el traspaso del ion calcio. Estos resultados muestran, por primera vez, que las inyecciones de O β As en el hipocampo aumentaron aproximadamente de dos a tres veces las probabilidades de encontrar canales RyR con actividades aumentadas en comparación con el grupo control. Interesantemente, cuando se midió la frecuencia de los canales en el grupo experimental que recibió la suplementación con el antioxidante NAC por 21 días, se observó la ausencia en la frecuencia de canales de alta actividad, mientras que los moderados y bajos presentan una distribución si-

milar al grupo control salino.

b) El consumo de NAC mejora el rendimiento de los animales en la orientación espacial al compararlos con los animales inyectados con O β As en el hipocampo.

Con el objetivo de determinar si la alimentación de NAC mejora el rendimiento de los animales el laberinto Oasis, evaluamos 4 grupos experimentales:

- i) Animales inyectados con solución salina (salino)
- ii) Animales inyectados con A β Os
- iii) Animales inyectados con solución salina (salino) alimentados con NAC
- iv) Animales inyectados con A β Os alimentados con NAC.

Como se observa en la **Figura 3A** se evaluaron los siguientes parámetros (A) la tasa de acierto, el que se define como el número de veces en que la rata encontró la comida, (B) la latencia que corresponde al tiempo en segundos que demora en encon-



trar la comida y (C) la razón entre la distancia esperada (distancia más corta entre el inicio del recorrido y la comida) y la distancia recorrida, donde mientras el valor sea más cercano a 1 significa que la trayectoria que realiza la rata es similar a la esperada.

Como se observa en la **Figura 3A**, el grupo inyectado con A β O_s mostró una disminución en el número de aciertos en las sesiones 1 a 4, que

fueron significativamente más bajos que los observados en el grupo control en las seis sesiones. Sin embargo, es importante destacar que las ratas inyectadas con A β O_s en las sesiones 5 y 6 mostraron números de acierto similares a las de los otros tres grupos, lo que indica que se demoraron más que el grupo control en aprender la tarea pero lograron hacerlo. Interesantemente, observamos que las ratas inyectadas con A β O_s y ali-

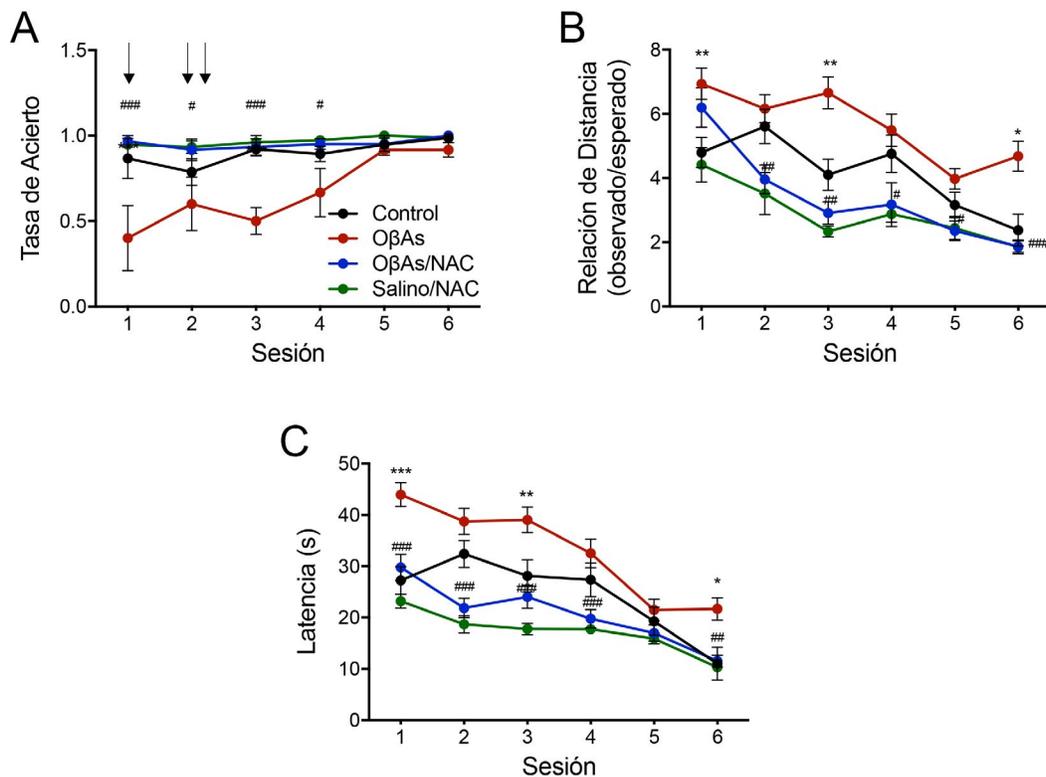


Figura 3.

La suplementación con NAC vía oral previene el deterioro de la memoria espacial causado por las inyecciones de O β As en el hipocampo. La memoria espacial fue evaluada en los 4 distintos grupos de 6 ratas cada uno en una tarea de laberinto oasis. Las ratas alimentadas con NAC o control (salino) durante 21 días e inyectadas en el hipocampo con O β As o solución salina se evaluaron en la tarea del laberinto Oasis. (A) Cuantificación de las tasas de aciertos para cuatro grupos de animales: inyectados con solución salina (línea negra), con O β As (línea roja), alimentados con NAC e inyectados con O β As (línea azul) y alimentados con NAC e inyectados con solución salina (línea verde). Las inyecciones están indicadas por flechas. (B) Cuantificación de la latencia en cada sesión diaria para los cuatro grupos definidos en A. (C) Distancia de ratios para los cuatro grupos experimentales en cada sesión diaria. Los valores representan promedio \pm error estándar ($n = 6$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA bidireccional, seguido de prueba post hoc de Holm-Sidak; $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ en comparación con el grupo de control; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo inyectado con O β As.

mentadas con el antioxidante NAC durante las 6 sesiones mostraron valores similares al grupo control, estos resultados nos muestran que los animales a pesar de haber sido inyectados con A β O aprendieron la tarea tan rápido como el grupo control.

En la **Figura 3B** observamos que los 4 grupos experimentales progresivamente disminuyen el tiempo de latencia, es decir el tiempo que demoran en encontrar la recompensa (comida) durante el transcurso de las distintas sesiones, mostrando que existe un aprendizaje de la tarea. No obstante el grupo experimental inyectado con los O β As en todas las sesiones demoró más en encontrar la recompensa y de esta forma cumplir la tarea. Asimismo, en las seis sesiones, las relaciones entre las distancias observadas / esperadas; es decir si el animal usó el camino más corto u otro más largo, lo que significa si se acuerda o no dónde se encuentra el pocillo con la recompensa; fueron mayores para el grupo inyectado con O β As en comparación con los otros tres grupos (**Figura 3C**), aunque todos los grupos mostraron una disminución en este parámetro en función del transcurso de sesiones. Estos resultados muestran que la alimentación con NAC ayudó a prevenir los efectos nocivos de la inyección de los O β As en la navegación de ratas en la tarea de memoria espacial del laberinto Oasis en los

tres parámetros de comportamiento evaluados. Un resultado inesperado es que la alimentación solo con NAC parece mejorar el aprendizaje de los animales, y que en animales.

4. Discusión

Cuando los científicos y científicas realizan investigaciones, incluso dentro de un mismo laboratorio, pueden estudiar fenómenos idénticos desde distintas perspectivas siguiendo caminos paralelos para construir colaborativamente nuevos conocimientos. En este contexto, la EA es un fenómeno ampliamente estudiado alrededor del mundo, considerando la alta incidencia de esta enfermedad en personas mayores de 65 años, y el fuerte impacto que tiene su diagnóstico en la vida de las personas que la padecen junto con las personas que las cuidan.

En este estudio se investigó el efecto de una dieta con antioxidantes, específicamente el NAC, como un posible tratamiento para prevenir o disminuir los síntomas asociados a la EA, generados por la presencia de O β As. Como se observó en los resultados, determinamos que la inyección de O β As en el hipocampo de ratas aumentó la actividad de canales RyR, y además generó un impacto negativo en el aprendizaje espacial y la memoria.

Como un posible mecanismo se propone que la inyección de los O β As aumenta el estrés oxidativo dentro de las neuronas, que produce un efecto en muchas proteínas, cambiando su



actividad, entre ellas los canales RyR cuyo efecto es la mayor liberación de calcio desde el retículo endoplasmático. La mayor liberación de calcio genera un desequilibrio de los procesos dentro de la célula importantes para la formación de la memoria. Esto se relaciona con los datos obtenidos respecto al aumento en la frecuencia de canales de actividad alta en neuronas expuestas a O β As.

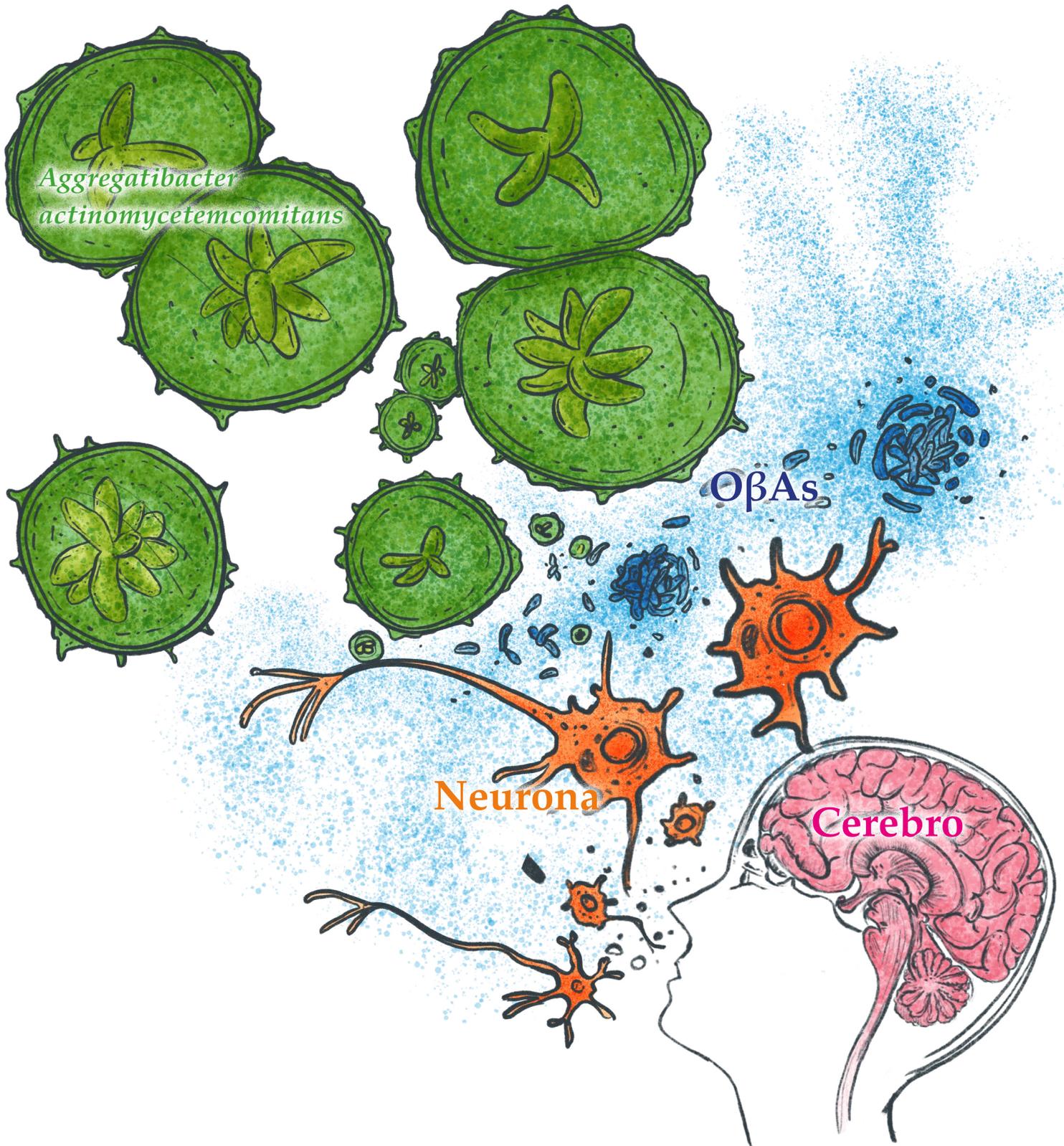
En la búsqueda de un posible tratamiento que permita prevenir o retrasar la EA, en este estudio demostramos que alimentar a las ratas con el antioxidante NAC logró reducir los efectos generados por los O β As, tanto en la frecuencia de la actividad de los canales como en el rendimiento de los animales en la tarea de aprendizaje y memoria espacial en todos los parámetros evaluados.

Finalmente, podemos concluir que la alimentación con antioxidante NAC en un modelo de la EA en ratas generó efectos positivos en el desempeño en tareas de orientación espacial y previno el aumento de actividad del canal RyR asociado a la inyección de O β As. A pesar de estos prometedores resultados, es importante destacar que suplementar la dieta con NAC en humanos no ha sido evaluado, y la dieta rica en antioxidantes debe seguir siendo estudiada en próximas investigaciones.

