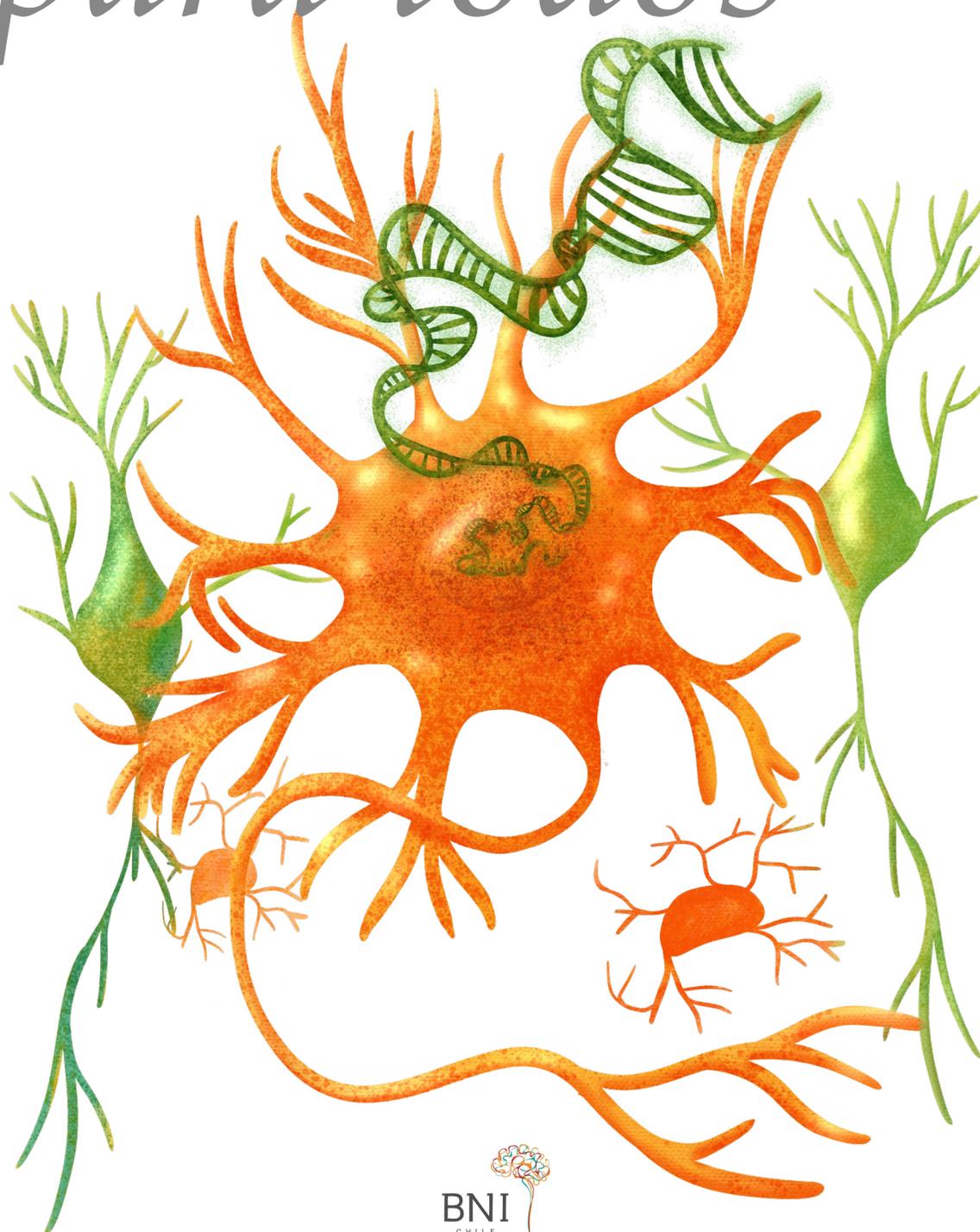




pappers

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

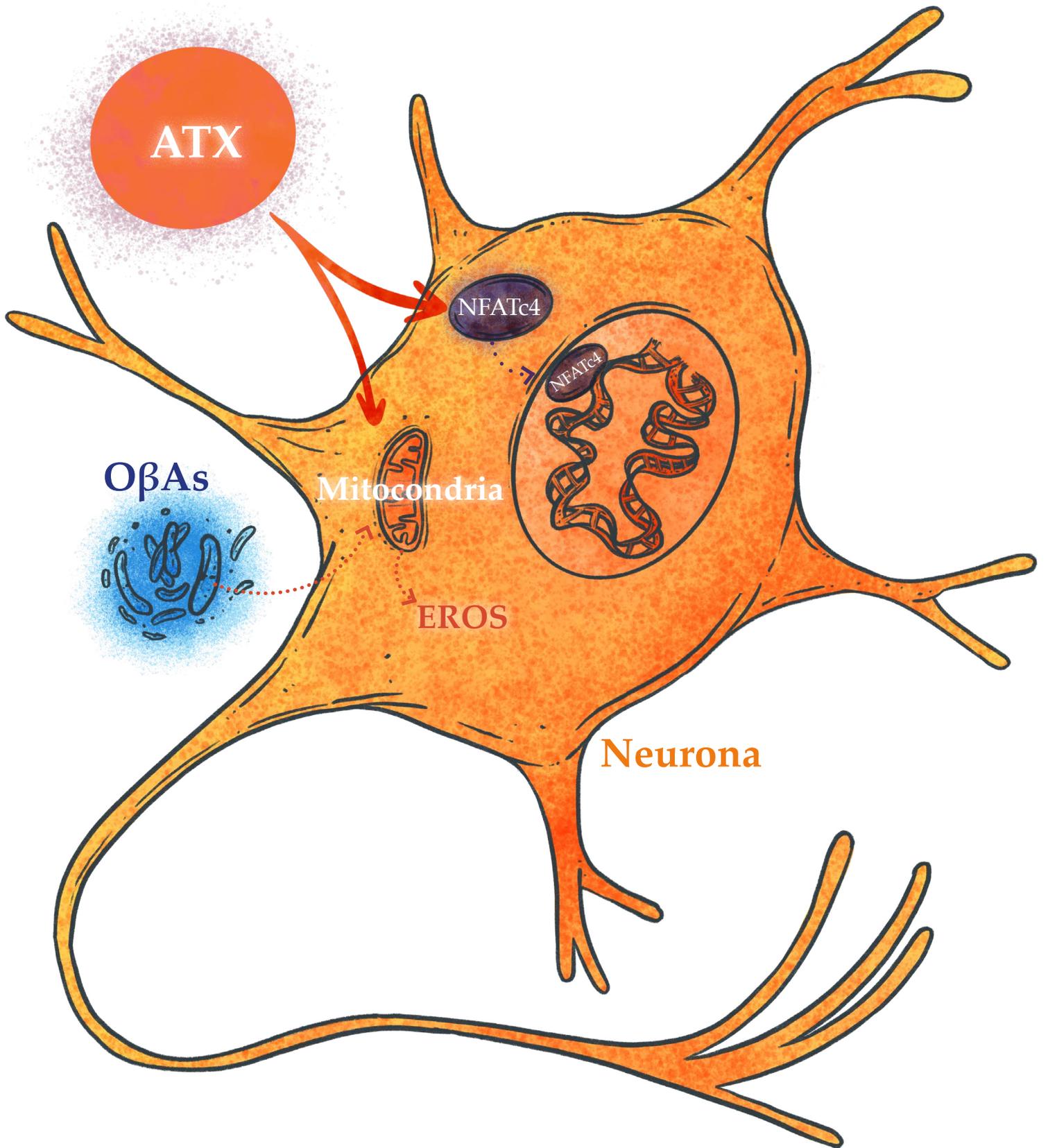
Evelyn Millar

Milangela Mogollón

Rodrigo Tapia Seaman

Ana Timmerman







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 (O β As) (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

