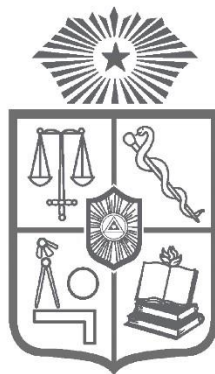




**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“Estimulación visual en frecuencia theta y sus efectos en la memoria espacial”.**

**Camila Ramírez Medina.**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN NEUROCIENCIAS**

Director de Tesis: Prof. Dr. José Luis Valdés Guerrero

**2022.**

## I. Índice de Contenidos:

I.	Índice de contenido. ....	2-3.
II.	Resumen. ....	4.
III.	Abstract. ....	5.
IV.	Introducción. ....	6-15.
1.	Teoría Central. ....	6-11.
1.1	Importancia de la banda en frecuencia Theta. ....	7-8.
1.2	Estimulación visual y auditiva en frecuencia theta y gamma. ....	9-10.
1.3	Mejoras cognitivas y ejercicio físico agudo. ....	11-12.
1.4	Teoría periférica. ....	12.
1.5	Vía PGC-1alfa. ....	13.
1.6	Vía del Lactato. ....	13-15.
1.7	V. Hipótesis y Objetivos. ....	15.
2.	Hipótesis. ....	15.
2.1	Objetivo General. ....	15.
2.2	Objetivos Específicos. ....	15-16.
3	VI. Materiales y Métodos. ....	16-25.
3.	Animales. ....	16.
3.1	Grupos experimentales. ....	16-17.
3.2	Cirugía. ....	17-19.
3.3	Protocolo de estimulación visual y adquisición de datos. ....	20-22.

<b>3.4</b>	Tarea de reconocimiento espacial de objetos. ....	22-23.
<b>3.5</b>	Perfusión de animales. ....	23-24.
<b>3.6</b>	Tinción de Nissl. ....	24.
<b>3.7</b>	Estadística. ....	25.
<b>VII.</b>	<b>Resultados.</b> .....	25-38.
<b>4.</b>	Resultados Objetivo Específico 1. ....	25-28.
<b>4.1</b>	Resultado Objetivo Específico 2. ....	28-33.
<b>4.2</b>	Resultado Objetivo Específico 3. ....	33-35.
<b>4.3</b>	Confirmación histológica de cánulas y electrodos.....	36-37
<b>VIII</b>	<b>Discusión.</b> .....	38-40.
<b>IV</b>	<b>Conclusión.</b> .....	41.
<b>X</b>	<b>Referencias.</b> .....	42-47.

## II. RESUMEN

La memoria declarativa es una habilidad cognitiva fundamental que nos permite una mejor adaptación al ambiente en que vivimos. Esta memoria la podemos dividir en tres diferentes fases: la adquisición, la consolidación y la evocación. Cada una de estas fases requiere de plasticidad. El ejercicio físico es una de las condiciones fisiológicas que mayormente puede facilitar la adquisición y/o consolidación de las memorias declarativas, mediante un incremento en diversas formas de plasticidad tales como: neurogénesis, dendrogénesis y angiogénesis, entre otras. Sin embargo, cómo el ejercicio físico es capaz de promover estos cambios plásticos en el cerebro con el consecuente aumento cognitivo, es algo que hasta hoy no ha sido claramente establecido. Una de las teorías propuestas es la teoría central, la cual postula que debido al aumento de actividad eléctrica de tipo theta en hipocampo y cortezas aledañas producido durante el ejercicio físico se generan cambios neuroplásticos que se traducen en un mejor desempeño de memoria. Por otro lado, se encuentra la teoría periférica que plantea que los beneficios del ejercicio en la memoria se deben a la liberación de señales humorales que van desde los músculos hacia el SNC. Dado lo anterior cabe cuestionarse si ¿es el aumento de actividad eléctrica theta hipocampal durante el ejercicio físico es capaz de generar un aumento cognitivo? Para testear esta idea se estimuló visualmente en banda theta, ratas sedentarias, buscando reproducir artificialmente el aumento eléctrico que se produce durante el ejercicio físico, y evitando los componentes periféricos propuesto. Posteriormente se evaluó las capacidades de memoria en estos animales mediante una tarea dependiente de hipocampo.

### **III. ABSTRACT**

The human brain needs the coordination of theta (4-8 Hz) and gamma (20-120 Hz) oscillations to integrate new information into synaptic patterns or neuronal representations to consolidate new memories. One of the primary sources of increasing those oscillations in the brain is acute physical exercise. Physical exercise promotes pro-cognitive effects in different cognitive domains such as executive functions and memory. However, the mechanisms underlying these positive changes in cognition have not been fully elucidated. In the present investigation, we successfully promote pro-cognitive effects like those induced by acute physical activity throughout a minimally invasive procedure consisting of visual stimulation in theta frequency with a stroboscopic light. Our results show that visual stimulation at theta frequency effectively induced theta oscillation in the hippocampus and promoted memory enhancement.

In addition, the reversible inactivation of the hippocampus during visual stimulation reduced the cognitive effect, although the data are not statistically significant. Nevertheless, the results seem promising. Considering that these last results have a small sample size, it is not ruled out that an increase in hippocampal electrical activity similar to the observed during physical activity mediates positive effects on spatial memory.

## **IV.INTRODUCCIÓN**

La relación entre ejercicio físico y las mejoras en el aprendizaje y memoria se han probado tanto en el modelo animal como en humanos. (Griffin et al., 2009; van Praag, 2009; van Praag et al., 1999). El ejercicio tiene efectos positivos en la cognición especialmente en la memoria, provocando transformaciones a nivel de SNC a través de cambios en la neuro plasticidad de diversas formas, sin embargo, la manera en el que el ejercicio provoca estos cambios en el SNC es aún discutible y poco entendida. Existen al menos dos teorías explicativas respecto al mecanismo por el cual el ejercicio físico genera cambios plásticos en el SNC. Dentro de las cuales tenemos:

### **1. Teoría central.**

La teoría central propone que el aumento de la actividad eléctrica hipocampal y de áreas aledañas entorrinales que emerge mientras se realiza actividad física, es lo que puede generar cambios plásticos en el SNC, dado que mientras los individuos caminan una intensa onda theta emerge desde la formación hipocampal. Ha sido demostrado que durante el ejercicio existe una notable activación eléctrica del hipocampo junto con la expresión de genes tempranos marcadores de actividad y plasticidad neuronal como c-Fos, Zif268 y Arc (Rhodes et al, 2003). Este aumento en la actividad eléctrica en banda theta del hipocampo puede inducir cambios estructurales y funcionales en el SNC, especialmente en el hipocampo, como aumentos en BDNF (Brain derived neurotrophic factor), neurogénesis, dendrogénesis y angiogénesis (Engert et al., 1999; Barrionuevo et al., 1980; Guo et al., 2014; Lacoste et al., 2015; Deisseroth et al., 2004), necesarios para mejorar la cognición.

## **1.1 Importancia de la banda de frecuencia Theta.**

Los ritmos cerebrales son ondas periódicas originadas por fluctuaciones en el potencial de membrana, sináptico y de acción de una extensión considerable de tejido nervioso que son fácilmente observables en los registros de potenciales de campo local o LFP (local field potential) tales ritmos reflejan la actividad sincronizada de un gran número de neuronas (Lee Colgin, 2016). Estos ritmos oscilan en frecuencias determinadas, que aparecen en momentos específicos dependientes de la conducta. El hipocampo es una estructura esencial para la adquisición de la memoria espacial y episódica. Y sus características facilitan la investigación de estos ritmos cerebrales debido a que consta de grandes ensambles de neuronas piramidales, por ejemplo, las neuronas de CA1 que poseen dendritas alineadas en paralelo, lo que permite un mejor registro electrofisiológico, además de interneuronas que gracias a sus largas y divergentes proyecciones pueden sincronizar la actividad electroquímica a través de grandes ensambles neuronales al interior de hipocampo (Lee Colgin, 2016). Las oscilaciones de frecuencia theta se encuentran entre los 4 y 12 Hz. Son consideradas una frecuencia baja, y están compuestas de ondas sinusoidales que ocurren en todas las subregiones hipocampales durante la exploración activa, el sueño REM, el movimiento, la memoria, entre varios otros momentos conductuales (Lee Colgin, 2016). En los años 70 estudios que hoy son fundamentales para el entendimiento de la funcionalidad de este tipo de actividad eléctrica en el sistema nervioso, comprobaron que la presencia de la frecuencia theta o su amento de poder en un electroencefalograma predice cuan rápido un animal puede aprender y lo bien que este puede o no puede recordar lo aprendido. (Landfield et al, 1972; Berry et al, 1978; en Lee Colgin, 2016). Sumado a esto, se ha observado que un aumento de la intensidad de la

actividad física realizada por los animales se encuentra estrechamente relacionada con un aumento de actividad eléctrica hipocampal, coincidente con un aumento en el poder espectral de la banda theta (Buzsaki et al., 2013). Una investigación que caracterizó la banda theta en términos de poder y frecuencia, mientras se realiza actividad física en un modelo animal, fue la realizada por Kuo et al., en el 2011, esta investigación analizó la frecuencia de las oscilaciones hipocampales y su amplitud, la frecuencia cardíaca, además de la amplitud de la actividad muscular mediante el registro de EMG nual, mientras ratas realizan actividad física en una rueda de entrenamiento. Los resultados muestran que basado en las variables anteriormente expuestas (frecuencia, amplitud, etc.) la actividad física de la rata puede fijarse en dos fases: la primera fase de iniciación, que va de los 0 a los 24 s, donde aumenta la frecuencia de theta en conjunto con el EMG y la actividad física en los primeros 4 s; luego entre los 6 s y los 10 s aumenta la amplitud de la frecuencia theta, que luego es seguido por un aumento progresivo de la frecuencia cardíaca. La segunda fase es la de mantención de la actividad física pasado los primeros 24 s, en donde la amplitud de theta, la frecuencia cardíaca, y la actividad física se mantienen en niveles altos con menores fluctuaciones, pero al mismo tiempo la frecuencia de la banda theta decae en rangos a sus niveles basales iniciales. Por último, es posible hipotetizar que estas alzas en la actividad eléctrica del hipocampo pueden inducir cambios plásticos estructurales y funcionales en el SNC, especialmente en el hipocampo, como aumentos en BDNF, neurogénesis, dendrogénesis, angiogénesis, potenciación a largo plazo (LTP) (Engert et al., 1999; Barrionuevo et al., 1980; Guo et al., 2014; Lacoste et al., 2015; Deisseroth et al., 2004).