Referencias

1. A. B. Reiss, H. A. Arain, M. M. Stecker, N. M. Siegart, L. J. Kasselmann, Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 29, 613-627 (2018).
2. K. H. Tse, K. Herrup, Re-imagining Alzheimer's disease - the diminishing importance of amyloid and a glimpse of what lies ahead. *Journal of neurochemistry* 143, 432-444 (2017).
3. D. J. Selkoe, J. Hardy, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595-608 (2016).
4. J. Brito-Moreira et al., Abeta oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons. *Curr Alzheimer Res* 8, 552-562 (2011).
5. A. C. Paula-Lima, J. Brito-Moreira, S. T. Ferreira, Dereglulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 126, 191-202 (2013).
6. E. Area-Gomez et al., A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Cell Death Dis* 9, 335 (2018).
7. E. Popugaeva, E. Pchitskaya, I. Bezprozvanny, Dysregulation of Intracellular Calcium Signaling in Alzheimer's Disease. *Antioxid Redox Signal* 29, 1176-1188 (2018).
8. C. Hidalgo, Cross talk between Ca²⁺ and redox signalling cascades in muscle and neurons through the

- combined activation of ryanodine receptors/ Ca^{2+} release channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 2237-2246 (2005).
9. C. Hidalgo, P. Donoso, Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10, 1275-1312 (2008).
10. P. Munoz et al., Iron mediates N-methyl-D-aspartate receptor-dependent stimulation of calcium-induced pathways and hippocampal synaptic plasticity. *The Journal of biological chemistry* 286, 13382-13392 (2011).
11. A. C. Paula-Lima et al., Amyloid beta-peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca^{2+} release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. *Antioxid Redox Signal* 14, 1209-1223 (2011).
12. D. Riquelme et al., High-frequency field stimulation of primary neurons enhances ryanodine receptor-mediated Ca^{2+} release and generates hydrogen peroxide, which jointly stimulate NF-kappaB activity. *Antioxid Redox Signal* 14, 1245-1259 (2011).
13. J. More et al., N-Acetylcysteine Prevents the Spatial Memory Deficits and the Redox-Dependent RyR2 Decrease Displayed by an Alzheimer's Disease Rat Model. *Front Aging Neurosci* 10, 399 (2018).
14. R. E. Clark, N. J. Broadbent, L. R. Squire, Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus* 15, 260-272 (2005).
15. R. Bull, J. J. Marengo, J. P. Finkelshtein, M. I. Behrens, O. Alvarez, SH oxidation coordinates subunits of rat brain ryanodine receptor channels activated by calcium and ATP. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C119-128 (2003).
16. R. Bull et al., Ischemia enhances activation by Ca^{2+} and redox modification of ryanodine receptor channels from rat brain cortex. *J Neurosci* 28, 9463-9472 (2008).
17. J. J. Marengo, R. Bull, C. Hidalgo, Calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels from brain cortex endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 383, 59-62 (1996).





BACTERIA ORAL PODRÍA PRODUCIR INFLAMACIÓN Y DAÑOS EN EL CEREBRO RELACIONADOS CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Adaptado por

Farías, C., Dankert, C., Sagredo, K., Lira, H. & Muñoz, I.

Afiliación

Escuela de Pregrado, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Autores

*Díaz, J.^{ab}, Muñoz, Y.^c, Melgar, S.^a, Moreb, J.^b, Bruna, B.^b, Lobos, P.^b, Monasterio, G.^a,
Vernal, R.^{ad} & Paula-Lima, A.^{be}*

Afiliación

*^aDepartamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología,
Universidad de Chile, Santiago, Chile*

*^bInstituto de Neurociencia Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad de
Chile, Santiago, Chile.*

*^cLaboratorio de Envejecimiento Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de
Chile, Santiago, Chile*

*^dUnidad de Odontología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad
Autónoma de Chile, Temuco, Chile*

*^eInstituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología,
Universidad de Chile, Santiago Chile*

Glosario

Anticuerpo: son proteínas producidas por el sistema inmune al detectar sustancias dañinas, llamadas antígenos, que pueden ser microorganismos o químicos.

Patógeno: es aquel agente infeccioso que puede causar una enfermedad en un organismo hospedador.

Neuronas: son células altamente especializadas del sistema nervioso, a nivel estructural se componen de un soma o cuerpo y un axón. A nivel funcional responde a los estímulos al generar un impulso nervioso que se transmite a otra neurona, a un músculo o a una glándula.

1. Introducción

¿Cuántas veces tus padres te recordaron que te lavaras los dientes después de cada comida? ¿Por qué crees que lo hacían? El motivo es porque en nuestra boca habitan numerosas bacterias, la mayoría de estas no nos generan daño, sin embargo existen otras bacterias que nos pueden generar enfermedades, incluso, algunas podrían participar en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA). ¿Cómo? te preguntarás, una cosa es olvidar cepillarse los dientes, pero olvidar todos nuestros recuerdos parece algo.... increíble.

Existen diversas enfermedades que pueden generarse dentro de nuestra boca. Entre las enfermedades más conocidas podemos encontrar la gingivitis, en donde la agrupación de bacterias forma una biopelícula conocida como placa bacteriana o "sarro", provocando la inflamación de las encías ocasionando sangrado al cepillar, o sin razón aparente. Cuando la gingivitis no es tratada, se genera un desequilibrio en las comunidades bacterianas, progresando a Periodontitis o también conocida como Enfermedad Periodontal (EP) (1). En esta enfermedad además de la inflamación, se genera la pérdida del hueso que soporta al diente, pudiendo llegar a la pérdida de las piezas dentales (1). Tanto la gingivitis como la EP son enfermedades odontológicas bastante silenciosas y pueden pasar desapercibidas durante mucho tiempo.

La inflamación observada en la EP se produce debido a toxinas producidas por las bacterias, donde nuestro organismo al encontrarse con esta invasión, responderá activando al sistema inmune a través de diferentes mecanismos, como por ejemplo la producción de **anticuerpos**. Sin embargo, en ocasiones estos microbios pueden viajar por el torrente sanguíneo llegando a otras zonas u órganos del cuerpo, como al cerebro (2).

Algunas de las bacterias **patógenas** que pueden causar estas enfermedades son la **Porphyromonas gingivalis** (Pg) y la **Aggregatibacter actinomycetemcomitans** (Aa). Las bacterias Aa no son todas iguales, por lo que han sido clasificadas en subtipos o también llamados serotipos, siendo los más frecuentes en humanos el subtipo a que mayormente está presente en encías saludables, y los subtipos b y c que se asocian a personas con periodontitis agresiva (3-6) .

Pero volvamos a la pregunta inicial, ¿cómo participan las bacterias en el desarrollo de la EA? Todo empezó cuando un grupo de investigadores detectó en pacientes mayores de 60 años diagnosticados con la EA, una mayor cantidad de anticuerpos contra la bacteria Pg. Este hallazgo iba acompañado de un pobre rendimiento cognitivo en comparación a personas sanas (7). Similares resultados fueron obtenidos en el cerebro de ratas, donde se evidenció la presencia de Pg acompañado de un deterioro en la



memoria y un aumento en la inflamación de las células cerebrales de estos animales (8).

Entonces, para comenzar a entender cómo se relaciona la EP con la EA, debemos saber qué células hay en el cerebro. En el cerebro existen diferentes tipos celulares, como **neuronas, astrocitos y microglías**. Específicamente, las microglías participan en la defensa del tejido cerebral, a través de un proceso llamado **fagocitosis**.

Diferentes tipos de daños o microorganismos invasores generan un estado de inflamación crónica en el cerebro, promoviendo el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (9) ¿Cómo sucede esto? Cuando las microglías reciben estos estímulos, responderán especializándose y modificando su función en 2 tipos: M1 o M2(10). La microglía tipo M1, aumenta la liberación de moléculas proinflamatorias que permitirán combatir una infección. Por otro lado, la microglía tipo M2, ocurre el proceso contrario, produce moléculas antiinflamatorias que ayudan a revertir el daño y cicatrizar el tejido (10).

Sin embargo, si prevalece por tiempos largos la presencia de microglía de tipo M1 (por ejemplo una infección crónica) y la de tipo M2 no puede neutralizar a las moléculas inflamatorias, las células del cerebro están inflamadas permanentemente, lo que podría generar más

daño cerebral (10). Este proceso induce un estrés en el cerebro (menor nivel de glucosa y oxígeno), lo que afecta el funcionamiento de las neuronas que puede inducir su muerte. Cuando en nuestro cerebro ocurren estos episodios de inflamación, se genera un ambiente ideal que desencadena la producción y acumulación de **OβAs**, relacionado con la EA (11-13).

Las investigaciones previas indican que las EP están relacionadas con la EA (7, 14), mostrando una asociación entre los anticuerpos producidos contra la bacteria Pg presente en la boca. Sin embargo, no hay reportes de una posible relación de la bacteria Aa con esta enfermedad neurodegenerativa, a pesar de su conocido papel en formas agresivas de periodontitis.

Debido a esto en este trabajo proponemos que “Los serotipos de la bacteria Aa relacionados a la periodontitis agresiva, es decir los serotipos b y c, generan una respuesta inflamatoria en las células cerebrales (por activación de las microglías tipo M1), causando daños neuronales similares a los observados en la EA”.

2. Métodos

¿De qué manera podemos observar cómo actúan los diferentes tipos de bacterias Aa en las células cerebrales?

Para responder esta pregunta trabajamos con cultivos celulares, que corresponden a un proceso de obtención de células a

Glosario

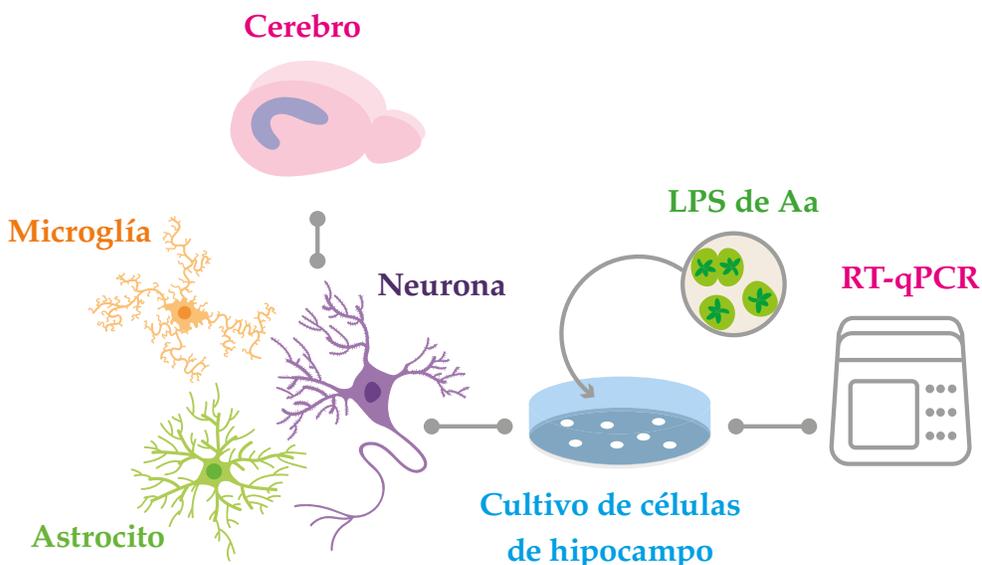
Microglía: un tipo de célula glial que se encuentra en el sistema nervioso que actúa como célula inmune y poseen la capacidad de realizar fagocitosis.

Astroцитos: es una célula glial del sistema nervioso que mayoritariamente poseen forma de estrella. Se ha definido que los astrocitos son necesarios para la comunicación entre neuronas, como también para el suministro de los metabolitos que las neuronas necesitan para funcionar.

Fagocitosis: es el proceso donde células especializadas absorben o endocitan agentes patógenos o células muertas.

Diseño experimental

Se adicionó lipopolisacárido (LPS) de los distintos serotipos de la bacteria Aa, a cultivos de células de hipocampo enriquecidas en neuronas, astrocitos y microglías. Posteriormente, se evaluó los niveles de ARN mensajero de moléculas anti y pro-inflamatorias a través de la técnica de RT-qPCR



Glosario

OβAs: es un péptido de 36 a 42 aminoácidos que se sintetiza a partir de la proteína precursora del amiloide. Se relaciona con la Enfermedad de Alzheimer ya que compone las placas amiloides.

Lipopolisacárido (LPS): es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

partir de un tejido específico para ser cultivadas y manipuladas en condiciones controladas. Los cultivos celulares son mantenidos dentro de una cámara que posee la temperatura adecuada para su crecimiento, y se cultivan en placas tipo petri con un medio líquido que contiene todos los nutrientes necesarios para su supervivencia. En el área de la biología celular son ampliamente utilizados para simular el impacto que podrían tener ciertos tratamientos, en este caso los distintos serotipos de bacteria Aa. En este estudio, se obtuvieron células y de hipocampo, enriquecidos en neuronas, astrocitos y microglías de ratas (15). Al medio líquido del cultivo celular se adicionó una parte de la estructura externa de los diferentes serotipos de la bacteria Aa, llamado **lipopolisacárido (LPS)**

(16). Cabe destacar que en una correcta investigación, los resultados siempre deben ser comparados con una condición control o basal, en este experimento se comparó con una condición control de células cerebrales a las que no se agregó LPS en el cultivo.

¿Cómo podemos saber si existe un aumento en los niveles de una proteína que produce la célula en respuesta a la bacteria Aa?

Las células contienen información en su material genético o ADN. Así, según la información o genes que contenga su ADN, son los tipos de proteínas que expresará. La expresión de un gen tiene 2 etapas, la transcripción, en donde la célula codifica la información del ADN y la convierte en una



hebra de ARN mensajero (ARNm). Luego el código contenido en el ARN mensajero o molde, es traducido para que la célula genere una proteína.

Para evaluar si se genera un aumento en la producción de proteínas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias se mide si hay un aumento de ARNm de estas proteínas. Para ello se realiza una técnica llamada transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa (RT-qPCR) (16). Esta técnica permite cuantificar la cantidad del ARNm presente en la célula que codifica para proteínas con función inflamatoria.

Finalmente, *¿Cómo podemos estudiar el efecto de los serotipos a, b y c de la bacteria Aa en la forma y tamaño de las células cerebrales?*

Para estudiar los efectos que tiene el LPS de los distintos serotipos de bacterias en la forma (morfología) de las células cerebrales, se realizó una técnica llamada inmunofluorescencia mediante la cual usando marcadores específicos de los distintos tipos celulares (neuronas, astrocitos y la micro-

cambios en su morfología y abundancia a través del uso de un microscopio especializado.