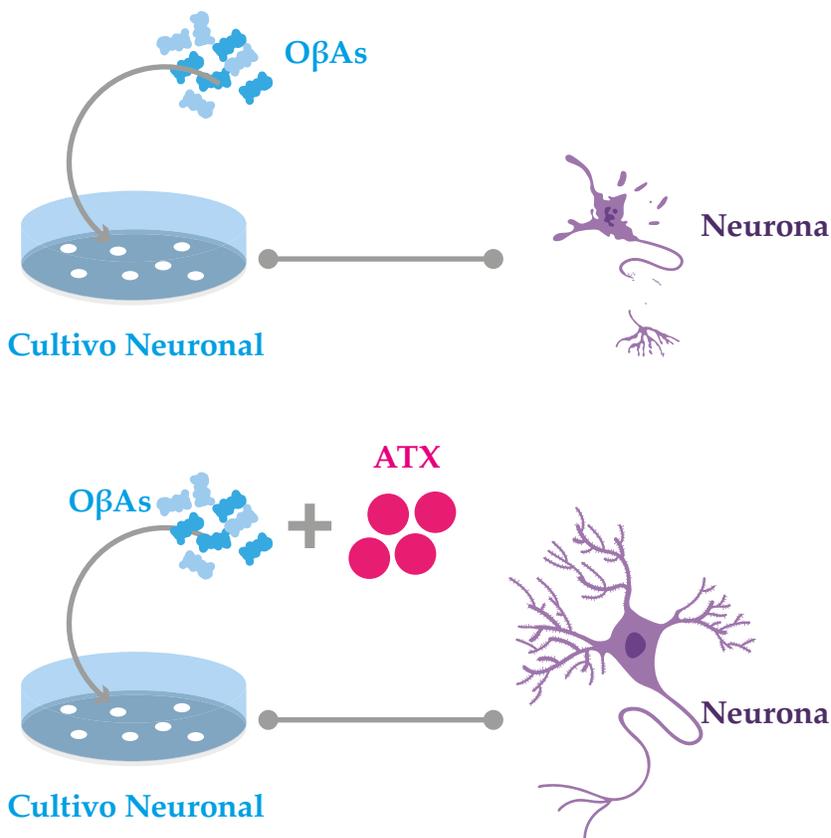
Glosario

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

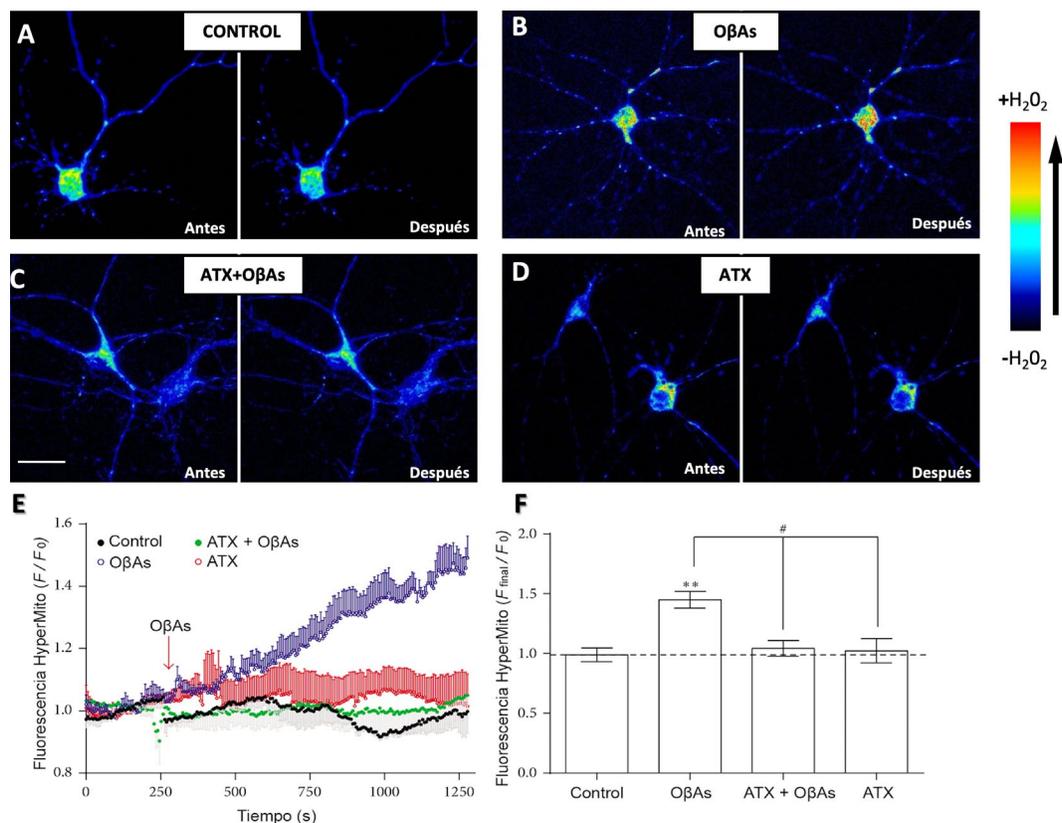


Figura 1.

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/F₀), donde F₀ 