## **1.2 Estimulación visual y auditiva en frecuencias gamma y theta y sus efectos en la memoria.**

Recientemente se ha descubierto que la efectividad de la estimulación con luz gamma de baja frecuencia (40 Hz) en conjunto con estimulación auditiva en gamma simultánea, puede reducir placas beta amiloides en la corteza auditiva y el Hipocampo además de obtener mejoras en la memoria espacial en ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer; 5XFAD (Martorell et al., 2019). Además, a nivel celular se han observado cambios en las respuestas de activación en microglía, astrocitos y vasculatura cerebral. La estimulación auditiva con tonos en frecuencia gamma también reduce la expresión de la proteína tau fosforilada en el modelo de tauopatía P301S. En efecto, la estimulación auditiva y visual combinada en gamma produce reactividad glial, gliogénesis y disminución de amiloide en la corteza prefrontal medial, además de una reducción generalizada de las placas amiloides a lo largo de la neocorteza. (Martorell et al., 2019). Otro experimento reciente que comprueba la eficacia de la estimulación visual en modelo animal es el de Zheng et al., 2020 en donde a ratones con daño isquémico estratégico para generar deterioro en CA1 se les estimula visualmente con una luz LED en frecuencias entre 30 y 50 Hz logrando restaurar el acoplamiento de fase y amplitud entre las frecuencias gamma y theta, mejorando el desempeño en pruebas de memoria espacial y aumentando la fuerza sináptica entre CA3 y CA1 demostrado como un aumento en la densidad de espinas dendríticas y potenciación a corto plazo.

Se infiere entonces que la estimulación visual y auditiva promueve cambios en las estructuras implicadas en la memoria espacial tales como neocorteza e Hipocampo y se puede hipotetizar que la estimulación visual en frecuencia theta podría mejorar la cognición a través de la promoción de fenómenos de plasticidad. Cabe volver a mencionar el experimento de Kuo et al., en el 2011 que determina que al comienzo de la actividad física se observa un aumento en la frecuencia y el poder de la banda theta hipocampal de manera proporcional al aumento de tiempo realizando actividad física y que el aumento en la potencia espectral de theta se correlaciona con mejor rendimiento en tareas de memoria (Landfield et al, 1972; Berry et al, 1978; en Lee Colgin, 2016). Por consiguiente, la estimulación visual en un rango theta podría ser una vía para inducir artificialmente las oscilaciones theta inducidas por ejercicio agudo y promover mejoras cognitivas, de manera no invasiva y a su vez apoyar así la teoría central.

La estimulación visual en theta ha sido utilizada también en modelo humano obteniendo buenos resultados, Köster et al., en el 2018 manipuló experimentalmente el proceso de codificación de la memoria en 20 estudiantes universitarios mediante estimulación visual con luz a un ritmo theta mientras estos realizan una prueba de memoria de trabajo con el fin de mejorar selectivamente el proceso de codificación de memoria. Los sujetos se sometieron a dos condiciones de estimulación visual o (EV): EV en banda theta 4-10Hz versus EV en banda alfa (8-12Hz). Específicamente, el rendimiento de la memoria posterior a la EV fue mayor para los individuos con EV en una frecuencia theta, en comparación con una EV en una frecuencia alfa. Por otro lado, también la aplicación de corriente alterna transcraneal a una frecuencia theta en personas despiertas (Vosskuhl et al., 2015) y el uso de protocolos de estimulación theta-gamma obtiene mejores resultados en pruebas de memoria de trabajo (Köster et al.,

2018), aun cuando estos estudios evalúan memoria de trabajo que es más dependiente de corteza prefrontal, es posible esperar resultados similares en tareas de memoria espacial dependientes de Hipocampo.

### **1.3 Mejoras inmediatas en la memoria tras la realización de ejercicio físico agudo.**

El aprendizaje o adquisición de una memoria requiere de neuroplasticidad, como por ejemplo cambios en los niveles de receptores ionotrópicos glutamatérgicos NMDA (Baez, 2018) y fenómenos de plasticidad sináptica como el LTP. Por otro lado, sabemos que el ejercicio físico tiene efectos beneficiosos sobre la neuro plasticidad y la cognición (Hotting et al., 2012; Hotting et al., 2016). Existe por lo tanto varias investigaciones que buscan una relación entre los cambios neuroplásticos que genera el ejercicio y los resultados en pruebas de memoria. El estudio realizado en humanos por Labban et al., en el año 2011, probó que el ejercicio físico realizado en un corto periodo de tiempo después del aprendizaje no genera cambios significativos en la memoria. Esto comparado con un grupo control que solo descansó y no realizó ejercicio físico tras el aprendizaje de la tarea. (Labban et al., 2011). Sin embargo, Hotting et al., en el año 2016 demostró que la ejercitación posterior a la fase de adquisición sí genera efectos positivos en la memoria. Este tipo de evidencias indican que aún existe controversia de los efectos del ejercicio sobre nuestras habilidades cognitivas y la cantidad/intensidad y momento en que se realiza el ejercicio físico respecto a los procesos cognitivos. Un metaanálisis de 79 estudios en donde se testean diferentes funciones cognitivas tras un solo bout de ejercicio físico (Chang, Labban, Gapin, Etnier, 2012) llega a la conclusión de que un solo

bout de ejercicio físico posee efectos positivos en la cognición independiente de en qué momento se realice una tarea, pero sí es relevante que tipo de habilidad cognitiva se mide con dicha tarea (atención, funciones ejecutivas, memoria corto o largo plazo etc.). Respecto a esta investigación existen mejores y más consistentes resultados para tareas que miden funciones ejecutivas y memoria a largo plazo de formación reciente (Coles, Tomporowski, 2008 en Chang et al., 2012). Esta propuesta concuerda con que, de existir cambios cognitivos a corto plazo, estos se explicarían mejor debido a un aumento en la actividad eléctrica hipocampal (teoría central), probablemente asociado a oscilación theta que debiera ser posible de inducir artificialmente a través de un mecanismo no invasivo como lo es la estimulación sensorial en este rango de frecuencia.

#### **1.4 Teoría periférica.**

Esta teoría afirma que factores tróficos periféricos liberados desde los músculos serían los responsables del aumento de la neuro plasticidad inducida por el ejercicio. Dentro de esta línea investigativa el factor neurotrófico derivado del cerebro o BDNF muscular, que es una neurotrofina implicada en el desarrollo, plasticidad y en la modulación de la transmisión sináptica (Ferris, 2007), es una de las neurotrofinas más investigadas. Su aumento a nivel periférico o el aumento del lactato (El Hayek et al., 2019) desembocan en un aumento de BDNF a nivel hipocampal. De este modo entonces el ejercicio induce un aumento de marcadores de plasticidad sináptica en el hipocampo a través de un mecanismo mediado por BDNF, que aumenta los niveles intracelulares de calcio, Sinapsina I y de CREB (cAMP response element-binding protein) (GomezPinilla et al., 2001; Vaynman et al., 2006). Este hecho marcaría el

comienzo de una serie de investigaciones que buscan diferentes vías que expliquen el aumento de BDNF hipocampal. Ahora bien, esta teoría, aunque es posible y no excluyente de la teoría central, no se ajusta de buena manera a los efectos agudos del ejercicio ya que estos factores liberados por el musculo tardan a veces semanas en elevarse a nivel central.

### **1.5 Vía PGC-1alfa.**

Una de estas vías periféricas propuestas es mediante el aumento de PGC-1 alfa, que es un coactivador transcripcional (Spiegelman, 2007 en Wrann et al., 2013) que conlleva a la elevación de ERR-alfa, que es un receptor nuclear relacionado al estrógeno que funciona como regulador metabólico también llamado NR3B1 (Giguere et al., 1988; Luo et al., 2003 en Wrann et al., 2013). La relación de ERR-alfa con PGC-1alfa es vital ya que promueve en el músculo esquelético la biogénesis mitocondrial, la inducción de angiogénesis y el metabolismo oxidativo. Por su parte Wrann et al. en el 2013 demostró que el aumento de la expresión génica de PGC1alfa conlleva a un aumento de la expresión génica de FDNC5 o Irisina (que es una hormona que posee la capacidad de generar calor, al transformar el tejido adiposo blanco en tejido adiposo pardo, entre otras funciones) a través de la unión ERRalfa/PGC-1alfa, el aumento de expresión génica de FDNC5 produce un aumento específico en el hipocampo de BDNF.

**1.6 Vía del lactato: el lactato como mediador de los efectos del ejercicio en el aprendizaje y la memoria a través de la activación del BDNF hipocampal dependiente de SIRT1.**

Experimentos recientes (El Hayek et al., 2019) muestran que el lactato al aumentar su concentración a nivel periférico durante el ejercicio físico actúa como un metabolizador endógeno que cruza la barrera hematoencefálica y que promueve el aprendizaje y la memoria dependiente del hipocampo. El lactato es liberado a la sangre y tomado por el hígado quien lo convierte nuevamente en piruvato, y posteriormente en glucosa o glucógeno dependiendo de las necesidades celulares. El lactato también cruza la barrera hematoencefálica vía los transportadores de monocarboxilato endotelial y sirve como energía para el cerebro (El Hayek et al, 2019). Pero el mecanismo subyacente ha sido esclarecido un poco más al inyectar lactato de forma intraperitoneal en dosis semejantes a la concentración de lactato observada en el plasma después de realizar actividad física, en donde se observa un aumento en el promotor I de BDNF medido por RT-PCR (real time). Para probar la relación entre este aumento de BDNF en la memoria y el aprendizaje, inyectaron lactato a ratas para luego testear su desempeño en un laberinto de agua de Morris (Morris Water Maze), observándose mejores resultados en la cognición. Adicionalmente la inyección de un inhibidor de los receptores TRKB (uno de los receptores al cual se une el BDNF) evitó la mejora en la memoria observada con la inyección del lactato a solas. Por otro lado, también se ha planteado que la administración periférica (intraperitoneal) de lactato aumenta la expresión de Sirtuina 1 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína en el hipocampo, el aumento de SIRT1 aumentaría los niveles de PGC1alfa, que posteriormente generará la expresión de FNDC5 complementando la vía del BDNF anteriormente expuesta. Pero una de las limitaciones de la teoría periférica y sus múltiples vías de señalización es que no puede explicar el efecto agudo del ejercicio físico que miden cambios en concentración de genes, proteínas o conductas con semanas y hasta meses de diferencia,

no dando explicación a cambios observables en el desempeño de pruebas de memoria con horas de diferencia. Una muestra de esto es Hopkins et al., en el 2011 en donde buscó determinar las diferencias de concentraciones de BDNF entre un grupo de ratas jóvenes versus un grupo de ratas adultas tras el ejercicio físico, en el grupo de ratas adultas las concentraciones de BDNF de las ratas ejercitadas fueron mayores a las de las ratas sedentarias controles después de cuatro semanas tras el ejercicio físico, versus las ratas jóvenes en donde no se encontraron aumentos significativos en las concentraciones de BDNF. Dada la evidencia anterior y que el aumento de la actividad eléctrica de tipo theta hipocampal podría explicar los aumentos cognitivos a corto y largo plazo, mientras que los principales hallazgos de la teoría periférica podrían explicar los efectos a largo plazo, se propone la siguiente hipótesis. **V.**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

### **2. HIPÓTESIS:**

El aumento del poder espectral hipocampal inducido sensorialmente, promueve una mejora de la memoria espacial.