Por otra parte, las neuronas son células altamente especializadas que poseen tres regiones el cuerpo o soma, las dendritas y el axón (muy fino y largo) que se ve solo con técnicas especializadas. Desde el cuerpo o soma se extienden las dendritas que permiten la comunicación con otras neuronas. El análisis de Sholl en neuronas, es un método que permite evaluar las dendritas en i) la cantidad de ramas que presentan y ii) la distancia en la cual se producen la mayor cantidad de ramas partiendo desde el cuerpo o soma de la neurona.

Los resultados obtenidos fueron analizados a través de diferentes programas computacionales y estadísticos que permiten evaluar matemáticamente si las diferencias entre las condiciones tienen una alta probabilidad de ser verdaderos.

3. Resultados

a) El serotipo b de la bacteria Aa

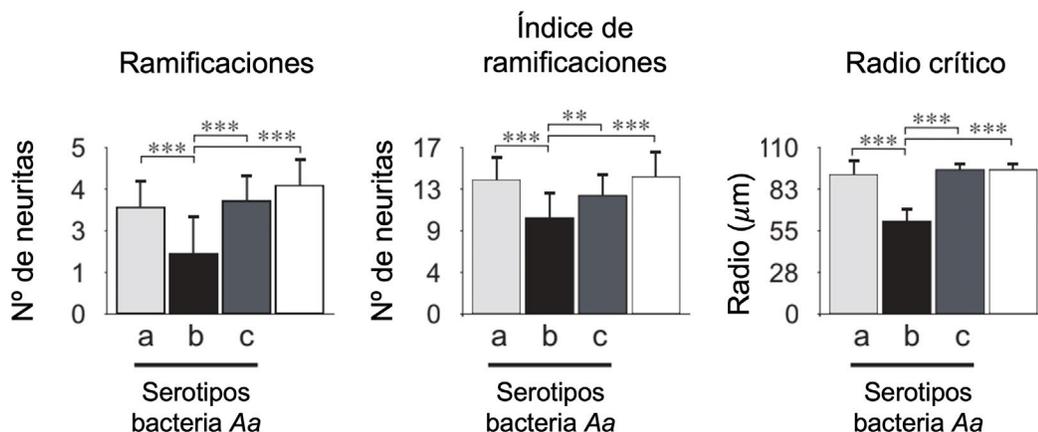


Figura 1.

Gráficos muestran la cantidad de veces que aumentaron las concentraciones de ARNm de moléculas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6), y anti-inflamatorias (IL-4, IL-10), para los cultivos expuestos a los serotipos a, b, c, y sin exposición (control). Lo anteriormente mencionado se realizó mediante análisis de RT-qPCR.

En el sistema inmune participan diversas proteínas que se activan en respuesta a la presencia de patógenos, algunas promueven la inflamación, mientras que otras por el contrario tratan de detenerla. A las primeras las llamamos pro-inflamatorias, ejemplos de estas moléculas son la interleuqui-

na 1 beta (IL-1 β) y la interleuquina 6 (IL-6). Por el contrario, las anti-inflamatorias como su nombre lo indica, ejercerán la acción opuesta. Dentro de este último grupo encontramos a la interleuquina 4 (IL-4) y la interleuquina 10 (IL-10).

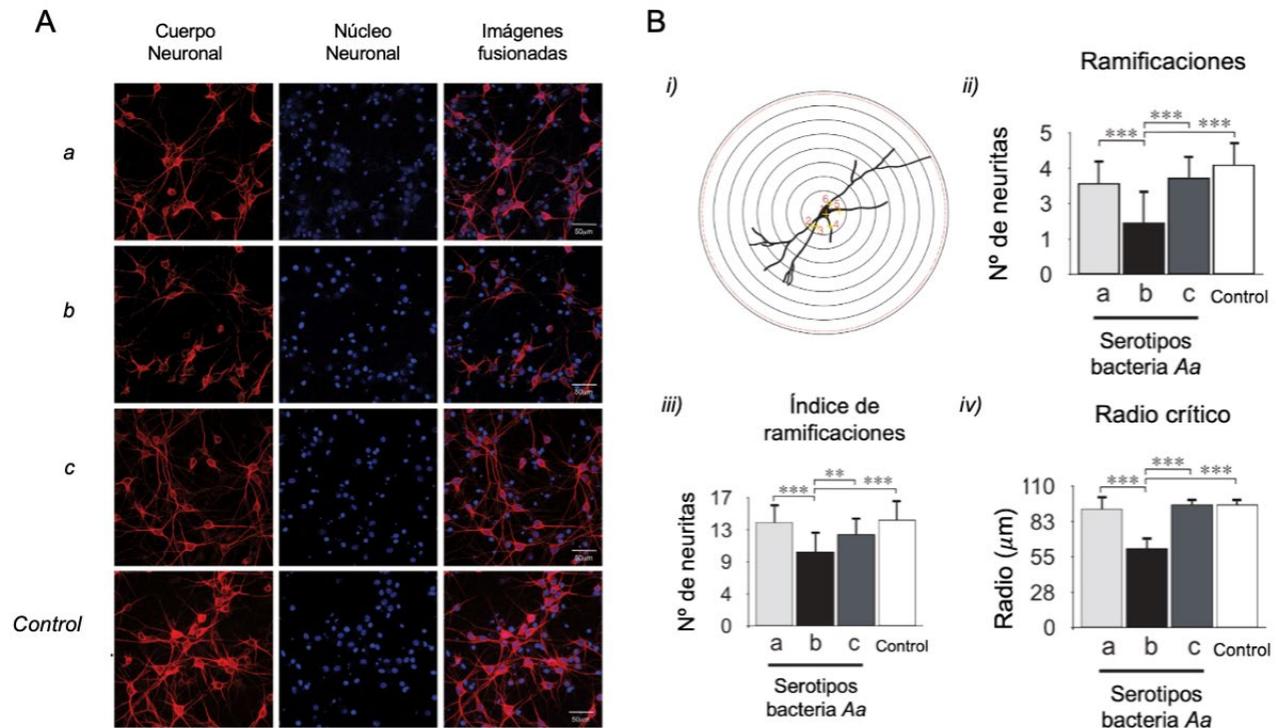


Figura 2.

(A) Morfología neuronal de cultivos mixtos de hipocampo, evaluada con tinción para MAP2 (cuerpos, dendritas y axones neuronales en rojo). Los cultivos fueron expuestos a LPS de los serotipos a, b, c de Aa, y los controles no fueron inducidos. Los núcleos celulares se observan en azul (DAPI), y se aprecia la colocalización de ambas tinciones en las imágenes fusionadas. (B) Cuantificación de arborización dendrítica mediante análisis Sholl de neuronas de cultivos mixtos de hipocampo tratados con 50 ng / mL de LPS purificado de los serotipos a, b o c de Aa y teñidas con MAP2 (i) Esquema de análisis Sholl, esta técnica describe las arborizaciones neuronales de las marcas iniciales. Cada neurona es marcada en los núcleos y las dendritas, y el programa crea círculos concéntricos de 10 a 100 micrones alrededor del núcleo y cuenta cuántas veces las dendritas intersecan cada círculo. El programa cuantifica (ii) el número de ramas o dendritas iniciales, (iii) el índice de ramificación de Schoenen (la relación entre la intersección máxima y el número principal de dendritas) y (iv) el radio crítico (representa a qué distancia está la dendrita más larga). Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar de cinco experimentos independientes. Luego de obtener los resultados, éstos se evalúan con análisis estadísticos para identificar si los resultados son significativos (*** $p < 0,001$).



Los cultivos celulares obtenidos a partir del hipocampo, región del cerebro que es afectado por la EA, que contienen microglías, astrocitos y neuronas fueron expuestos a la bacteria Aa serotipo a, b y c donde se observó que el serotipo b se asoció a un aumento en el ARN mensajero que se traduce en las moléculas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6, comparado con el control. Por otro lado, al evaluar las moléculas anti-inflamatorias con los mismos tratamientos, el serotipo b no se asoció a cambios significativos en sus niveles, mientras que el serotipo a se asoció a un aumento de los niveles de moléculas antiinflamatorias (Figura 1). Por lo tanto, el serotipo a aumenta los niveles de ARNm de moléculas anti-inflamatorias y el serotipo b aumenta los niveles de ARNm de moléculas pro-inflamatorias.

b) La administración de LPS correspondiente al serotipo b de la bacteria Aa induce cambios en la morfología de neuronas hipocampales.

Por los efectos que se observaron en los niveles de moléculas pro-inflamatorias se evaluó el efecto de los LPS provenientes de los distintos serotipos de la bacteria Aa en la morfología de las células hipocampales. En la Figura 2A se observaron cambios en la morfología de las neuronas tratadas con el serotipo b, donde se muestra una desaparición o disminución de las dendritas. Para cuantificar estos resultados se realizó el análisis de Sholl (Figura 2B), los resultados evidenciaron que el

serotipo b genera cambios morfológicos significativos en las células hipocampales produciendo encogimiento y una disminución tanto en la cantidad ramas dendríticas como en la ramificación (arborización) (Figura 2B).

4. Discusión

Recordemos que en la enfermedad de las encías (enfermedad periodontal) existe liberación de moléculas inflamatorias, lo cual además de contribuir al desarrollo de diabetes y enfermedades cardiovasculares, también podrían migrar, atravesar la barrera hematoencefálica y contribuir a una mayor inflamación cerebral (17).

Estudios previos demostraron que algunas bacterias tienen la capacidad de activar la respuesta inmune en células cerebrales, específicamente se vió que las células encargadas de defender al cerebro (microglia) se activaron generando inflamación sugiriendo su participación en el desarrollo de la EA (8, 18).

En este trabajo estudiamos si los serotipos de la bacteria Aa relacionados a la periodontitis agresiva podrían generar una respuesta inflamatoria en las células cerebrales, causando daños neuronales similares a los observados en la EA. Nuestros resultados aportan nueva evidencia indicando que el LPS del serotipo b de la bacteria Aa es capaz de provocar una mayor respuesta del sistema inmune de células del cerebro, la que se caracteriza por una mayor producción de moléculas infla-

matorias cómo IL-1 β e IL-6 en células del hipocampo.

Si bien los diferentes tipos de bacterias Aa estudiados en este trabajo pueden activar una respuesta inmune esta no será la misma para todas. Nuestros resultados sugieren que el serotipo b corresponde a la cepa más agresiva mostrando un cambio de la morfología de las neuronas (encogimiento, disminución de las ramas dendríticas y del índice de ramificación) que se acompañó de un aumento en la producción de O β As, (datos no mostrados) molécula clave en la EA.

Interesantemente, los resultados obtenidos con el serotipo a muestran que esta cepa promueve la síntesis de moléculas anti-inflamatorias. Mientras que el serotipo c no mostró diferencias significativas con el grupo control.

En conclusión, se demostró que el serotipo b de la bacteria Aa., presente en la enfermedad periodontal, causa una respuesta inmunológica específica en las células cerebrales, lo cual podría aumentar el riesgo de la EA.

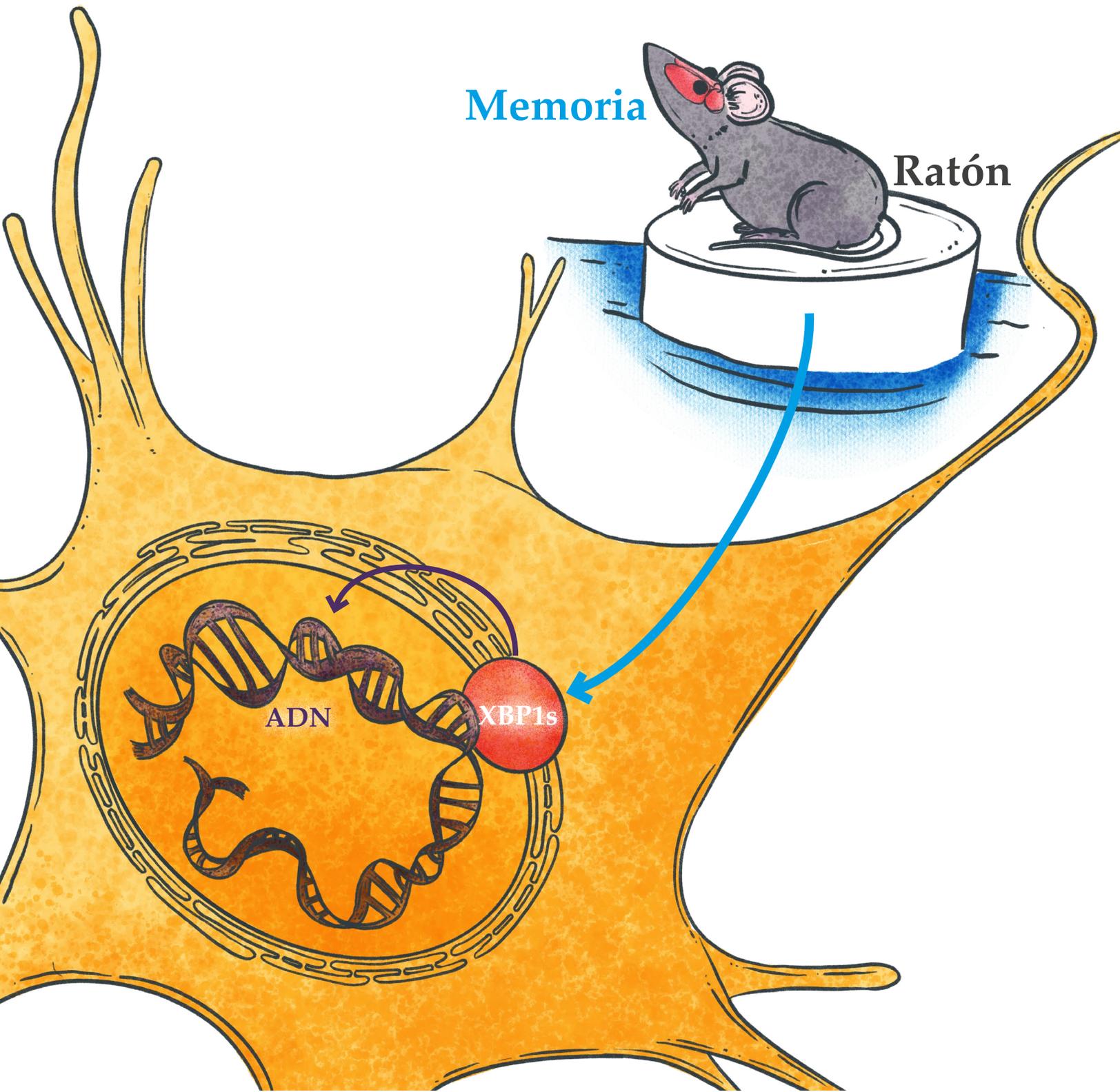
Este trabajo además de estudiar la EA, pretende promover el cuidado de la salud bucal, no sólo por las implicancias odontológicas sino también por las eventuales consecuencias en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Referencias