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/F₀ 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-

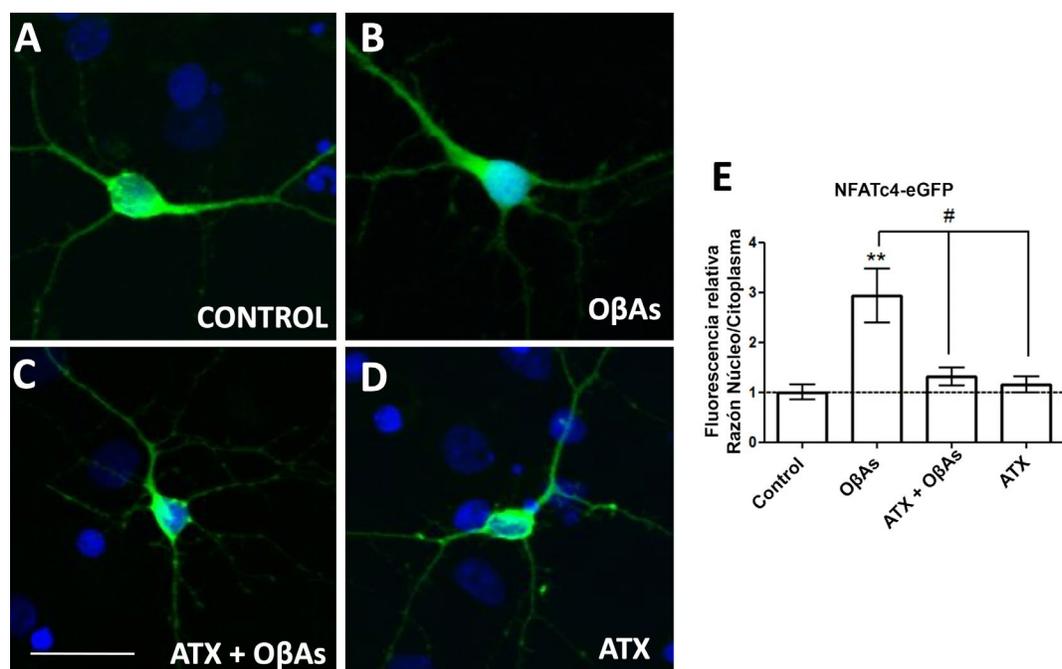


Figura 2.

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>.



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).