#### **2.1 OBJETIVO GENERAL:**

Determinar si la estimulación visual en rango theta genera oscilaciones hipocampales en este rango y un mejor desempeño en la memoria espacial.

#### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

**OE1-**. Determinar si la estimulación visual (flickering) con luz estroboscópica en una frecuencia de 7 Hz, genera un aumento en la memoria espacial en ratas comparado con la estimulación con luz continua u oscuridad.

**OE2-**. Determinar si la estimulación visual en theta genera cambios en la actividad hipocampal medido como cambios en el poder espectral del LFP hipocampal con un implante crónico bilateral de los sujetos durante la exposición a la luz en theta comparado con la estimulación con luz continua u oscuridad.

**OE3-**. Determinar si la inactivación del Hipocampo mediante inyección local de Bupivacaina, durante la estimulación visual en frecuencia theta, previene un mejor desempeño en la memoria espacial.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **3. Animales.**

Se utilizaron 13 ratas Sprague-Dawley machos adultos (250-350 grs) que fueron alojadas individualmente en jaulas de manutención, con comida regular, agua ad libitum y mantenidas en un ciclo de luz/ oscuridad 12:12 hrs. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el Instituto Nacional de Health (USA) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Publicación NIH No. 80– 23, revisado en 1996) y aprobado por el Comité



Institucional de Bioseguridad y Bioética de Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Protocolo CBA 1187 FMUCH. Todos los esfuerzos se hicieron para minimizar la cantidad de animales utilizados y su sufrimiento.

### **3.1 Grupos experimentales.**

La presente investigación consta de tres experimentos y un tamaño muestral de 13 sujetos. El objetivo del primer experimento es comprobar si la estimulación visual en frecuencia theta genera las mejoras cognitivas que produce el ejercicio físico agudo en la memoria espacial. Con el fin de testear este objetivo se diseñó un experimento con un tamaño muestral de 7 sujetos, en donde se les expuso durante 45 minutos a una de las siguientes tres condiciones: luz estroboscópica en frecuencia theta, luz continua u oscuridad cada cuatro días, una condición diferente por día y el orden de las tres condiciones fue aleatorizado para cada animal. Inmediatamente después se les aplicó una prueba dependiente de Hipocampo para medir el desempeño en la memoria de tipo espacial de los sujetos, la cual se describe posteriormente. El segundo grupo constó de un tamaño muestral de 2 ratas y tuvo la finalidad de determinar cambios en el potencial de campo local o LFP (Local Field Potencial), este registro de LFP se realizó al mismo tiempo en que se desarrolló un protocolo de estimulación visual que incluye las tres condiciones de estimulación visual del primer experimento.

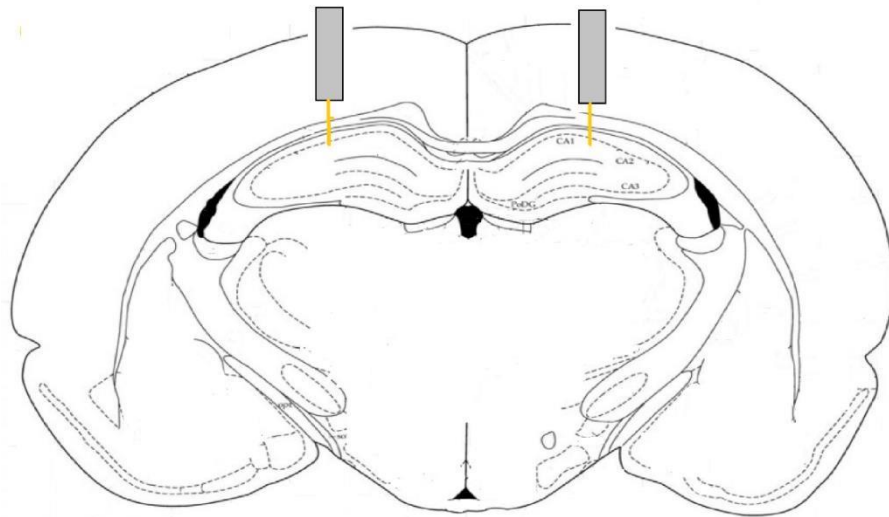
El último grupo experimental consta de 4 ratas, estos animales fueron sometidos a una cirugía estereotáxica para la implantación de cánulas de inyección en la región CA1 del Hipocampo dorsal. Posterior al periodo de recuperación se les inyectó de manera bilateral 0,5  $\mu$ l de Bupivacaina (Laboratorio Sanderson S.A.) al 5% en la región hipocampal al mismo tiempo en

que se les expuso a la luz en frecuencia theta durante 45 minutos y luego se les sometió a la misma prueba de memoria espacial anteriormente señalada, con la finalidad de comprobar si los efectos pro cognitivos observados por la estimulación luminosa se encuentran mediados por cambios en la actividad eléctrica hipocampal.

### **3.2 Cirugía de implante crónico bilateral para registro LFP y bloqueo temporal farmacológico del hipocampo con Bupivacaina.**

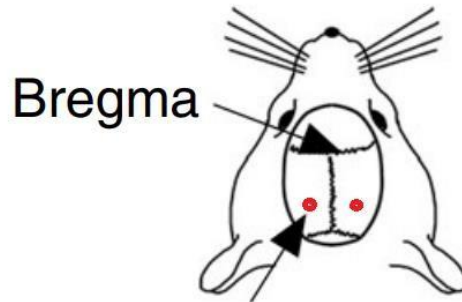
En total 6 ratas fueron sometidas a cirugía estereotáxica, para lo cual los animales fueron anestesiados con isoflurano (2.5% para inducción y 1.5% para mantención en oxígeno con un flujo de 1 L/min) y dispuestos en un aparato estereotáxico. El primer grupo de animales (n=2) para el registro LFP fue implantado con electrodos de acero inoxidable y el segundo grupo con un n=4 con cánulas de inyección con la finalidad de inactivar farmacológicamente la actividad del hipocampo a través de inyecciones de bupivacaina, estas inyecciones se hicieron mediante una cánula de inyección de 33G de acero inoxidable (P1 Technologies, VA, USA) estéril conectada a una jeringa Hamilton de 10 $\mu$ L, ambas cirugías a la altura de CA1 [figura1]. Todas las inyecciones se realizaron bajo anestesia gaseosa. Las cánulas intracerebrales fueron de dos tipos: una cánula guía de 23 G, de 2,5 mm de largo y una cánula de inyección de 33G que posee 1 mm más de longitud que la cánula guía. Las ratas destinadas al registro LFP fueron implantadas en ambos hipocampos con dos electrodos monopolares de acero inoxidable y cubiertos de teflón, de 76.2  $\mu$ m bilateralmente (AM System, WA, USA). Tanto el implante de electrodos como el de cánulas fue fijado al cráneo con tornillos de acero inoxidable y acrílico dental. En el caso de los registros de LFP uno de estos tornillos ubicado sobre el cerebelo fue usado como tierra. Los electrodos y cánulas fueron implantados en cada

hipocampo de acuerdo con las coordenadas del atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson. (Paxinos et al., 1998) específicamente en CA1 dorsal (3,30 mm posterior al bregma, 3.6 .mm lateral y 3.0 mm de profundidad [figura 2]. Posterior a la cirugía y durante 3 días consecutivos se administró el antibiótico Enrofloxacino al 5% (19 mg/Kg i.p.) y el antiinflamatorio Ketoprofeno al 0,4% (2 mg/Kg solución oral). Los animales tuvieron 7 días de recuperación antes de realizar cualquier otro procedimiento experimental.



**Figura 1:** Diagrama de electrodos implantados en el hipocampo a la altura de CA1.

Modificado de Paxinos & Watson 1998.



**Figura 2:** Diagrama del sitio de implantación de cánulas y electrodos bilaterales a la altura de CA1 -3,30 mm AP. Modificado desde Zheng et al., 2020.

### **3.3 Protocolo de estimulación visual y adquisición de datos electrofisiológicos.**

El primer experimento fue de tipo conductual, donde cada rata fue expuesta a tres condiciones en orden aleatorio. La primera condición es estimulación visual en frecuencia theta que consta del ingreso del animal a un cuarto privado de luz natural en plena oscuridad dentro de una jaula transparente de acrílico [figura 3], dentro de esta habitación solo se encontraba expuesta a una luz led estroboscópica de 12W programada para destellar a 7 Hz gracias a un ciclo de apagado y encendido alternado de 143ms, durante 45 minutos. Esta luz se encuentra ubicada inmediatamente fuera de la jaula transparente de acrílico. La segunda condición, tras cuatro días finalizada la condición anterior, fue el ingreso al mismo cuarto, pero ahora la rata es expuesta a una luz continua led blanco de 10W también durante 45 minutos. La tercera condición es el ingreso de todos los sujetos de experimentación al mismo cuarto, pero en plena

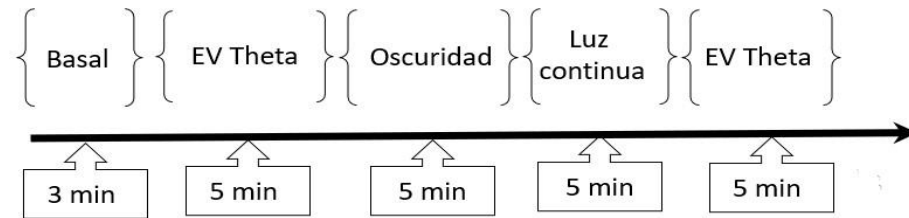
oscuridad como control durante la misma cantidad de tiempo que las otras dos condiciones. Luego de estas intervenciones los animales fueron sometidos a la tarea de memoria espacial.