1. Z. Wu, H. Nakanishi, Connection between periodontitis and Alzheimer's disease: possible roles of microglia and leptomeningeal cells. *Journal of pharmacological sciences* 126, 8-13 (2014).
2. P. Sudhakara, A. Gupta, A. Bhardwaj, A. Wilson, Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dent J (Basel)* 6, (2018).
3. J. A. Brigido, V. R. da Silveira, R. O. Rego, N. A. Nogueira, Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 19, e184-191 (2014).
4. J. B. Kaplan et al., Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun* 69, 5375-5384 (2001).
5. M. B. Perry, L. M. MacLean, J. R. Brisson, M. E. Wilson, Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, c, d and e. *Eur J Biochem* 242, 682-688 (1996).
6. M. B. Perry, L. L. MacLean, R. Gmur, M. E. Wilson, Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infect Immun* 64, 1215-1219 (1996).
7. J. M. Noble et al., Periodontitis is



- associated with cognitive impairment among older adults: analysis of NHANES-III. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 1206-1211 (2009).
8. N. Ishida et al., Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ Aging Mech Dis* 3, 15 (2017).
 9. M. T. Heneka et al., Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14, 388-405 (2015).
 10. M. L. Block, J. S. Hong, Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology* 76, 77-98 (2005).
 11. Y. Fang et al., The blockage of the Nogo/NgR signal pathway in microglia alleviates the formation of A β plaques and tau phosphorylation in APP/PS1 transgenic mice. *J Neuroinflammation* 13, 56 (2016).
 12. A. C. Paula-Lima, J. Brito-Moreira, S. T. Ferreira, Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 126, 191-202 (2013).
 13. S. T. Ferreira, M. V. Lourenco, M. M. Oliveira, F. G. De Felice, Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* 9, 191 (2015).
 14. P. Sparks Stein et al., Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 8, 196-203 (2012).
 15. A. C. Paula-Lima, F. G. De Felice, J. Brito-Moreira, S. T. Ferreira, Activation of GABA(A) receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology* 49, 1140-1148 (2005).
 16. J. Diaz-Zuniga et al., Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 41, 242-251 (2014).
 17. A. Vargas-Caraveo et al., Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions. *Sci Rep* 7, 13113 (2017).
 18. S. Poole, S. K. Singhrao, L. Kesavalu, M. A. Curtis, S. Crean, Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 36, 665-677 (2013).





¿PODEMOS MEJORAR NUESTRA MEMORIA?

El rol de XBP1 en la formación de la memoria

Adaptado por
Gabriela Martínez Bravo

Afiliación
Instituto de Neurociencia Biomédica, Facultad de Medicina, Departamento de Neurología y Neurocirugía, Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago, Chile

Autores

Gabriela Martínez^{a,b,c}, René L. Vidal^{a,c,d}, Pablo Mardones^{a,b,c}, Felipe G. Serrano^e, Alvaro O. Ardiles^f, Craig Wirth^g, Pamela Valdés^{a,b,c}, Peter Thielen^g, Bernard L. Schneider^h, Bredford Kerrⁱ, Jose Luis Valdés^{a,j}, Adrian G. Palacios^f, Nibaldo C. Inestrosa^e, Laurie H. Glimcher^{k*} and Claudio Hetz^{a,b,c,g*}.

Afiliación

^aBiomedical Neuroscience Institute, Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile,

^bProgram of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biomedical Sciences, Center for Molecular Studies of the Cell, University of Chile, Santiago, Chile,

^cFONDAP Center for Geroscience, Brain Health and Metabolism, Santiago, Chile.

^dNeurounion Biomedical Foundation, Santiago, Chile.

^eCARE, Faculty of Biology, P. Catholic University of Chile, Santiago, Chile.

^fCentro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

^gDepartment of Immunology and Infectious diseases, Harvard School of Public Health, Boston MA, USA.

^hBrain Mind Institute, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, 1015 Lausanne, Switzerland.

ⁱCentro de Estudios Científicos, Valdivia, Chile.

^jPrograma Disciplinario de Fisiología y Biofísica, Center for the Neuroscience of Memory, Iniciativa Científica Milenio, I.C.B.M, Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile.

^kWeill Cornell Medical College, New York 10065, USA.

1. Introducción

¿Cómo recordamos? ¿Cómo almacenamos nuestras memorias? han sido las preguntas que se ha realizado la humanidad a lo largo de la historia. Desde finales del 1800, distintos científicos han aportado con sus investigaciones y experimentos para desentrañar estos misterios, sin embargo, aún quedan muchas preguntas sin responder. Hoy sabemos que la capacidad de recordar depende del funcionamiento de nuestro cerebro, y por lo tanto de nuestro sistema nervioso central (SNC), específicamente el hipocampo. Esto fue descubierto por accidente en los años cincuenta al tratar un paciente llamado H.M, quien a los 7 años tuvo un accidente en bicicleta lo que le generó un diagnóstico de epilepsia. Durante años sufrió fuertes ataques que le impidieron tener una vida normal. A la edad de 27 años fue sometido a una **lobotomía** con el fin de terminar con los fuertes ataques, extirpando una región del cerebro, en este caso el **hipocampo** y unas pequeñas zonas cercanas. Luego de esta cirugía disminuyeron considerablemente los ataques, sin embargo, notaron que no lograba aprender o recordar nada nuevo. El paciente H.M. es conocido en el área de la neurociencia, como un actor clave en el descubrimiento de diversos componentes de la memoria y el aprendizaje (1).

La memoria se define como el proceso por el cual la nueva información

es consolidada y almacenada en el cerebro. De acuerdo con su temporalidad puede ser clasificada como memoria a corto plazo y memoria a largo plazo (2-4). La memoria de corto plazo consiste en la retención de información por un periodo corto de tiempo, sin la creación de nuevas conexiones entre neuronas y no requiere la expresión de nuevas **proteínas**. La memoria de largo plazo ocurre cuando luego del aprendizaje se generan nuevas conexiones neuronales, permitiendo que la información pueda ser recordada por semanas, meses e incluso años y es dependiente de la síntesis de nuevas proteínas que promoverán la consolidación de la memoria (5-10).

En este trabajo nos enfocaremos en XBP1, una proteína que actúa como un **factor de transcripción** (11, 12), que fue descrita en la década de los noventa en las células del sistema inmune, específicamente en las células encargadas de sintetizar o producir anticuerpos. Estudios posteriores demostraron que también era una proteína importante para la función del hígado, del páncreas y de las glándulas salivales (13-16). Una característica en común que poseen las células que componen estos órganos es que son altamente secretoras, es decir que producen muchas proteínas que son liberadas al medio que las rodea para que puedan cumplir con sus funciones.

Cuando iniciamos esta investigación

Glosario

Lobotomía: es un tipo de cirugía que consiste en la extirpación quirúrgica de una o más regiones del cerebro realizada en los años cincuenta y sesenta, que luego fueron prohibidas y reemplazadas, principalmente por tratamientos farmacológicos.

Hipocampo: El hipocampo es un área ubicada en el interior del lóbulo temporal del cerebro, que tiene estrecha relación con diversas regiones de la corteza cerebral.



sabíamos que XBP1 estaba presente en el cerebro, pero no sabíamos cuál era su función ¿por qué estaba ahí? ¿por qué durante los años de evolución se había mantenido su expresión en ese tejido? ¿Qué rol cumplía XBP1 en el cerebro? Sabíamos que, si la presencia de XBP1 disminuye en el SNC, las personas tienen riesgo de desarrollar enfermedades como el trastorno bipolar o la enfermedad de Alzheimer (17, 18). Por otra parte, sabemos que durante la formación de la memoria en el SNC ocurren cambios en las células para cumplir con su función, específicamente las neuronas se caracterizan por conducir el impulso nervioso y comunicarse a través de las **sinapsis**, a través de la secreción de diversas proteínas (1).

Considerando todos estos antecedentes y la función de XBP1 en otros tejidos con alta capacidad secretora, en este trabajo se propuso evaluar por primera vez el posible rol de XBP1 en el SNC, específicamente en las células neuronales.

2. Métodos

Para esta investigación se realizaron experimentos con animales, estos deben ser previamente aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, de esta forma confirmar que los experimentos o tratamientos cumplen con las normas éticas definidas internacionalmente.

Los experimentos fueron realizados

en ratones macho de entre 3 y 6 meses de edad que fueron mantenidos bajo ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con acceso libre a comida y agua.

¿Cómo evaluamos si un ratón puede aprender una tarea?

Para evaluar si es que los animales pueden recordar o aprender ciertas tareas, los científicos realizan diferentes experimentos que permiten identificar estos procesos. A continuación, detallamos los protocolos a los cuales sometimos a nuestros ratones.

Condicionamiento contextual al miedo (CCM): Esta tarea o paradigma conductual comprendió tres fases: habituación, entrenamiento y finalmente test o evaluación. La habituación se realiza el día 1 donde cada animal es colocado dentro de la cámara durante 5 min para que lo explore y se familiarice dentro del espacio, luego son devueltos a su caja de mantención.

El entrenamiento fue realizado el día 2, y consiste en ubicar el animal dentro de la misma cámara que contiene en la base una rejilla que produce un estímulo eléctrico. Dentro de la caja al animal se le permitió habituarse por 2 minutos y luego, fue expuesto a un sonido de 80 dB durante 30 segundos. Luego, de un intervalo de 2 segundos a los animales se les administró un choque eléctrico de 0.5 mA, que no les resulta dañino, el cual es

Glosario

Proteína: Las proteínas son macromoléculas compuestas de una o varias cadenas de aminoácidos, entre ellas podemos encontrar a las enzimas, los factores de transcripción, las hormonas, los anticuerpos, etc.

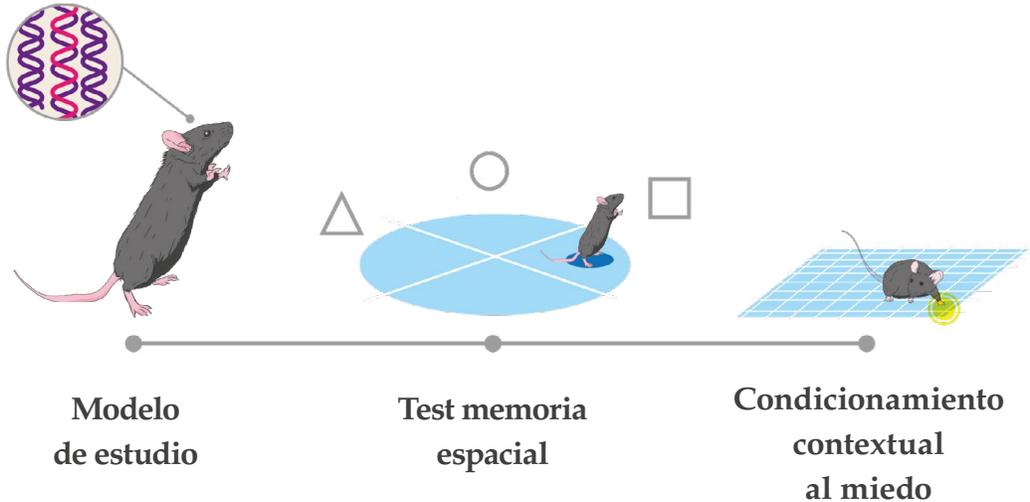
Factor de transcripción: Un factor de transcripción es una proteína que se une a una secuencia específica de ADN en el núcleo de la célula, controlando el proceso de transcripción de genes permitiendo la formación de ARN mensajero.

Sinapsis: Espacio entre el extremo de una neurona y otra célula, que se definen como presináptica y postsináptica respectivamente. El impulso nervioso ocurre en una sola dirección y se transmite a la célula postsináptica mediante sustancias químicas llamadas neurotransmisores.

Diseño experimental

Animales genéticamente modificados, ya sea que sobreexpresan o son deficientes para XBP1, fueron evaluados en tareas conductuales para evaluar su aprendizaje y memoria. Primero, se realizó el test de flexibilidad de memoria espacial. Luego estudió el condicionamiento contextual al miedo (CCM).

Ratón genéticamente modificado



designado como el estímulo no condicionado (ENC), repitiendo este proceso 5 veces. El entrenamiento le permite al animal asociar un contexto, el que consiste en la cámara junto al sonido y el estímulo eléctrico, que corresponde al estímulo negativo.

Al tercer día se realiza el test o evaluación del aprendizaje del animal a la tarea. Es decir, el animal al entrar a la cámara debería recordar que en ese lugar (contexto) el día anterior recibió el estímulo eléctrico, como respuesta al miedo los roedores permanecen inmóviles. Por lo tanto, el animal fue nuevamente introducido en la cámara original durante 5 minutos (300 segundos) y fue evaluado cuánto tiempo permaneció inmóvil, esto permite determinar la asociación del ENC con el contexto. La medición de la inmo-

vilidad se realiza de forma automática a través de un software apropiado (Med Associates; Burlington VT). En resumen, la capacidad de memoria a largo plazo fue evaluada 24 horas después del entrenamiento, mediante la comparación entre los distintos grupos experimentales del porcentaje de tiempo inmóvil del animal dentro de la cámara (contexto) al cual fue expuesto el día anterior.

Test de flexibilidad de la memoria: En este caso se utilizó una modificación del laberinto de agua de Morris, donde ratones macho de 3 a 6 meses, nadan en una piscina que presenta en los bordes claves visuales que les permiten encontrar una plataforma donde se deben subir para escapar. Las claves visuales les permiten armar un mapa mental, similar a lo



que nosotros utilizamos para encontrar una dirección. Específicamente, para esta tarea la plataforma cambia de lugar cada día, así el animal debe identificar la nueva posición y no insistir en la posición del día anterior, es como si el ratón se cambiara todos los días de casa, debiendo recordar la nueva dirección y no ir a la casa antigua. El éxito de la tarea se evalúa contando el número de intentos que necesita para alcanzar la plataforma antes de 60 segundos, durante tres veces seguidas, que se define como criterio de aprendizaje (19).

¿Cómo evaluamos el rol de XBP1 en el SNC?

Para evaluar el rol de una proteína en un tejido específico, generalmente lo que se realiza es una modificación genética que permita disminuir o aumentar su expresión en el tejido y de esta forma descubrir su impacto en las tareas conductuales previamente descritas.

Por lo tanto, en este trabajo utilizamos tres tipos de ratones:

- i) El ratón control (XBP1^{control}), se define como el animal que presenta niveles fisiológicos de expresión de XBP1, contra el cual se comparan los animales experimentales.
- ii) El ratón deficiente para XBP1 (XBP1^{deficiente}), corresponde a animales genéticamente modificados que no poseen la expresión de esta proteína específicamente en el SNC.

- iii) Los ratones transgénicos para XBP1 (XBP1^{sobreexpresado}), corresponden a un animal genéticamente modificado que posee un aumento en los niveles de expresión de esta proteína en el SNC. Este animal fue generado en el Centro de Estudios Científicos (CECS), Valdivia – Chile.

¿De qué manera podemos aumentar la expresión de XBP1 en el cerebro de animales adultos?

En los animales genéticamente modificados el cambio de la expresión, ya sea la deficiencia (XBP1^{deficiente}) o la sobreexpresión de XBP1 (XBP1^{sobreexpresado}) en el cerebro ocurre desde su gestación, es decir está presente desde el desarrollo embrionario. Por lo cual es importante determinar si los efectos observados en estos animales se deben realmente a la presencia o ausencia de XBP1, y no es debido a que otras proteínas o procesos compensen esta modificación. Por esta razón, decidimos utilizar una estrategia diferente que nos permitiera aumentar la expresión de XBP1 en el cerebro de animales adultos. Para esto generamos **virus adenoasociados** (AAV, del inglés adeno-associated virus) que contienen la secuencia del gen de XBP1 en su interior. Luego de generar los virus realizamos inyecciones en el hipocampo de ratones controles adultos con AAV(20). Un grupo de animales fue inyectado con AAV/XBP1 y otro grupo de animales control con AAV/Control.

Glosario

Virus Adenoasociados (AAV): constituyen un grupo de virus satélite de la familia Parvoviridae. Los AAV son virus que contienen ADN lineal de una sola hebra y pueden infectar células que no se realizan división celular, como por ejemplo las neuronas.

Durante tres días consecutivos posterior a la cirugía, se administraron medicamentos para evitar algún tipo de infección o inflamación. El tiempo de recuperación de ratones fue de 14 días antes de iniciar las sesiones de pruebas conductuales. Los AAV se han utilizado en el área de la terapia génica ya que poseen ciertas características que los hace idóneos para este propósito: poseen baja *inmunogenicidad*, es decir el organismo no los rechaza, son seguros y estables. Se ha demostrado que al realizar solamente una inyección con AAV, se puede observar su expresión 10 años después.

Análisis estadístico

Para comprobar si nuestros resultados no son por azar se realizan análisis estadísticos. En este trabajo los resultados presentados corresponden al promedio \pm error estándar del número de animales indicados. La significancia estadística de los datos fue calculada mediante el análisis de la prueba no paramétrico Mann Whitney o a través del análisis de ANOVA de dos vías cuando más de dos grupos experimentales o variables fueron comparados, seguido por el post-test de Bonferroni. Se consideró como límite de significancia estadística cuando los valores de p fueron menores a 0.05 y de esta forma podemos indicar que nuestros resultados no se deben al azar. La significancia estadística fue expresada de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

3. Resultados

a) La deficiencia de XBP1 en el SNC disminuye el aprendizaje y la memoria en roedores.

Inicialmente, para evaluar el impacto de la deficiencia de XBP1 en el SNC los animales fueron sometidos a diversos análisis o test conductuales, para esto los animales fueron enviados al centro del estudio de conducta de roedores en CWRU (Case Western Reserve University, Estados Unidos), donde se midieron distintos componentes asociados a la función de nuestro SNC. Se evaluó el rendimiento motor, los componentes de memoria y aprendizaje dependientes del hipocampo, las respuestas reflejas y de ansiedad. Al comparar los animales deficientes para XBP1 en el SNC con el grupo de animales control no observamos diferencias significativas en los resultados obtenidos en las pruebas que evalúan el rendimiento motor, las respuestas reflejas y de ansiedad, indicando que nuestro modelo no presenta alteraciones en estas conductas.

Respecto a las tareas relacionadas a procesos de memoria y aprendizaje asociadas al hipocampo podemos mencionar el condicionamiento contextual al miedo o CCM(21). Como se observa en la **Figura 1A**, 24 horas después del entrenamiento evaluamos la formación de la memoria a largo plazo, donde determinamos que en los XBP1^{Deficiente} el porcentaje promedio

Glosario

Inmunogenicidad:

capacidad de distintas sustancias o moléculas para generar la activación de una respuesta inmune.



de inmovilidad equivale a 10%, valor significativamente menor comparado con el porcentaje promedio de 40% observado en los animales controles silvestres (XBP1^{Control}).

Para confirmar estos resultados que nos sugieren que la deficiencia de XBP1 afecta al rendimiento de los animales en tareas de aprendizaje y memoria asociado al hipocampo evaluamos una nueva prueba conductual, que ha sido descrito como una tarea dependiente de esta estructura, denominada prueba de flexibilidad de memoria espacial, que consiste en una modificación del test conductual del laberinto de agua de morris (del

inglés, Morris water maze)(19, 22). En cada lanzamiento se mide el tiempo que demora en encontrar la plataforma. Antes de realizar la prueba, confirmamos que los animales de ambos genotipos no presentaban problemas para nadar, y que la capacidad motora es similar entre ambos grupos. Al evaluar el paradigma conductual determinamos que el ratón XBP1^{Deficiente} desde el primer día requiere mayor número de intentos para alcanzar el criterio de aprendizaje respecto al ratón control, conducta que observamos a lo largo del desarrollo de la prueba conductual (Figura 1B). Estos resultados nos sugieren que el ratón XBP1^{Deficiente} presenta un déficit en el

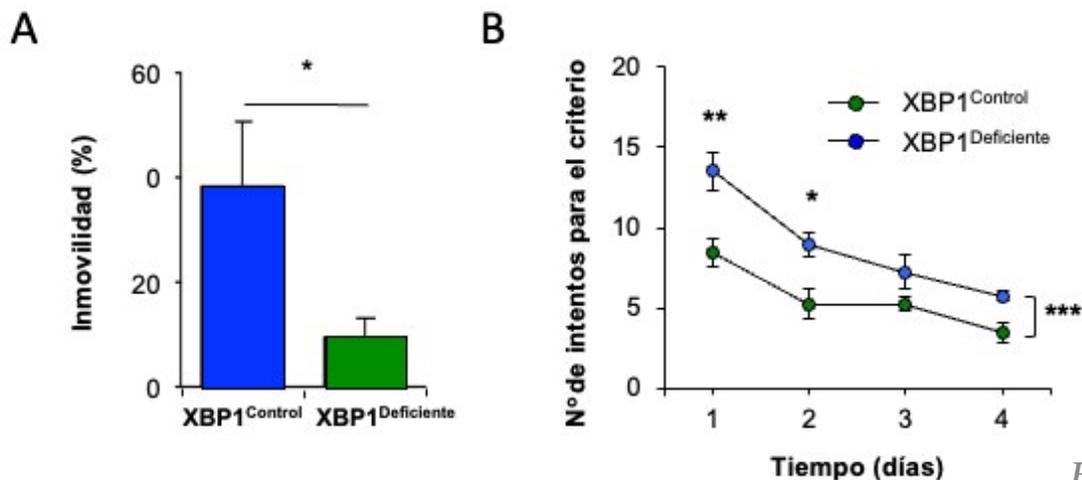


Figura 1.

Deficiencia de XBP1 en el SNC disminuye el aprendizaje y la memoria. (A) Un grupo experimental de 12 machos XBP1^{Control} y 12 machos XBP1^{Deficiente} fueron sometidos al test de condicionamiento contextual al miedo. En la figura se muestra la cuantificación del porcentaje de eventos de inmovilidad durante el test luego de 24 horas. Los valores mostrados corresponden a los promedios y al error estándar. Las diferencias significativas entre las mediciones fueron evaluadas por el test no paramétrico de mann-whitney (* $p < 0.05$). (B) Un grupo experimental de 4 animales machos XBP1^{Control} y cuatro animales machos XBP1^{Deficiente} fue sometido al test de flexibilidad de memoria espacial. El gráfico muestra el promedio y error estándar del número de intentos necesarios para alcanzar el criterio en el paradigma en 4 días consecutivos de evaluación. Las diferencias significativas entre las mediciones fueron evaluadas mediante el test de Anova de dos vías y el post-test de Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

proceso de memoria y aprendizaje dependiente del hipocampo.

b) La sobreexpresión de XBP1 en el SNC mejora los procesos de aprendizaje y la memoria en roedores.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro ratón XBP1^{Deficiente} donde observamos que la deficiencia de XBP1 impacta de forma negativa el rendimiento de los animales en tareas de aprendizaje y memoria, sugiriendo que aprenden menos. A continuación, nos preguntamos si ¿Podría la sobreexpresión de XBP1 en el hipocampo mejorar el rendimiento de los animales en tareas asociadas al aprendizaje?. Para ello, evaluamos a los ratones XBP1^{sobreexpresado}, que son animales que presentan un aumento

en la expresión de XBP1 en el SNC, mediante el test de flexibilidad de memoria espacial descrito anteriormente. Observamos que los animales que sobreexpresan XBP1 en el SNC, aumentan significativamente su rendimiento en la tarea. Como se observa en la **Figura 2A** los animales XBP1^{sobreexpresado} necesitan un menor número de intentos para lograr el criterio de aprendizaje comparados con los animales XBP1^{control}, lo que indica que estos animales presentan un mejor rendimiento y sugiere un aumento de sus capacidades cognitivas.

Debido a que los ratones XBP1^{sobreexpresado} y los ratones XBP1^{Deficiente} que estudiamos tienen disminuida o aumentada la expresión de XBP1 en todo el SNC, y desde el desarrollo embriónico

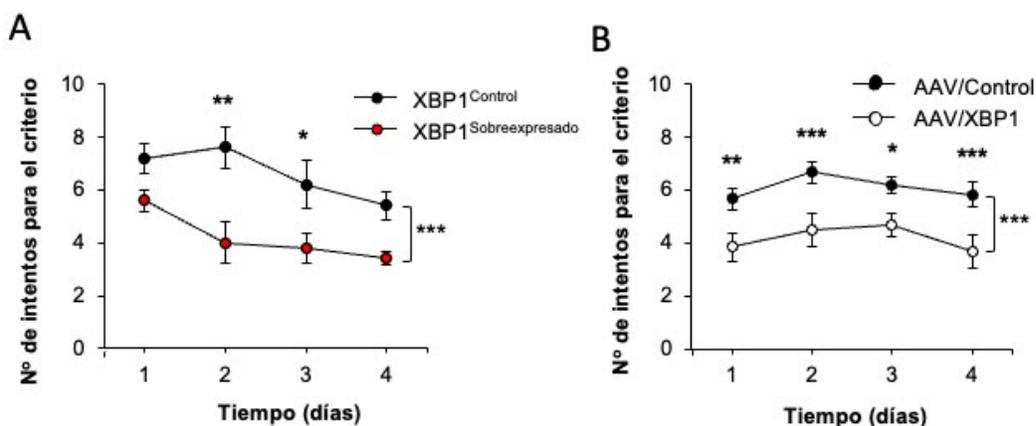


Figura 2.

Sobreexpresión de XBP1 en el SNC aumenta el proceso el aprendizaje y la memoria. (A) Un grupo experimental de cinco animales XBP1^{Control} y cinco animales XBP1^{sobreexpresado} fueron sometidos a la prueba de flexibilidad de memoria espacial. El gráfico muestra el promedio del error estándar del número de intentos necesarios para alcanzar el criterio en el paradigma en 4 días consecutivos de evaluación. (B) Se realizaron inyecciones bilaterales en el hipocampo con AAV/XBP1 y AAV/Control. Las coordenadas utilizadas fueron: AP: -1.94 mm, ML: 2.1 mm y DV: -1.7 mm. Un grupo experimental de 6 animales AAV/Control y 6 animales AAV/XBP1 fue sometido a la prueba de flexibilidad de la memoria espacial el gráfico muestra el promedio y el error estándar del número de intentos necesarios para alcanzar el criterio en el paradigma en 4 días consecutivos de evaluación. Las diferencias significativas entre las mediciones fueron evaluadas mediante el test de Anova de dos vías y el post-test de Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



nario, nos preguntamos si ¿Podría la sobreexpresión de XBP1s localizada en el hipocampo de animales adultos mejorar el rendimiento en tareas asociadas al aprendizaje?