**Figura 3:** Ejemplo de cilindro aislado de acrílico con exposición directa a la luz estroboscópica (flickering) en frecuencia theta y luz led continua.

En el segundo experimento a otro grupo de animales implantados con electrodos monopolares en el hipocampo se le realizó el registro electrofisiológico correspondiente al objetivo específico n°2, este segundo grupo de ratas fue expuesto a la misma luz led estroboscópica en frecuencia theta, la luz continua blanca y oscuridad al mismo tiempo que se registró el LFP hipocampal con un sistema de registro Cheetah análogo de 32 canales (Neuralynx, Bozeman, MA, USA), y se les aplicó el siguiente protocolo de estimulación visual: 3 minutos de registro basal en donde solo se encuentra la luz artificial encendida de la sala predispuesta para el experimento, luego 5 minutos de la sala en completa oscuridad y sólo encendida la luz estroboscópica en frecuencia theta seguido de la sala en completa oscuridad durante otros 5 minutos, luego se encendió la luz blanca continua de 10W y por último una segunda exposición de 5 minutos a la luz led estroboscópica en frecuencia theta, como se ilustra en la figura 4.

#### Protocolo de estimulación visual para registro LFP



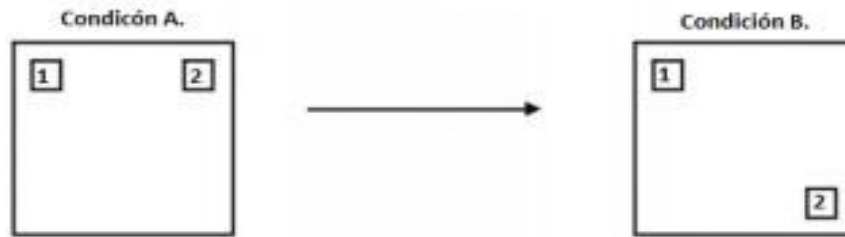
**Figura 4: Protocolo de estimulación visual utilizado para el registro LFP.** Este protocolo consta de las tres condiciones experimentales de estimulación visual en theta, luz led continua y oscuridad, además de un periodo basal de registro sin intervención.

Posteriormente de realizados los registros se construyeron cartas tiempo frecuencia en las condiciones: basal, estimulación con luz en theta, oscuridad y luz continua. Estas cartas tiempo frecuencia fueron diseñadas con el Software Neuroexplorer 4.0 y constan de 5 minutos de registro LFP, las gráficas pertenecen al mismo animal, y a la misma sesión de registro., más detalles en la sección resultados [figura 8]. Posteriormente los registros electrofisiológicos de la señal adquirida tras la aplicación del protocolo de estimulación visual, se les realizó un análisis de densidad de potencia espectral (PSD) con ayuda del Software Neuro Explorer, 4.0. Para este análisis el segmento de registro total en cada una de las condiciones fue dividido en ventanas de 20 segundos cada una y luego se calculó el PSD para cada segmento de registro y se promedió para cada condición, con el objetivo de determinar cambios en cada una de las condiciones en un animal. Adicionalmente se obtuvo el valor de PSD en el rango de frecuencia de 5,5 y 6,5 HZ donde se observó el mayor aumento en PSD del análisis anterior, para cada

segmento de 20 segundos y se promedió en las distintas condiciones, luego se realizó el análisis estadístico correspondiente.

### **3.4 Tarea de reconocimiento espacial de objetos.**

La prueba de reconocimiento espacial de objetos OPR es una prueba de memoria espacial dependiente de hipocampo ampliamente utilizada (Barker et al., 2011; Griffin et al., 2009) para testear índices de reconocimiento de memoria espacial al simplemente desplazar un objeto de su posición inicial. La arena de prueba consiste en una caja de 80x80x80cm. La tarea consta de tres fases: la primera fase es la habituación en donde se expuso a la rata durante tres días por 15 min diarios a la caja sin objetos, la segunda fase es la familiarización del animal o condición "A" \*figura 5] en donde se dispone al animal dentro de la caja con dos objetos iguales en tamaño, forma y color. La rata recorre la caja libremente durante 5 min reconociendo la posición de ambos objetos, luego de 90 min la rata es reingresada a la caja, pero esta se encontrará en la condición "B" dando comienzo a la tercera fase o etapa experimental en donde se desplazará el segundo objeto, la rata recorre libremente durante otros 5 min. El tiempo de exploración del objeto ubicado en una nueva posición con respecto al tiempo total de exploración de ambos objetos se usó como indicador de memoria espacial. Todo el comportamiento de los animales fue grabado con una cámara de video en posición cenital y los videos analizados con una rutina de MATLAB (Mathworks, Inc.).



**Figura 5: Diagrama de la tarea de reconocimiento espacial de objetos.** En la condición A se observan dos objetos “1 y 2” en horizontal; en la condición B “1 y 2” se encuentran en diagonal representando un cambio de posición. El tiempo de exploración del objeto que cambio de posición respecto a la exploración total de los objetos es utilizado como indicador de memoria espacial. Modificado de Barker y Warburton, 2011.

### 3.5 Perfusión de animales.

Una vez finalizados los experimentos, las ratas que fueron implantadas con electrodos fueron anestesiadas con isoflurano al 3% en oxígeno y con un flujo de 1 L/min y se les realizó una lesión electrolítica en cada electrodo de registro pasando 5uA de corriente por 10 segundos con respecto a la cola del animal como referencia, con el fin de determinar la posición de los electrodos de registro en el tejido cerebral. Posteriormente a los tres días de la lesión las ratas fueron nuevamente anestesiadas y perfundidas transcárdialmente con 300 ml de solución salina (0.9% NaCl) y 350 ml de solución de fijación, para formaldehído al 4% en buffer fosfato (PB 0.1 M pH 7.4). Posteriormente el cerebro fue removido y post-fijado por 2 horas en la misma solución de fijación y crío preservado en una solución de sacarosa al 30% y azida de sodio al 0.02% en PBS 0.1 M. A los 2 días los cerebros fueron cortados en el plano coronal en secciones de 50  $\mu$ m con un micrótopo de congelación. Los cortes fueron sometidos a una tinción de Nissl y luego montados para verificar la posición de los electrodos, mediante un microscopio de luz transmitida. Las ratas implantadas con cánulas solo fueron perfundidas sin



lesiones electrolíticas ya que la cánula de inyección deja un daño mecánico evidente que permite localizar su posición, todo el resto de los procedimientos histológicos para estos animales es equivalente a lo anteriormente descrito.

### **3.6 Tinción de Nissl.**

Los cortes de cerebro fueron montados en portaobjetos gelatinizados, dejándose secar por 3 días mantenidos en un lugar fresco a temperatura ambiente y cubiertos para evitar cualquier contacto que deteriore la integridad del tejido. Fueron deshidratados y rehidratados mediante inmersión por 3 minutos en: etanol 70%, 95% y 100%, xilol, alcohol 100%, 95% y 70%, 5 min en agua destilada y 20 min en solución de Cressil Violeta. Posteriormente los cortes fueron inmersos en cloroformo por 30 segundos, seguido nuevamente de las siguientes soluciones por 3 minutos cada una: etanol 95%, 2 veces en etanol 100% y 2 veces en xilol. Por último, los cortes fueron cubiertos con un cubreobjetos y sellados con una solución de montaje (entellan) para su posterior observación al microscopio para la verificación de la posición de los electrodos y cánulas.

### **3.7 Estadística.**

Para la tarea de reconocimiento espacial del grupo experimental correspondiente al objetivo específico n°1 los resultados se evaluaron estadísticamente mediante un ANOVA de rangos (Kruskall Wallis) de una vía seguido por una prueba posts hoc Tukey Test. Se realizó además la prueba de comparaciones múltiples One Sample t-test para determinar diferencias con respecto al azar con un índice igual a 0,5. Para el grupo correlativo al objetivo específico n°3 se utilizó un T-test a través del mismo programa comparando la condición Bupivacaina versus la

condición salino y un One Sample T-test también para determinar diferencias respecto al azar con un índice igual a 0,5. El análisis de diferencias de PSD en las distintas condiciones de estimulación lumínica fueron realizado con un ANOVA de Rangos, Kruskall Wallis seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunn. Estos análisis fueron realizados con el programa Sigma Plot versión 12.0. Todos los registros electrofisiológicos fueron analizados con Neuro Explorer 4.0 y a través de rutinas de MATLAB (Mathworks, Inc).

## **VII. RESULTADOS.**

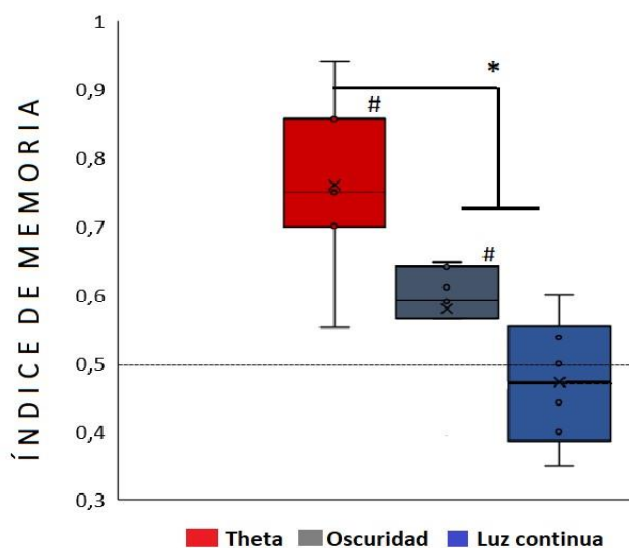
Tras la realización de todos los procedimientos experimentales y el análisis de los datos recolectados los resultados de cada experimento se presentan a continuación en el orden correlativo al objetivo específico correspondiente:

### **4. Resultados del objetivo específico N°1: La estimulación con luz en frecuencia theta mejora el rendimiento de la memoria espacial.**

Tras la realización de OE1 que consiste en la estimulación visual a cada sujeto en las tres condiciones experimentales (luz en frecuencia theta, luz continua y oscuridad) en diferentes días durante 45 minutos en una sala ambientada sin luz natural, seguido la aplicación de una prueba de reconocimiento de objetos para medir cambios en la memoria espacial, se observan los siguientes resultados:

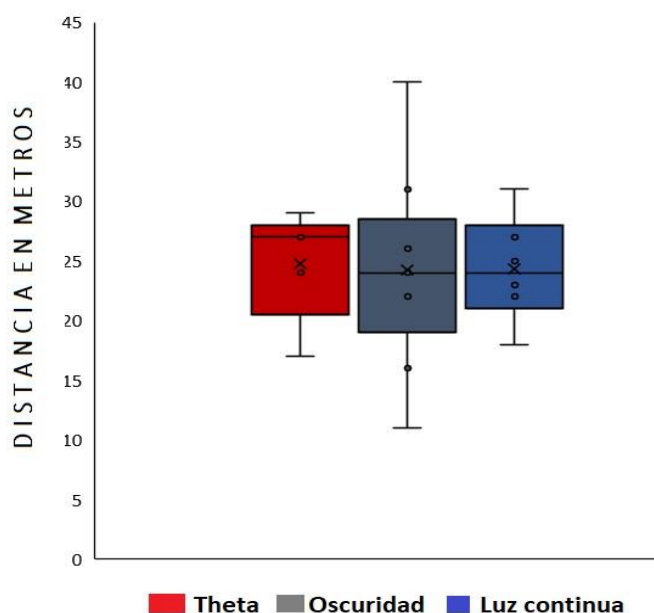
Como se observa en la figura 6, las diferencias en el desempeño en la memoria espacial entre la condición experimental (luz en frecuencia theta versus luz continua y oscuridad) fueron

significativas: entre la estimulación en theta versus ambas condiciones control: One Way ANOVA;  $p=0,002$ , seguido por el post hoc test de comparaciones múltiples de Tukey: Theta v/s luz continua:  $p=0,001$ , Theta v/s oscuridad:  $p=0,029$  ( $n=7$ ). Estos resultados a su vez fueron diferentes a lo esperado por azar (señalizado por la línea punteada en 0.5), indicando que los sujetos estimulados con luz en frecuencia theta y oscuridad fueron capaces de aprender durante la tarea,  $\# = p < 0,050$ ; One sample t-test para luz en frecuencia Theta  $p=0,017$  y Oscuridad  $p=0,048$ , respecto a la condición luz continua. En síntesis, la estimulación visual en frecuencia theta genera efectos pro cognitivos en la memoria espacial, similares a los previamente descritos por el ejercicio físico agudo.



**Figura 6: Índice de memoria en la tarea OPR luego de las distintas intervenciones con luz.** Se puede apreciar un aumento significativo en el índice de memoria espacial en la condición Theta (rojo) respecto a las otras condiciones experimentales, oscuridad en gris y luz continua en azul. One Way ANOVA\*= $p < 0,050$ ; One sample t-test  $\# = p < 0,050$ .

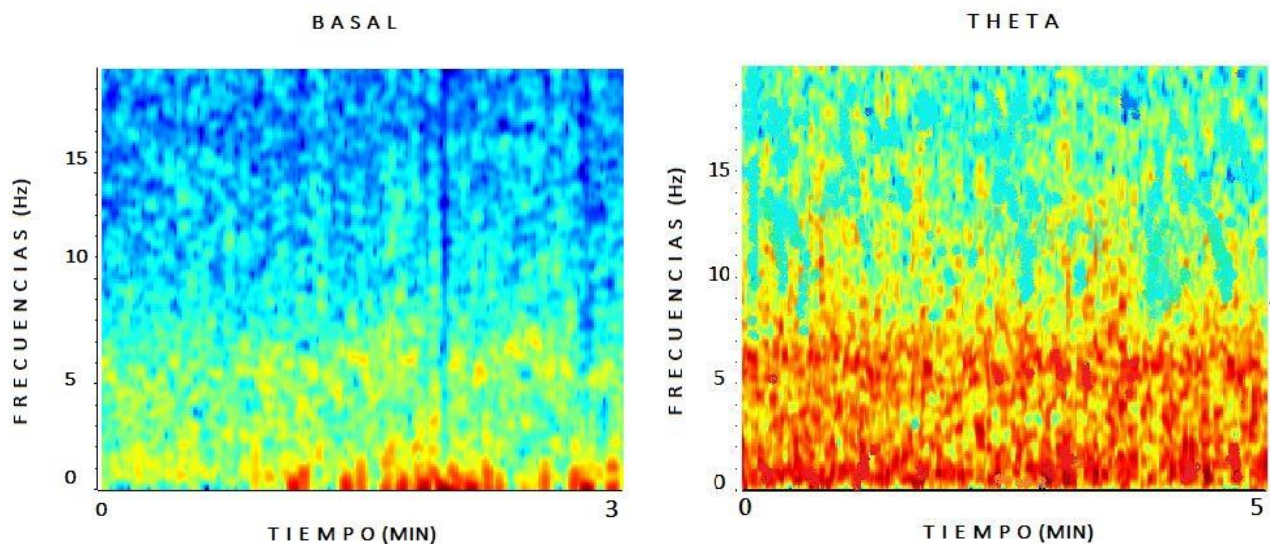
Con el fin de descartar que las diferencias en los índices de memoria se deban a dificultades motoras o ausencia de movimiento, a continuación, se evaluó las diferencias entre las distancias recorridas por todos los animales en las tres condiciones experimentales del OE1. Las diferencias en las distancias recorridas en metros por los sujetos de experimentación no fueron significativas en las tres condiciones experimentales: One Way ANOVA;  $p = 0,982$ , ( $n=7$ ), como se observa en la figura 7. Descartando así alteraciones en la movilidad de los animales debido a las condiciones experimentales, que pudiesen alterar los resultados en las pruebas de memoria.

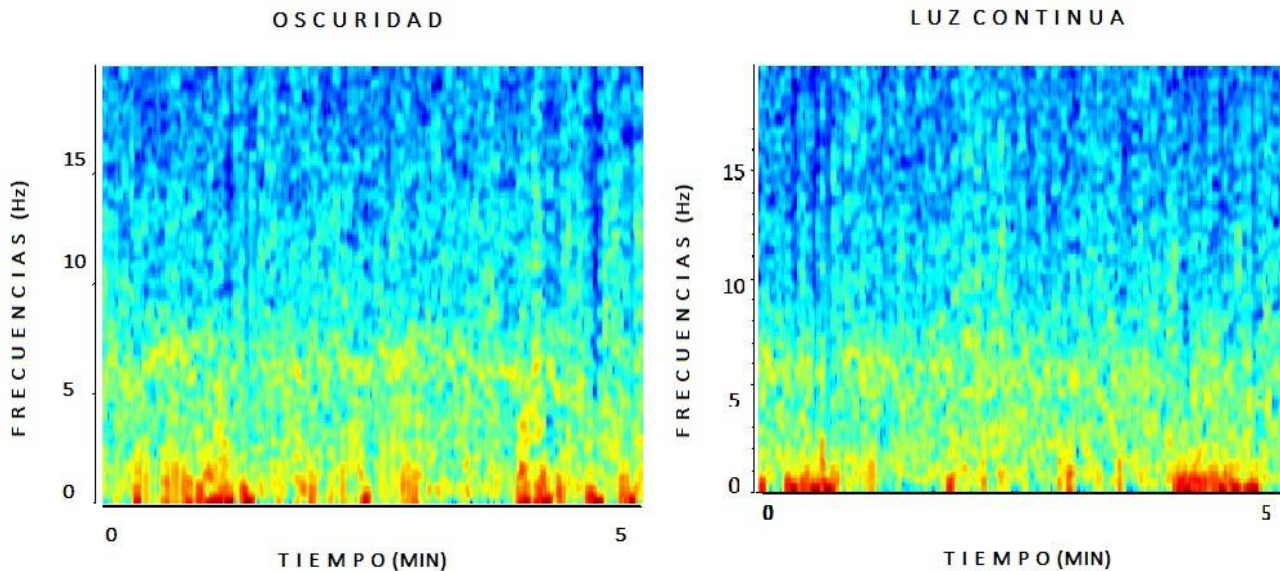


**Figura 7: Distancias recorridas en metros, durante la tarea OPR en los distintos grupos experimentales.** Las diferencias en las distancias recorridas por los animales en las tres condiciones experimentales; en rojo la condición luz en frecuencia theta, en gris la condición oscuridad y en azul los animales sometidos a la condición luz continua. One Way ANOVA;  $p = 0,982$ .

**5. Resultados del objetivo específico N°2: La estimulación lumínica induce un aumento de potencia en la actividad theta hipocampal.**

Respecto al OE2 que consistía en determinar si la estimulación visual en theta genera cambios en la actividad hipocampal medido como cambios en la potencia espectral del LFP hipocampal de los sujetos durante la exposición a las tres condiciones (estimulación visual con luz en 7Hz, luz continua u oscuridad), se observan cambios significativos en el poder espectral de theta en el Hipocampo. Para este experimento se utilizó el registro de un solo animal ya que el registro LFP del segundo sujeto experimental no cumplió con la adecuada implementación del protocolo de estimulación visual. Se muestra a continuación 4 cartas tiempo frecuencia del registro de la señal adquirida en las siguientes condiciones [figura 8]: basal, estimulación visual en frecuencia theta, oscuridad y luz directa a modo de ejemplificación del aumento del poder en la banda theta encontrado:





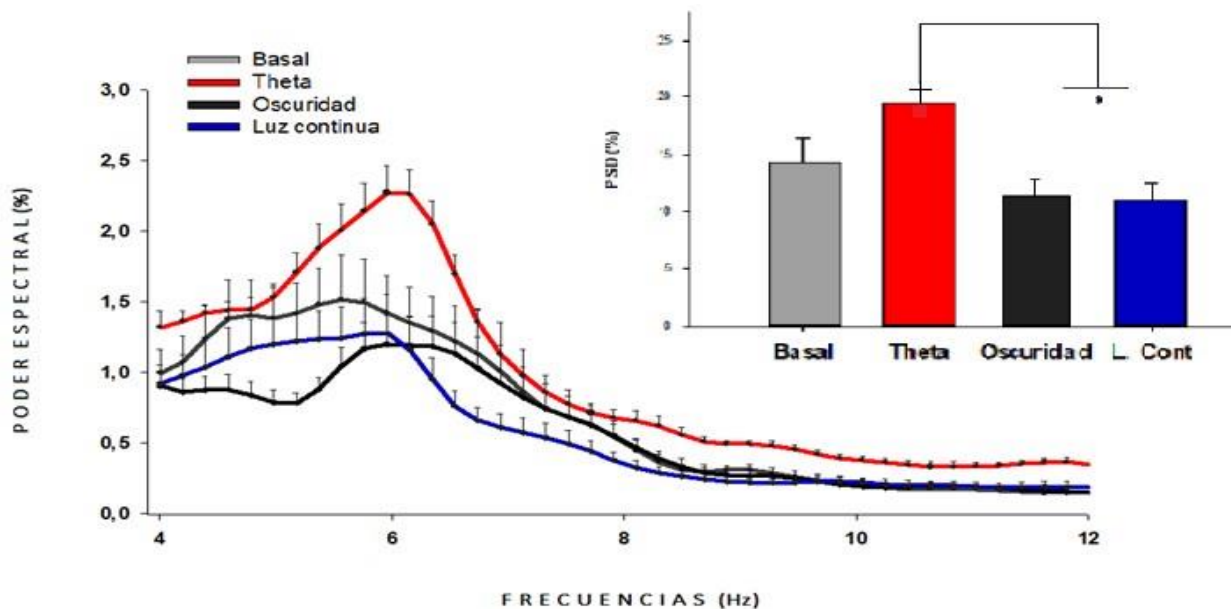
**Figura 8: Cartas tiempo frecuencia en las 4 condiciones del protocolo de estimulación visual.** Se muestran 4 cartas tiempo frecuencia de 5 minutos de duración, exceptuando la condición basal de 3 minutos [ver fig.4] entre las frecuencias 0 a 15 Hz del registro LFP. Se observa en la condición theta un aumento de la potencia alrededor de los 6 Hz.