Para esto realizamos terapia génica, donde se transfieren genes a una célula mediante un **vector**. En este caso el vector utilizado fue el virus adeno-asociado (AAV, del inglés adeno-associated virus) que contienen el gen XBP1 en su interior. Los AAV/XBP1s fueron inyectados mediante estereotaxia en el hipocampo de ratones adultos de 3 meses de edad, que si lo relacionamos con la edad humana corresponde a un adulto de 20 a 30 años de edad. Como grupo control del tratamiento, animales de 3 meses de edad fueron inyectados con el virus sin XBP1 (AAV/Control). Luego de 14 días posteriores a la inyección los animales fueron evaluados en el test de flexibilidad de memoria espacial. Los ratones en los que XBP1 fue expresado localmente en el hipocampo adulto necesitaron menor número de intentos para alcanzar el criterio de aprendizaje en la tarea (**Figura 2B**). Si comparamos las diferencias obtenidas en los animales XBP1^{sobreexpresado} (**Figura 2A**) con los animales inyectados con AAV/XBP1, observamos que son similares. Es decir, que la sobreexpresión de XBP1 a través de la terapia génica genera resultados similares a los animales transgénicos para XBP1, sugiriendo que la sobreexpresión de esta proteína

induce una mejora en la memoria y el aprendizaje.

4. Discusión

Las áreas de la biología, la medicina y la neurociencia se han enfocado en identificar y entender los mecanismos relacionados con el proceso de aprendizaje y memoria. A lo largo de estos años se han identificado proteínas claves en este proceso, sin embargo, aún queda mucho por descubrir.

En este trabajo hemos definido por primera vez un rol fisiológico del factor de transcripción XBP1 en el cerebro. A través de tareas conductuales complementarias donde evaluamos la ganancia y pérdida de función de XBP1, mediante la utilización de modelos experimentales de roedores genéticamente modificados, logramos modular la formación de la memoria y aprendizaje (23). Se demostró que XBP1 es un nuevo componente que regula el proceso de la memoria a largo plazo dependiente del hipocampo (19, 21, 24).

A partir de los resultados observados en los animales transgénicos para XBP1 y en los animales inyectados con el AAV/XBP1 en estado adulto, éstos podrían ser aplicados en el futuro como una posible terapia para aumentar los niveles de XBP1 en el cerebro para tratar problemas asociados a la memoria, como ustedes sabrán distintas películas de Hollywood han abordado este tema y han mostrado en la ficción la posibilidad de mejorar

Glosario

Vector: *Un vector es un agente u organismo que en su interior lleva un gen extraño o modificado y que se utiliza para transferir material genético a otra célula. Un vector viral utiliza un virus modificado para realizar esta tarea.*

nuestras capacidades cognitivas. Como mencionamos previamente, sabemos que la disminución de la expresión de XBP1 se asocia con el desarrollo de trastornos psiquiátricos y de la enfermedad de Alzheimer. La generación de la terapia génica basada en los AAV/XBP1, podría tener implicaciones importantes para el tratamiento de estas patologías.

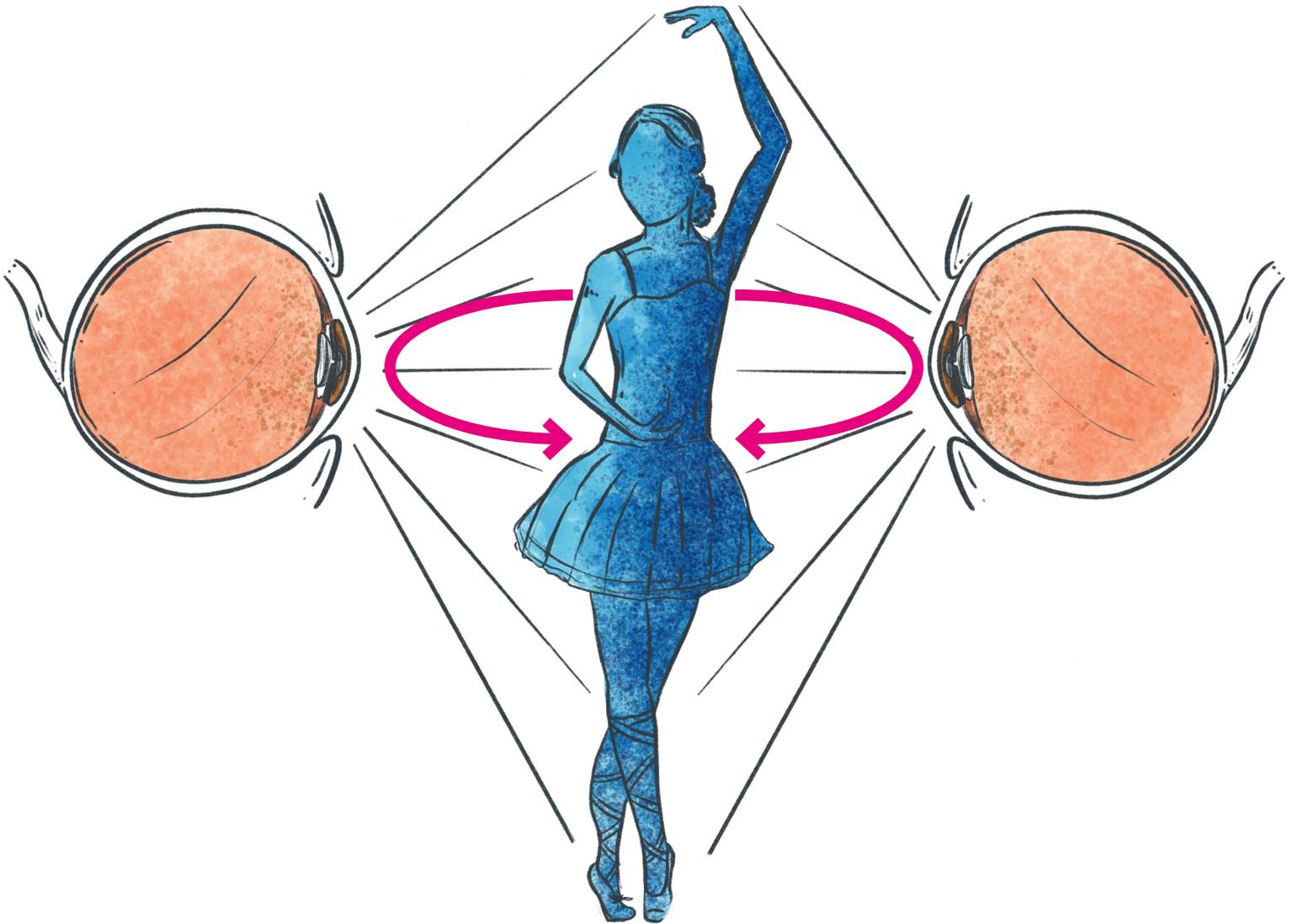
En otros experimentos desarrollados en este trabajo (datos no mostrados) identificamos que XBP1 al ser un factor de transcripción regula la expresión de la proteína llamada BDNF (del inglés brain derived neurotrophic factor), una proteína clave en el fortalecimiento de la memoria y el aprendizaje. Sin embargo, aún quedan muchas preguntas por responder, ¿sólo regula a BDNF?, ¿puede interactuar con otras proteínas para cumplir su rol? y ¿muchas otras!, lo apasionante de realizar investigación es que cada descubrimiento y pregunta que respondemos abre nuevas perspectivas y áreas de investigación.

Referencias

1. E. R. Kandel, Principles of neural science. (McGraw-Hill Medical, New York, ed. 5th, 2013), pp. 1, 1709 p.
2. C. M. Alberini, Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological reviews* 89, 121-145 (2009).
3. E. R. Kandel, The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038 (2001).
4. L. R. Squire, Memory and brain. (Oxford University Press, New York ; Oxford, 1987), pp. xii, 315 p.
5. C. M. Alberini, The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiology of learning and memory* 89, 234-246 (2008).
6. H. P. Davis, L. R. Squire, Protein synthesis and memory: a review. *Psychological bulletin* 96, 518-559 (1984).
7. P. Goelet, V. F. Castellucci, S. Schacter, E. R. Kandel, The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322, 419-422 (1986).
8. E. Klann, T. E. Dever, Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nature reviews. Neuroscience* 5, 931-942 (2004).
9. J. L. McGaugh, Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153, 1351-1358 (1966).
10. L. R. Squire, B. Knowlton, G. Musen, The structure and organization of memory. *Annual review of psychology* 44, 453-495 (1993).
11. H. C. Liou et al., A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter. *Science* 247, 1581-1584 (1990).



12. M. Calfon et al., IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-96 (2002).
13. A. M. Reimold et al., An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev* 14, 152-157 (2000).
14. A.-H. Lee, G. C. Chu, N. N. Iwakoshi, L. H. Glimcher, XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *The EMBO journal* 24, 4368-4380 (2005).
15. N. N. Iwakoshi et al., Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* 4, 321-329 (2003).
16. A. M. Reimold et al., Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300-307 (2001).
17. C. Kakiuchi et al., Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet* 35, 171-175 (2003).
18. S. Y. Liu et al., Polymorphism -116C/G of Human X-box-Binding Protein 1 Promoter is Associated with Risk of Alzheimer's Disease. *CNS Neurosci Ther*, (2013).
19. G. Chen et al., A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 975-979 (2000).
20. G. Paxinos, K. B. J. Franklin, K. B. J. Franklin, *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. (Academic Press, San Diego, ed. 2nd, 2001).
21. J. J. Kim, R. A. Rison, M. S. Fanselow, Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behavioral neuroscience* 107, 1093-1098 (1993).
22. M. S. Arrazola et al., Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Journal of cellular physiology* 221, 658-667 (2009).
23. G. Martinez et al., Regulation of Memory Formation by the Transcription Factor XBP1. *Cell Rep* 14, 1382-1394 (2016).
24. R. E. Clark, N. J. Broadbent, L. R. Squire, Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus* 15, 260-272 (2005).





¿ES REAL NUESTRA REALIDAD?: CUANDO EL CEREBRO MIRA ANTES QUE LOS OJOS

Autores

*Enrique Lorca-Ponce^{a,b}, Samuel Madariaga^{a,b}, Daniel Zenteno^{a,b}, Christ Devia^{a,b},
Pedro Maldonado^{a,b}*

Afiliación

^aFacultad de Medicina, Instituto de Neurociencia Biomédica, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^bLaboratorio de Neurosistemas, Departamento de Neurociencia, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

1. Introducción

Imagínate que estás esperando a que empiece un espectáculo de danza. Llevas meses aguardando por este momento. Una luz ilumina el fondo del escenario y se aprecia la sombra de una bailarina. Acto seguido, la bailarina comienza a dar giros. Te percatas que está girando hacia la derecha. Ella no se detiene. Ahora, de la nada, la bailarina está girando hacia la izquierda. Esperas un segundo... No sabes lo que acabas de ver. ¿Es real lo que pasó? La bailarina sigue dando vueltas y nuevamente cambia el giro, sin detenerse. ¿Brujería? ¿Magia? ¿Estaré demente? Nada de eso. Es solo un cambio de percepción o ¿es el cerebro que me está jugando una mala pasada?

Quien haya dicho muchas veces en voz alta la palabra ‘jamón’ sabe que después de repetirlas varias veces uno deja de escuchar ‘jamón’ y comienza a escuchar ‘monja’ (jamón jamón jamón jamonjamonjamonja monja). Es decir, dependiendo de cómo nuestro cerebro une las sílabas ‘ja’ y ‘mon’ nosotros diremos que escuchamos una u otra palabra. Podremos partir con la percepción de ‘jamón’ luego escuchar ‘monja’, para luego volver a percibir ‘jamón’. Y mientras sigamos escuchando las mismas sílabas repetidas, nuestra percepción podrá transitar muchas veces entre una percepción (‘jamón’) y la otra (‘monja’), e ir de ida y vuelta varias veces.

A los fenómenos anteriores se les llama percepción biestable, “bi” porque transita entre dos percepciones que por sí solas son estables. Existen muchos ejemplos de *percepción biestable*, en especial en *estímulos visuales*. Seguro has visto una imagen donde miras algo que parece una cosa y luego cambia a otra: ¿El vestido es azul con negro o blanco con dorado? ¿Veo una joven o una anciana? ¿La bailarina gira a la derecha o a la izquierda? La pregunta que nos hacemos las neurocientíficas y los neurocientíficos es: ¿Cómo es posible que percibamos dos cosas distintas si el estímulo físico (la imagen o sonido) es siempre el mismo?

Lo que sabemos hasta ahora es que el cerebro es una compleja red de células, llamadas neuronas, que integran la información del entorno y hacen que esta información sea coherente con nuestra historia de percepciones previas. Así, las redes neuronales reciben lo observado por los ojos y usualmente esta red compleja genera una interpretación para eso que observamos. Las investigaciones indican que este proceso ocurre mediante un método de “el ganador se lleva todo”. Es decir, una vez que se establece en nuestro cerebro una percepción para lo que estamos viendo, todas las otras posibles interpretaciones desaparecen. El estado que gana es el que percibiremos. Sin embargo, ciertos estímulos llevan la red a un límite, y el cerebro logra hacer una

Glosario

Percepción:
mecanismo que realizan los organismos que consiste en recibir, interpretar y comprender los estímulos que provienen desde el exterior, codificándolas a partir de los sentidos.



única interpretación, pero no logra mantenerla por mucho tiempo. Las otras interpretaciones no desaparecen del todo y comienzan a competir por establecerse. Cuando se establece una de ellas nosotros experimentamos un cambio en nuestra percepción, así es como pasamos de escuchar 'jamón' a escuchar 'monja' aunque las sílabas que se repiten son las mismas. En particular, para los estímulos visuales, se ha propuesto que el incesante movimiento de nuestros ojos sobre la imagen podría propiciar que ocurran estos cambios de una percepción a otra.

La percepción visual es un proceso dinámico, que depende de la configuración de nuestras redes neuronales y del órgano sensorial, en este caso los ojos. Al explorar el mundo, nuestros ojos siempre están moviéndose de un lugar a otro. Aún cuando tengamos nuestra mirada fija nuestros ojos realizarán pequeños movimientos que en un laboratorio podemos medir. Los movimientos oculares son necesarios para extraer características de nuestro alrededor y para evitar que los receptores dentro del ojo se agoten de tanto ver la misma cosa. Entonces, ¿puedo transitar entre distintas percepciones sólo con mover los ojos? Algunos estudios indican que mover los ojos juega un rol en el cambio perceptual (1-3). Además, se ha demostrado que al desplazar la mirada desde un punto a otro, se puede regular la percepción visual volviéndola más precisa y efectiva en la discriminación de imágenes (4).

Con todo esto en mente, si queremos estudiar cómo ocurre la percepción visual, parece necesario considerar a los movimientos oculares. En especial, la percepción biestable, donde el movimiento de nuestros ojos podría ayudar a que se produzca el cambio desde una percepción a otra. De esta manera, el movimiento de nuestros ojos sobre la imagen sería fundamental para la modulación del proceso cognitivo de percepción, permitiendo la discriminación de estímulos.

Actualmente, se conoce una pequeña parte de los mecanismos neuronales que sustentan las transiciones perceptuales. Sin embargo, se han descrito algunas señales características que se pueden medir con la electroencefalografía (EEG). Estas señales eléctricas se generan en el cerebro, específicamente en las neuronas y se puede medir con el EEG, permitiendo asociar la actividad neuronal con los cambios en la percepción cuando se observan figuras biestables (5). Al revisar las señales emitidas por el EEG podemos observar ondas eléctricas que tienen ritmos o frecuencias de la actividad neuronal y que estudiamos para poder asociarlos al cambio en la percepción. Se ha determinado que el cambio perceptual se asocia al ritmo alfa (α), que tiene una frecuencia eléctrica que va entre los 8 a 16 Hz (es decir, la señal eléctrica oscila entre 8 y 16 veces por segundo). Además, se ha observado que el ritmo α disminuye su intensidad (am-

Glosario

Estímulo: se define como una señal interna o externa que puede desencadenar reacción en una célula o un organismo.

Glosario

Reversión: corresponde a regresar una cosa al estado que tenía previamente o dejar sin efecto un cambio específico.

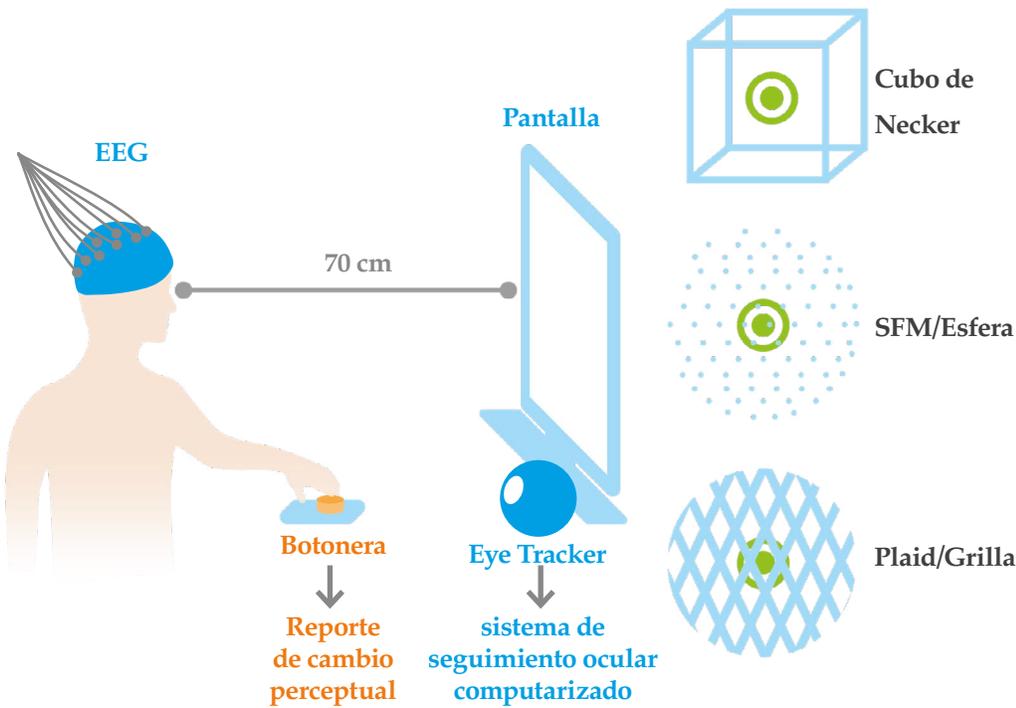
plitud de la onda eléctrica o caída de poder) cuando ocurre una *reversión* de la percepción en un estímulo biestable (6), es decir cuando pasamos de escuchar ‘jamón’ a escuchar ‘monja’. En un estudio con personas voluntarias sanas, se les pidió que avisaran cuando experimentaban un cambio de percepción mientras miraban un estímulo biestable. Simultáneamente, se les registraba las señales eléctricas cerebrales (EEG). Para avisar que habían experimentado un cambio las personas debían apretar rápidamente un botón. En este experimento se pudo observar que la disminución en la amplitud del ritmo α ocurría antes que los sujetos apretaran el botón. Específicamente entre 1 a 0,2 segundos antes de que los voluntarios avisaran que cambió su percepción. Estos resultados muestran que existe una caída de intensidad del ritmo α previo al momento en que reportamos que ocurrió la reversión o cambio perceptual (7).

Debemos considerar que las mediciones en el que ocurre un momento del cambio perceptual no son muy precisas, ya que las personas deben apretar un botón para indicar cuando experimentaron un cambio en su percepción. El tiempo que tarda una persona en darse cuenta del cambio y apretar el botón es muy variable. Por eso se vuelve necesario identificar qué evento podría anteceder, o incluso iniciar, el cambio perceptual. Un candidato son los movimientos

oculares, porque podrían ocurrir antes del reporte manual que hacen las personas al apretar el botón, además podrían alinearse de forma temporalmente cercana a los marcadores del EEG o incluso formar parte de los mecanismos cerebrales de reversión de la percepción.

Los movimientos oculares se clasifican principalmente en sacadas y fijaciones. Las sacadas son movimientos rápidos que van desde un lugar particular del espacio hasta un segundo lugar donde se detiene la mirada (8). Las fijaciones, son periodos de tiempo en donde los movimientos oculares se detienen en un lugar determinado (9, 10). Con estos movimientos, nuestros ojos generan estados sensoriales que ayudan en la selección de una percepción (11).

A partir de otros estudios, sabemos que después de que ocurre un cambio en nuestra percepción en estímulos biestables, movemos nuestra mirada a puntos específicos de las imágenes. Aparentemente este movimiento de los ojos permite estabilizar el nuevo estado perceptual (3). Más aún, se ha mostrado que existe una correlación entre el lugar que miras y la reversión perceptual. Sugiriendo que aumenta la probabilidad de que ocurra un cambio perceptual cuando los ojos se posicionan en regiones específicas de los estímulos (12). Esto evidencia la importancia de los movimientos oculares en la percepción, en particular, en estímulos biestables.



Diseño experimental

Se grabó el movimiento de los ojos con una cámara de video infrarroja y un sistema de seguimiento ocular que detecta automáticamente los eventos como las sacadas, fijaciones y parpadeos, a 27 voluntarios entre 18 – 60 años. Simultáneamente, se registró su actividad neuronal con el EEG y se les solicitó a las personas que presionaran un botón al momento en que notaban el cambio de la percepción. Las personas fueron ubicadas en una silla mirando de frente a una pantalla, donde se presentaron 3 figuras bistables distintas: Cubo de Necker (NK), Structure from Motion (SFM)/Esfera y Plaid/Grilla

Considerando la evidencia antes expuesta, y con el fin de determinar qué eventos ocurren a nivel cerebral y ocular en estímulos bistables, es que este estudio tiene como objetivo determinar cómo estarían involucrados los movimientos oculares en los mecanismos de reversión de estímulos bistables.

2. Metodos

Sujetos y tarea experimental

En el mundo de las neurociencias cognitivas es fundamental trabajar con personas para conocer los misterios del cerebro. Adicionalmente, se deben seguir rigurosos protocolos éticos aprobados por el Comité de ética de la Facultad de Medicina - Universidad de Chile. En este experimento participaron 27 voluntarios entre 18 – 60 años, a los cuales se les

grabó el movimiento de sus ojos con una cámara de video infrarroja y un software de seguimiento ocular que detecta automáticamente eventos como las sacadas, fijaciones y parpadeos. Simultáneamente, se registró su actividad cerebral mediante un EEG. Para ello se les pone a las personas un gorro de goma que contiene pequeños electrodos (similares a los audífonos) que registran la actividad eléctrica del cerebro, y se les solicitó a las personas que presionaran un botón cuando ocurriera un cambio en su percepción. Las personas estaban sentadas en una silla mirando de frente una pantalla, en ella se presentaron 3 figuras bistables distintas: Cubo de Necker (NK), Structure from Motion (SFM), que corresponde a una esfera y Plaid, que corresponde a una grilla.

La tarea consiste en visualizar las figuras NK, SFM y Plaid en distintas condiciones:

- i) Exploración libre (EL): se le indica al sujeto que explore la imagen libremente, y cuando note un cambio en su percepción o reversión presione la botonera.
- ii) Punto de fijación (PF): el sujeto debe mantener la vista en un punto al centro de la imagen, y avisar cuando cambie la percepción presionando la botonera.
- iii) Revertir rápidamente (RR): el sujeto debe voluntariamente cambiar la percepción visual, y reportarlo cuando lo logre presionando la botonera.
- iv) Mantención del Percepto (MP): el sujeto debe mantener la percepción estable el mayor tiempo posible (percepto), y reportar las veces que se modifica presionando la botonera.

Procesamiento de Datos

Gracias al avance de la tecnología, es posible registrar los cambios de manera automática, tal como lo hace tu teléfono para detectar tu rostro mientras saca una foto. A través de programas computacionales se relacionaron los datos provenientes del equipo de seguimiento ocular, la botonera y la actividad neuronal obtenidos con el EEG, específicamente la intensidad del ritmo α , para poder comparar temporalmente los distintos fenómenos registrados por cada equipo.

Análisis estadístico

Para validar y entregar confiabilidad al estudio se aplican procedimientos matemáticos para determinar si algo sucede por eventos específicos y no por el azar. Estos procesos cuando son matemáticamente distintos los podrás ver con un asterisco en las figuras, lo que indica que este es un evento y significativo relevante.

3. Resultados

a) La libertad del movimiento de los ojos no influye en el cambio perceptual

El estudio del cerebro se encuentra lleno de misterios que aún no se pueden resolver. Sin embargo, al igual que en un caso policial, existen pistas que nos permiten seguir cursos de investigación para llegar a alguna respuesta. De esta forma, Einhäuser en el 2004, demuestra que hay regiones en las figuras biestables que son visitadas con mayor frecuencia, y cuando la mirada se fija sobre alguna de estas áreas aumenta la posibilidad de que se gatille una reversión (12). Bajo esta premisa, determinamos las regiones con mayor frecuencia de visitas (tasa de fijaciones) en nuestras figuras biestables (**Figura 1A**).

Como se observa en la **Figura 1A**, se observa un mapa de calor, es decir se ha coloreado en rojo las regiones de la imagen en donde las personas fijan más la mirada y en color azul las zonas menos visitadas. Los resultados

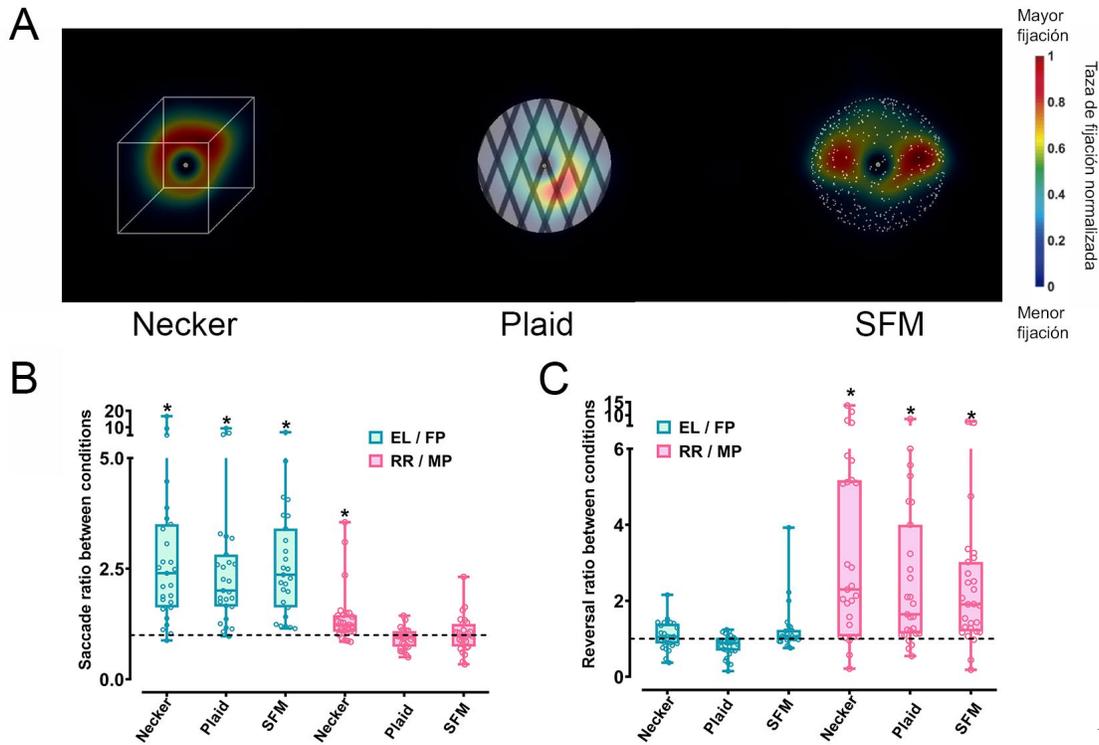


Figura 1.