En la figura 8, el animal estimulado con una luz estroboscópica fijada en 7 Hz muestra un notorio aumento en la potencia de la actividad theta hipocampal. También se observa un aumento en bandas de frecuencias más baja, probablemente delta, que no fueron analizadas en este trabajo pero que sería interesante de estudiar en futuros análisis. Este incremento en theta no fue observado en la condición oscuridad o en la condición de luz continua.

Posteriormente los registros electrofisiológicos de la señal adquirida tras la aplicación del protocolo de estimulación visual como se describió en la figura 4, se les realizó un análisis de

densidad de potencia espectral y los resultados se muestran en la figura 9, donde se puede observar cambios en el Power Spectral Density (PSD) de al menos el doble de la potencia observada en la condición basal (en gris) comparado con luz continua (en azul) o de oscuridad (en negro).

Para el análisis de la figura 9 se fragmentó el periodo de 3 minutos (basal) o 5 minutos (Theta/Oscuridad/ Luz continua) en segmentos de 20 segundos y se calculó el PSD para cada uno de esos segmentos. El PSD fue normalizado como porcentaje del poder total entre 0 y 50 Hz, con 256 valores de frecuencia y con un suavizado Gaussiano. Los datos son presentados como la media más menos el error estándar, donde se observa un importante incremento alrededor de 6 Hz en la condición de estimulación con luz en frecuencia theta. Subsecuentemente se realizó un análisis estadístico considerando la sumatoria del PSD entre las frecuencias 5,5 y 6,5 Hz de cada segmento de 20 segundos analizados en cada condición y se encontraron diferencias significativas entre el grupo estimulado en theta respecto a las condiciones luz continua y oscuridad, Kruskal Wallis One Way ANOVA;  $p=0,03$ , seguido por el post hoc test de comparaciones múltiples de Dunn, \*,  $p<0,05$ . Pero no se encontraron diferencias entre la condición de estimulación visual en theta y la condición basal. Respecto a este resultado y aun cuando corresponde al experimento realizado en un animal, se puede concluir que el poder espectral en la condición de estimulación visual en frecuencia Theta aumenta en al menos el doble del PSD en el rango de los 6 Hz comparado con las otras condiciones, sugiriendo así que la estimulación visual en frecuencia theta permite un aumento del poder espectral en el hipocampo de la rata.

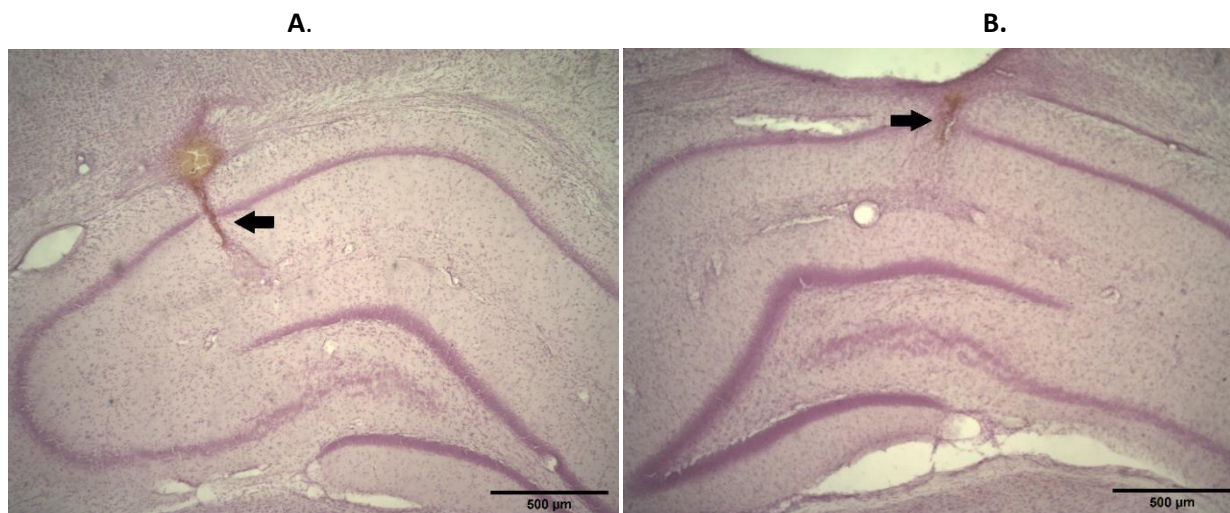


**Figura 9: Power Spectral Density (PSD) entre las frecuencias 2 y 14 Hz en las cuatro condiciones del protocolo de estimulación visual: basal, luz continua, oscuridad y luz en frecuencia theta en donde se observa un aumento en el poder en la condición Theta. Adicionalmente se realizó un análisis de la frecuencia promedio del PSD entre las frecuencias 5,5 y 6,5 Hz (Inserto a la derecha) donde se muestra un aumento estadísticamente significativo en la potencia de esta banda entre las condiciones theta y las otras restantes; Kruskal Wallis One Way ANOVA;  $p < 0,05$ ; seguido por Post Hoc Dunn's Method;  $*p < 0,005$ ; Theta v/s Luz continua y Theta v/s Oscuridad.**

### 5.1 Confirmación histológica de electrodos:

La verificación de la posición de los electrodos se realizó con una tinción de Nissl, los cortes fueron observados bajo microscopio con el fin de corroborar que los electrodos de registro fueron colocados en la región de CA1 para registrar correctamente al animal durante las condiciones del protocolo de estimulación visual. Se observa en la figura 10 a la izquierda en A una marca de lesión electrolítica a la altura de CA1 (-3,6 0 mm anteroposterior) y también en el hemisferio derecho figura 10 B (a la derecha) realizada en el animal una vez finalizada la aplicación de las condiciones experimentales.





**Figura 10:** Tinción de Nissl para una sección coronal de hipocampo. La flecha negra en ambas imágenes indica una lesión electrolítica a la altura de los electrodos implantados. Microfotografía izquierda “A” y “B” a la derecha correspondiente a los hemisferios hipocampales izquierdos y derechos respectivamente.

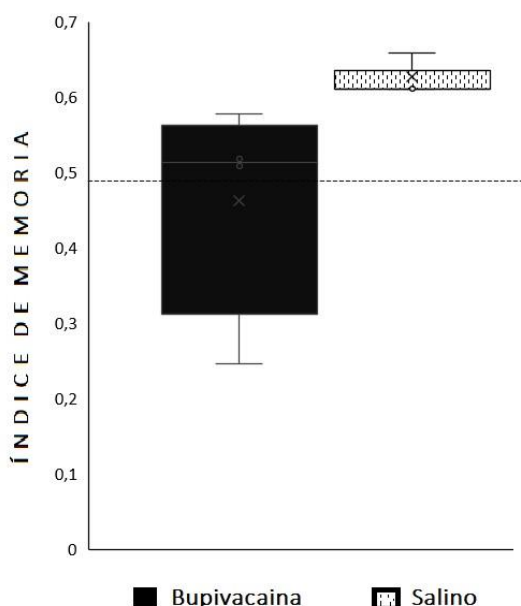
### **6. Resultados del objetivo específico N°3: La inactivación farmacológica con Bupivacaina no elimina el efecto positivo de la estimulación lumínica.**

El objetivo específico número tres propuso determinar si la inactivación del Hipocampo mediante una inyección local de Bupivacaina, durante la estimulación visual en frecuencia theta previene el aumento en la memoria espacial. Para este propósito 4 ratas fueron implantadas con cánulas de inyección en la región dorsal de CA1 y se inyectó 0,5 µl de Bupivacaina al 5 %, con el fin de bloquear reversiblemente la actividad eléctrica de la región hipocampal, inducida por la exposición a la luz estroboscópica en theta durante 45 minutos. Inmediatamente después se realizó la prueba de memoria espacial, para comprobar la

relevancia de la actividad eléctrica del hipocampo durante la estimulación visual en la génesis de las mejoras en la memoria espacial previamente descritas en el primer objetivo de esta tesis.

En la figura 11 se evidencia que no existen diferencias significativas entre los sujetos con Bupivacaina y los tratados con salino (t-test,  $p=0,203$  con un  $n= 4$ ).

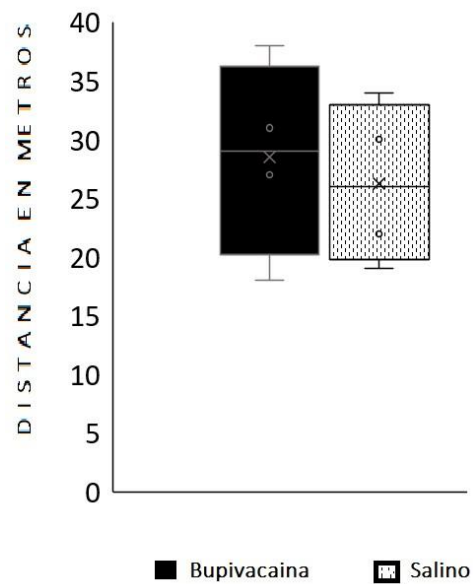
Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela debido a que el número de sujetos es bajo.



**Figura 11: Índice de memoria espacial posterior a la inyección de Bupivacaina o Salino durante la estimulación visual.** Se evidencia que no existen diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, t -test  $p=0,203$  con un  $n= 4$ . Adicionalmente la comparación de los índices de memoria respecto al nivel de azar (línea punteada) muestran que no hubo una diferencia significativa en el índice de memoria respecto al azar en ambos grupos, One Sample T test;  $p = 0,649$  en la condición Bupivacaina y  $p = 0,144$  para la condición Salino.

Probablemente al aumentarse el tamaño de la muestra pudiesen ser más concluyentes. Del mismo modo las diferencias de estos resultados respecto al azar, es decir un índice de memoria igual a 0,5 no indican diferencias respecto al azar; one sample t test: condición Bupivacaina:  $p=0,649$  y la condición Salino:  $p=0,144$ .

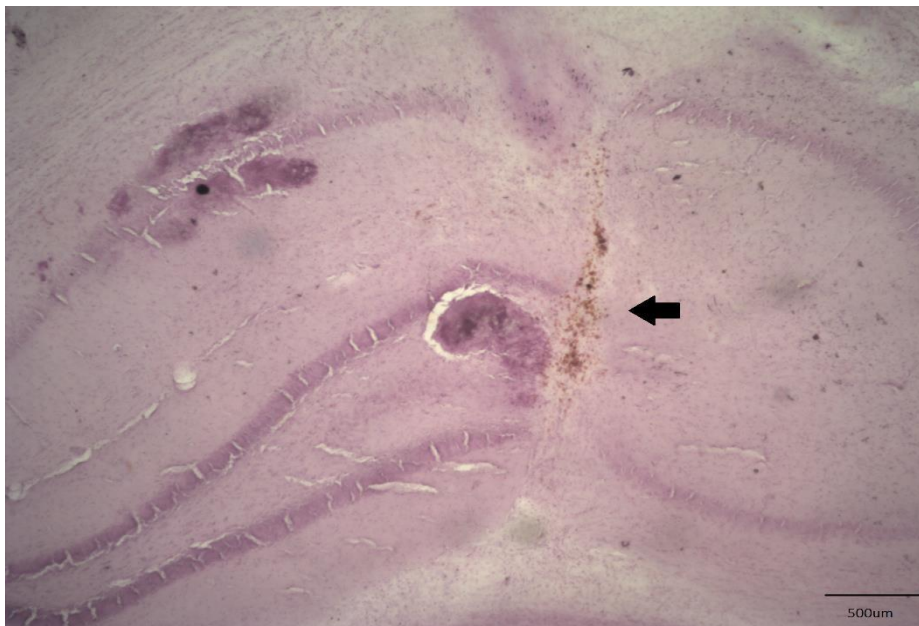
Al igual que el experimento anterior se evaluaron las distancias recorridas en metros de los sujetos experimentales en las condiciones Bupivacaina versus la condición salino para descartar cualquier problema motor o falta de exploración [figura 12] y no se muestran diferencias significativas, t-test,  $p=0,693$  con un  $n=4$ . Descartando así cambios en el movimiento de los animales debido a las condiciones experimentales que pudiesen afectar los resultados observados.



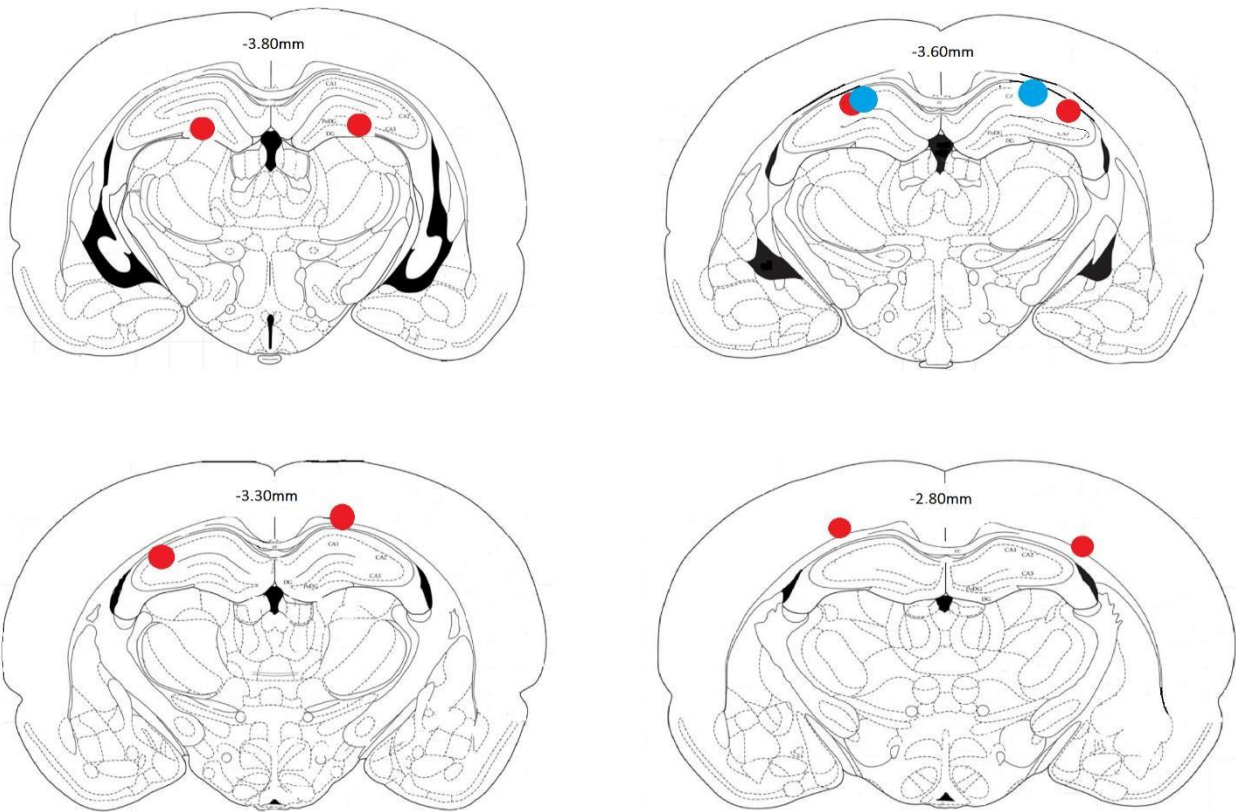
**Figura 12: Distancias recorridas durante la tarea de memoria espacial en los sujetos inyectados con Bupivacaina v/s Salino.** Se muestran los resultados de las distancias recorridas en metros de los sujetos cumpliendo el OE3 en la prueba de reconocimiento espacial y no se encontraron diferencias significativas, t-test;  $p=0,693$ .

### 4.3 Confirmación histológica de cánulas y electrodos:

Se realizó una tinción de Nissl en todos los cortes de los cerebros utilizados en OE3 (implante de cánula); coordenadas -3.30 mm AP, 3.60 mm hacia lateral, -3.00mm hacia ventral. Se realizó una reconstrucción de los sitios de posición de las cánulas y electrodos implantados a la altura del Hipocampo y la lesión que dejó su paso por el hipocampo en todos los sujetos de experimentación implantados con cánulas en puntos rojos (n=4) y en azul el sujeto implantado con electrodos (n=1).



**Figura 13:** Tinción de Nissl para una sección coronal de hipocampo. La flecha negra marca la lesión que dejó el implante de cánula en un sujeto utilizado en el OE3.



**Figura 14: Reconstrucción de la posición de las cánulas y electrodos:** Se grafica la posición verificada de las cánulas y electrodos tras la tinción de Nissl, en puntos rojos se ejemplifica las coordenadas de las cánulas en los 4 animales utilizados en el OE3 y en puntos azules los electrodos utilizados por el sujeto en el OE2. Modificado desde Paxinos & Watson 1998.

Al corroborar la posición de las cánulas se encontró que al menos dos animales fueron implantados fuera de la región hipocampal uno a la altura del giro dentado en -3.80mm anteroposterior y otro en cuerpo calloso a -2.80mm anteroposterior. Si bien el hipocampo es una región amplia y la gota de Bupivacaina pudo alcanzar parcialmente la zona esperada esto podría explicar el porqué del no encontrar diferencias significativas en el OE3 y la mayor variabilidad de los datos de este grupo.

## VIII. DISCUSIÓN.

Estos hallazgos demuestran que la estimulación visual en frecuencia theta puede afectar positivamente la memoria espacial de manera similar a los efectos procognitivos que produce la actividad física aguda como ha sido descrito previamente (Coles et al., 2008, & Chang et al., 2012), esto se evidencia principalmente en los aumentos en el índice de memoria espacial que muestran los sujetos experimentales en la condición de estimulación con luz en la frecuencia theta versus las condiciones de oscuridad y luz continua. La memoria medida en este experimento es memoria de tipo espacial categorizada como de largo plazo pero de formación reciente, esto se asemeja a los resultados de varios experimentos que logran generar mejoras cognitivas en diferentes tipos de memorias dependientes de hipocampo con estimulación visual en theta (Koster et al., 2017) y estimulación visual en frecuencia gamma (Martorell et al., 2019; Zheng et al., 2020; Laccarino et al., 2016) y homologable al experimento de Coles et al., 2008 en humanos en donde a los sujetos expuestos a una sesión de ejercicio físico agudo obtienen mejores resultados en una prueba de memoria declarativa versus a los que solo descansaron antes de la realización de la prueba. Esta investigación da cuenta de que estas mejoras cognitivas descritas tras la realización de ejercicio físico agudo son semejantes a las obtenidas por la estimulación visual en frecuencia theta. Uno de los principales hallazgos es el aumento del PSD en frecuencia theta en el hipocampo ya que podría explicar las mejoras en el desempeño cognitivo. Esta investigación es la primera que explora una relación funcional entre los cambios en el PSD producidos por estimulación visual en frecuencia theta y las mejoras en la memoria espacial,

pero no bastan para responder de manera tajante al problema de investigación, ya que es necesario indagar cómo este aumento de actividad eléctrica se involucra en los cambios en neuro plasticidad que generarían estos efectos procognitivos en la memoria espacial. Son necesarias futuras investigaciones que permitan observar el fenómeno compatibilizando una mirada desde los cambios en la actividad eléctrica con los cambios a niveles de plasticidad como la potenciación a corto plazo y largo plazo además de cambios en los niveles de factores tróficos tales como BDNF hipocampal, en específico sería de interés la interacción entre CA3 y CA1 al momento de ser estimuladas con frecuencia theta ya que al ser estimuladas visualmente en frecuencia gamma se encuentra un aumento en neuro plasticidad como lo descrito anteriormente en el punto 1.2 (Zheng et al., 2020).