Actividad ocular y conductual. (A) Se contó el número de fijaciones que realizaban los sujetos en 3 figuras biestables distintas: Cubo de Necker (NK), Structure from Motion/Esfera (SFM) y Plaid/Grilla. En cada estímulo es posible observar lugares donde se agrupan un mayor número de fijaciones siendo en rojo las áreas donde se mira más y en azul donde se mira menos. (B) Se cuantificó la tasa reversiones realizadas dividiendo EL/FP y RR/MP. El número de reversiones es similar, independiente la de la libertad de movimiento ocular (azul), sin embargo, estas reversiones pueden ser controladas según la instrucción (rosa). (C) Se cuantificó la tasa de sacadas según las razones EL/FP y RR/MP. Los sujetos realizan más movimientos oculares durante la exploración libre en comparación a la restricción de movimientos (azul), sin embargo, la cantidad de movimientos oculares es similar entre las condiciones de RR y MP, indicando que el número de sacadas parece ser irrelevante para lograr el cambio perceptual (rosa).

nos muestran que en las tres imágenes (NK/Cubo, SFM/Esfera y Plaid/Grilla), las personas exploran ciertas regiones mucho más que otras, existiendo al menos una región de alto interés. Estos resultados sugieren que las personas elaboran estrategias de exploración que podrían estar contribuyendo al cambio perceptual. Sin embargo, mirar estas regiones no garantiza que haya cambiado la percepción.

¿Cómo podemos determinar si el cambio de percepción es mayor o

menor en la exploración libre en comparación a la fijación en un punto?

Siguiendo estas pistas, contamos el número de veces en que las personas presionaban la botonera. Este valor se determinó para las condiciones de exploración libre (EL), fijación en un punto (FP), reversión rápida (RR) y mantención del percepto (MP). Para determinar cuántas veces es mayor o menor la cantidad de cambios perceptuales reportados se obtuvo la ra-

zón entre la condición EL con FP y el mismo procedimiento se realizó con RR con MP. Si el resultado de las razones es igual a 1 indica que las condiciones no afectan en la reversión. En cambio, si el resultado es distinto a 1, significa que hay diferencias entre las condiciones comparadas.

Como observamos en la **Figura 1B**, al comparar el número de reversiones reportadas por los participantes a través de la botonera, encontramos que no hay diferencias significativas entre las condiciones EL y FP (valores cercanos a 1). Mientras que al evaluar las condiciones de RR y MP, observamos que las reversiones son distintas a 1 en la condición RR por sobre la MP. Este resultado sugiere que somos capaces de manejar de manera voluntaria la reversión. No obstante, aún no hemos respondido si el movimiento de los ojos provoca un cambio perceptual.

¿El movimiento ocular influye en el cambio de percepción en estímulos biestables?

En la **Figura 1C** se determinó la razón entre el número de sacadas entre EL/FP (azul) y entre RR/MP (rosa). Los datos obtenidos indican que los sujetos movieron más sus ojos en la condición EL en comparación con FP. En cambio, cuando analizamos las condiciones RR/MP, descubrimos que sólo se observan diferencias en el cubo de Necker (valor distinto a 1). Debido a que los

resultados obtenidos en las imágenes de Plaid y SFM son cercanos a 1, podemos sugerir que la cantidad de sacadas no influiría directamente en el proceso de reversión. A partir de estos resultados decidimos evaluar la actividad cerebral registrada en la tarea y su relación con los movimientos oculares asociados a una reversión.

b) La actividad neuronal y su correlación con las sacadas

¿Hay algún cambio en la actividad neuronal que se correlacione con el movimiento ocular?

A continuación, analizamos cómo cambia la actividad neuronal cuando los sujetos observan las figuras biestables. Debemos recordar que, durante todo el experimento, se midió la actividad neuronal a través de un EEG, lo que permitió compararla con los movimientos oculares y el reporte de reversión a través de la botonera. Como se mencionó previamente se midió el ritmo α , que presenta una frecuencia entre los 8 a 16 Hz.

A través de un análisis denominado cartas tiempo-frecuencia se pueden observar los cambios en los diferentes ritmos o frecuencias (**Figura 2**). El color azul indica una disminución de la intensidad del ritmo y, en rojo se indica su aumento. El ritmo alfa es el que se observa en la zona baja de frecuencias y esta marcado con un rectángulo negro.



En la **Figura 2**, evaluamos la actividad cerebral del ritmo α con relación a las sacadas anterior (**Figura 2A**) o posterior al reporte con la botonera (**Figura 2B**). Los resultados de la **Figura 2A** muestran que cuando nuestra variable corresponde a la sacada previa al reporte manual la intensidad del ritmo α disminuye (color azul). En cambio, esta actividad no es observable si nos enfocamos en la sacada realizada después del reporte manual (**Figura 1B**). Estos resultados nos indican que los movimientos oculares participan en el cambio de percepción, pero no resultan concluyentes para considerarlos como evidencia directa de que las sacadas producen el proceso de reversión.

4. Discusión

Nuestros esfuerzos se han enfocado en determinar si el movimiento ocular voluntario influye en percibir una cosa u otra. El ejecutar determinados movimientos oculares ayuda al cerebro a explorar el mundo. Sin embargo, el cerebro también construye nuestra

realidad. Ahora, ¿quién determina lo que percibimos?, ¿Será nuestro cerebro antes de mover los ojos? o ¿son nuestros movimientos oculares lo que el propio cerebro interpreta? Esta es una pregunta tan compleja, que, con la ayuda de la ciencia y otras disciplinas, intentamos resolver.

Generalmente cuando se concluye una investigación policial, la mayoría de las veces nos encontramos con un culpable de los actos. Sin embargo, en el mundo de las neurociencias cognitivas, a veces, los culpables son medianamente responsables de sus actos, por ende, no se les puede responsabilizar de todo lo ocurrido. El principal objetivo de nuestra investigación es determinar la participación de los movimientos oculares en el proceso de reversión de figuras biestables. Los resultados obtenidos nos llevan a concluir que hay partes de las figuras biestables que vemos más que otras y que podrían ayudar en la reversión (3, 12) (**Figura 1A**). Por otra parte, la caracterización de las sacadas, podrían dar pistas de cómo el

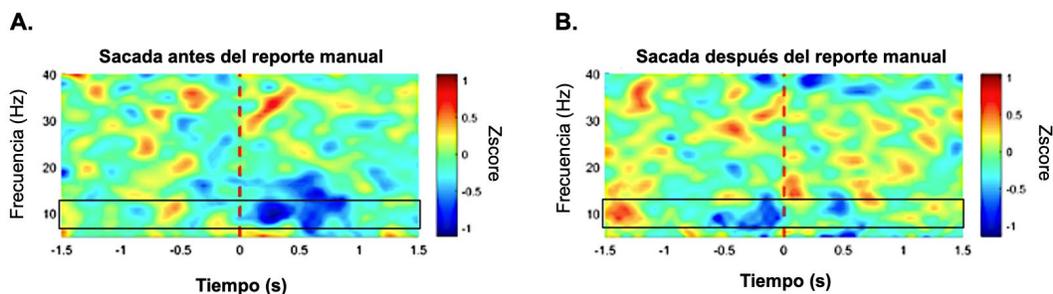


Figura 2.

Actividad neuronal y correlación con las sacadas. Gráfica de carta tiempo frecuencia. Azul significa menos intensidad y rojo significa mayor intensidad. El ritmo α es visible entre los 8 – 12 Hz. La línea punteada al centro indica el momento de la sacada (A) Sacada ocurrida antes del reporte manual. La caída de intensidad del ritmo α asociada a la sacada antes al reporte se observa en azul (B) sacada después del reporte manual los cambios en el ritmo α no son claramente observables.

movimiento ocular podría estar influyendo en el cambio perceptual.

Las sacadas ayudan a mantener la visión cuando se cansa la retina (13), corrigen el punto de interés (14), y activan neuronas distintas de la corteza visual (la parte del cerebro que interpreta lo que vemos)(15), entre otras funciones. Nuestros resultados indican que el número de reversiones del percepto es similar tanto para la exploración libre (EL), como para la fijación en un punto (FP) (**Figura 1B**). Más aún, la cantidad de sacadas también es variable, debido a que los sujetos realizan más sacadas cuando no hay restricción del movimiento ocular, sin embargo, esta libertad de movimiento no provoca un aumento en la cantidad de veces que generamos los procesos de reversión (**Figura 1B**). No obstante, el control de la reversión no presenta una actividad ocular distinta, indicándonos que los sujetos mueven los ojos en una frecuencia similar tanto para cambiar la percepción como para mantenerla (**Figura 1C**).

Debemos recordar que, si los individuos experimentan una reversión, nuestro principal indicador es el autorreporte al presionar la botonera. El mayor problema asociado al reporte manual es la ambigüedad temporal, ya que existe una inconsistencia entre el momento en que los sujetos reportan una reversión y los cambios en la actividad neuronal medida por EEG asociada al cambio perceptual.

Cabe destacar que la actividad cerebral asociada a la transición perceptual en figuras biestables es un fenómeno observable en la mayoría de las personas, aunque es difícil de resolver en qué momento específico sucede o qué eventos podrían estar modulándola (6, 16, 17). De esta manera, evaluamos las cartas tiempo frecuencia, para determinar los cambios de la actividad neuronal asociada al movimiento ocular y la reversión (**Figura 2**). Estos resultados indican que existe una disminución de la intensidad del ritmo α considerablemente más marcada en las sacadas previas al reporte manual en comparación a aquellas sacadas que se ejecutan después del reporte manual.

Sin embargo, no podemos determinar que todas las sacadas que ocurren antes del reporte vayan a provocar una reversión, o que las sacadas provocan el cambio perceptual. Por lo tanto, estos resultados no implican que necesariamente debes mover el ojo para percibir una reversión.

Finalmente, otros investigadores proponen que, para cambiar de percepción en figuras biestables, debemos cambiar la energía de nuestro cerebro (18, 19). Por ende, para cambiar entre los estados perceptuales de una figura biestable debemos cambiar las probabilidades a nuestro favor. Entonces, existe la posibilidad de que la caída de intensidad del ritmo α luego de una sacada, cambie la energía del cerebro, y por ende pone las probabi-



lidades a nuestro favor, ayudando a la transición de la percepción visual en estímulos biestables.

Referencias

- H. Nakatani, N. Orlandi, C. van Leeuwen, Precisely timed oculomotor and parietal EEG activity in perceptual switching. *Cogn Neurodyn* 5, 399-409 (2011).
2. H. Nakatani, C. van Leeuwen, Antecedent occipital alpha band activity predicts the impact of oculomotor events in perceptual switching. *Front Syst Neurosci* 7, 19 (2013).
3. M. Riani, M. T. Tuccio, A. Borsellino, J. Radilova, T. Radil, Perceptual ambiguity and stability of reversible figures. *Percept Mot Skills* 63, 191-205 (1986).
4. C. Scholes, P. V. McGraw, M. Nyström, N. W. Roach, Fixational eye movements predict visual sensitivity. *Proc Biol Sci* 282, 20151568 (2015).
5. J. Kornmeier, M. Bach, Ambiguous figures - what happens in the brain when perception changes but not the stimulus. *Front Hum Neurosci* 6, 51 (2012).
6. U. Isoglu-Alkac et al., Alpha activity decreases during the perception of Necker cube reversals: an application of wavelet transform. *Biol Cybern* 82, 313-320 (2000).
7. D. Struber, C. S. Herrmann, MEG alpha activity decrease reflects destabilization of multistable percepts. *Brain Res Cogn Brain Res* 14, 370-382 (2002).
8. J. Ross, A. Ma-Wyatt, Saccades actively maintain perceptual continuity. *Nat Neurosci* 7, 65-69 (2004).
9. L. Melloni, C. M. Schwiedrzik, E. Rodriguez, W. Singer, (Micro)Saccades, corollary activity and cortical oscillations. *Trends Cogn Sci* 13, 239-245 (2009).
10. R. Engbert, Microsaccades: A microcosm for research on oculomotor control, attention, and visual perception. *Progress in brain research* 154, 177-192 (2006).
11. C. von der Malsburg, The what and why of binding: the modeler's perspective. *Neuron* 24, 95-104, 111-125 (1999).
12. W. Einhauser, K. A. Martin, P. König, Are switches in perception of the Necker cube related to eye position? *The European journal of neuroscience* 20, 2811-2818 (2004).
13. R. W. Ditchburn, D. H. Fender, S. Mayne, Vision with controlled movements of the retinal image. *The Journal of physiology* 145, 98-107 (1959).
14. T. N. Cornsweet, Determination of the stimuli for involuntary drifts and saccadic eye movements. *J Opt Soc Am* 46, 987-993 (1956).
15. S. L. Macknik, M. S. Livingstone,

- Neuronal correlates of visibility and invisibility in the primate visual system. *Nat Neurosci* 1, 144-149 (1998).
16. U. Isoglu-Alkac, D. Struber, Necker cube reversals during long-term EEG recordings: subbands of alpha activity. *Int J Psychophysiol* 59, 179-189 (2006).
 17. J. Kornmeier, M. Bach, Early neural activity in Necker-cube reversal: evidence for low-level processing of a gestalt phenomenon. *Psychophysiology* 41, 1-8 (2004).
 18. J. A. Moreno et al., Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice. *Science translational medicine* 5, 206ra138 (2013).
 19. R. Moreno-Bote, D. C. Knill, A. Pouget, Bayesian sampling in visual perception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12491-12496 (2011).



Esta revista fue financiada por la Iniciativa Científica Milenio a través de su concurso Proyección al Medio Externo 2020, adjudicado al Instituto de Neurociencia Biomédica (ICN09_015).