Debido a que en la literatura descrita las principales mejoras cognitivas se observan en el dominio de las funciones ejecutivas, una de las interrogantes para futuras investigaciones es dilucidar cual es la implicancia de la estimulación visual en frecuencia theta en otras regiones cerebrales tales como la corteza prefrontal. Sin embargo, esta investigación sugiere que parte de las mejoras producidas por el ejercicio físico agudo en la memoria espacial podrían estar determinadas por un aumento en el PSD hipocampal de tipo theta inducido por la estimulación sensorial que el propio movimiento genera en nuestros hipocampos (Kuo et al., 2011). Estos datos muestran que el aumento en theta inducido por luz podría ser relevantes en la mejora cognitiva, ya que el bloqueo de la actividad eléctrica hipocampal reduce la mejora cognitiva inducida por la luz en frecuencia theta, sin embargo, esta afirmación es aún prematura y se requiere de un aumento del tamaño de la muestra, en los experimentos de

manipulación farmacológica con Bupivacaina. Será importante también determinar a futuro si este tipo de estimulaciones en frecuencia theta sostenida en el tiempo de forma crónica, generan cambios en las habilidades cognitivas a largo plazo similar a los efectos del ejercicio crónico similar a lo que ocurre de manera crónica en frecuencia gamma (Laccarino et al., 2016; Martorell et al., 2019, Zheng et al., 2020).

Una proyección importante de esta investigación es entender qué aspectos del ejercicio físico pudiesen ser primordiales en las mejoras cognitivas, dado que el ejercicio es una actividad compleja que contempla un aumento de la estimulación sensorial en múltiples dimensiones (visual, vestibular, propioceptiva, etc.), junto a aumentos en el estado de arousal, cambios metabólicos y de señales periféricas que pueden explicar el aumento cognitivo (Grinspun et al., 2019). Estos modelos no invasivos como lo es la estimulación visual podrían ser útiles en modelos humanos, en donde personas que se encuentran en situación de restricción de movimientos podrían obtener los beneficios del ejercicio físico sin tener que realizarlo, como lo son los pacientes con demencia, y enfermedades neurodegenerativas, o dificultades motoras, si no también expandir e indagar si la estimulación visual puede alterar o generar cambios en los estados de ánimo, pudiendo ser a futuro una línea de tratamiento y/o prevención para trastornos del ánimo y neuropsiquiátricos severos como los brotes tempranos de psicosis o esquizofrenia ya que presentan una fuerte relación con deficiencias en las memorias de tipo declarativas (Rebolleda Gil, 2020).



## **IX. CONCLUSIÓN.**

En síntesis, esta investigación es la primera en proponer que un aumento en la estimulación sensorial puede provocar un aumento de la actividad eléctrica hipocampal en una frecuencia particular y generar mejoras cognitivas importantes. También sugiere que el aumento de actividad eléctrica hipocampal inducido por esta estimulación sensorial podría ser parte de la explicación de como el ejercicio promueve aumentos cognitivos sea este necesario o suficiente. Estimular visualmente en frecuencia theta antes de la adquisición de una memoria de tipo espacial sí genera los efectos pro cognitivos en esta memoria similar a lo observado con ejercicio. Por consecuencia sería posible emular en parte y de manera efectiva los efectos positivos del ejercicio físico. Por último, esta investigación presenta una base para mejorar o conservar el desempeño cognitivo en pacientes restringidos o impedidos de realizar actividad física.

## X. Referencias.

Baez, M. V., Cercato, M. C., & Jerusalinsky, D. A. (2018). NMDA Receptor Subunits Change after Synaptic Plasticity Induction and Learning and Memory Acquisition. *Neural Plasticity*, 2018, 1–11.

Barker, G.R. y Warburton, E.C., When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? *J Neurosci*, 2011. 31: p. 10721-10731.

Barrionuevo G, Schottler F, Lynch G. The effects of repetitive low frequency stimulation on control anapotentiated synaptic responses in the hippocampus. *Life Sci*. 1980; 27(24):2385-2391.

Basso, J. C., & Suzuki, W. A. (2017). The Effects of Acute Exercise on Mood, Cognition, Neurophysiology, and Neurochemical Pathways: A Review. *Brain Plasticity*, 2(2), 127–152.

Berchtold, N. C., Castello, N., & Cotman, C. W. (2010). Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*, 167(3), 588–597.

Berger, T. W., Song, D., Chan, R. H. M., Marmarelis, V. Z., LaCoss, J., Wills, J., ... Granacki, J. J. (2012). A Hippocampal Cognitive Prosthesis: Multi-Input, MultiOutput Nonlinear Modeling and VLSI Implementation. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 20(2), 198– 211.

Berry SD, Thompson RF. Prediction of learning rate from the hippocampal electroencephalogram. *Science*. 1978; 200:1298–1300.

Bustamante, T. (2019). Evaluación de Neosaxitoxina como fármaco antiepiléptico en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal. Tesis de Magister en Fisiología. Universidad de Chile.

Nature Neuroscience. Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation, and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, 16(2), 130–138.

Chang, Y. K., Labban, J. D., Gapin, J. I., & Etnier, J. L. (2012). The effects of acute exercise on cognitive performance: A meta-analysis. *Brain Research*, 1453, 87–101.

Coles, K., & Tomporowski, P. D. (2008). Effects of acute exercise on executive processing, short-term and long-term memory. *Journal of Sports Sciences*, 26(3), 333–344.

Colgin, L. L. (2016). *Rhythms of the hippocampal network*. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(4), 239–249.

Da Silveira, C. K. B., Furini, C. R. G., Benetti, F., Monteiro, S. da C., & Izquierdo, I. (2013). The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 103, 64–71.

Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC. Excitationneurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron*. 2004; 42(4):535-552.

De Oliveira Bristot, V. J., de Bem Alves, A. C., Cardoso, L. R., da Luz Scheffer, D., & Aguiar, A. S. (2019). The Role of PGC-1 $\alpha$ /UCP2 Signaling in the Beneficial Effects of Physical Exercise on the Brain. *Frontiers in Neuroscience*, 13.

El Hayek, L., Khalifeh, M., Zibara, V., Abi Assaad, R., Emmanuel, N., Karnib, N., ... Sleiman, S. F. (2019). Lactate mediates the effects of exercise on learning and memory through SIRT1-dependent activation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *The Journal of Neuroscience*, 1661–18.

Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal longterm synaptic plasticity. *Nature*. 1999; 399(6731):66-70.

Ferris, L. T., Williams, J. S., & Shen, C.-L. (2007). The Effect of Acute Exercise on Serum BrainDerived Neurotrophic Factor Levels and Cognitive Function. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 39(4), 728–734.

Griffin, É. W., Bechara, R. G., Birch, A. M., & Kelly, Á. M. (2009). Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: Evidence for a BDNF-related mechanism. *Hippocampus*, 19(10), 973–980.

Grinspun, N., Fuentealba, Y., Falcon, R., & Valdés, J. L. (2019). c-Fos expression in the ascending arousal system induced by physical exercise in rats: Implication for memory performance. *Brain Research*, 146376.

Goyal, A., Miller, J., Watrous, A. J., Lee, S. A., Coffey, T., Sperling, M. R., ... Jacobs, J. (2018). Electrical Stimulation in Hippocampus and Entorhinal Cortex Impairs Spatial and Temporal Memory. *The Journal of Neuroscience*, 38(19), 4471–4481.

Guo W, Ji Y, Wang S, Sun Y, Lu B. Neuronal activity alters BDNF-TrkB signaling kinetics and downstream functions. *J Cell Sci*. 2014; 127(Pt 10): 2249-2260.

Hopkins, M. E., Nitecki, R., & Bucci, D. J. (2011). Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, 194, 84–94.

Hötting, K., Schickert, N., Kaiser, J., Röder, B., & Schmidt-Kassow, M. (2016). The Effects of Acute Physical Exercise on Memory, Peripheral BDNF, and Cortisol in Young Adults. *Neural Plasticity*, 2016, 1–12.

Jacobs, J., Miller, J., Lee, S. A., Coffey, T., Watrous, A. J., Sperling, M. R., ... Rizzuto, D. S. (2016). Direct Electrical Stimulation of the Human Entorhinal Region and Hippocampus Impairs Memory. *Neuron*, 92(5), 983–990.

Jun, S., Kim, J. S., & Chung, C. K. (2019). Direct Stimulation of Human Hippocampus During Verbal Associative Encoding Enhances Subsequent Memory Recollection. *Frontiers in Human Neuroscience*, 13.

Köster, M., Martens, U., & Gruber, T. (2018). Memory entrainment by visually evoked thetagamma coupling. *NeuroImage*.

Kowiaoski, P., Lietzau, G., Czuba, E., Wańkow, M., Steliga, A., & Moryś, J. (2017). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(3), 579–593.

Kuo, T.B. J., Li, J.-Y., Chen, C.-Y., & Yang, C. C. H. (2011). Changes in hippocampal theta activity during initiation and maintenance of running in the rat. *Neuroscience*, 194, 27–35.

Labban J.D., and Etnier J.L., "Effects of acute exercise on longterm memory," *Research Quarterly for Exercise and Sport*, vol. 82, no. 4, pp. 712–721, 2011.

Lacoste B, Gu C. Control of cerebrovascular patterning by neural activity during postnatal development. *Mech Dev*. 2015; 138(Pt 1):43-49.

Landfield PW, McGaugh JL, Tusa RJ. Theta rhythm: a temporal correlate of memory storage processes in the rat. *Science*. 1972; 175:87–89.

Manzur, H. E., Alvarez, J., Babul, C., & Maldonado, P. E. (2012). Synchronization Across Sensory Cortical Areas by Electrical Microstimulation is Sufficient for Behavioral Discrimination. *Cerebral Cortex*, 23(12), 2976–2986.

Mike X Cohen. (2014) *Issues in clinical and cognitive neuropsychology*.

Naylor, R. L., Robertson, A. G., Allen, S. J., Sessions, R. B., Clarke, A. R., Mason, G. G., ... Dawbarn, D. (2002). A Discrete Domain of the Human TrkB Receptor Defines the Binding Sites for BDNF and NT-4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(3), 501–507.

Paxinos, G. y Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 1998, San Diego: Academic Press.

Lisman, J. (2010). Working Memory: The Importance of Theta and Gamma Oscillations. *Current Biology*, 20(11), R490–R492.

Ramirez, S., Liu, X., Lin, P.-A., Suh, J., Pignatelli, M., Redondo, R. L., ... Tonegawa, S. (2013). Creating a False Memory in the Hippocampus. *Science*, 341(6144), 387–391.

Rebolleda, C. (2020). Neurocognición, cognición social y metacognición en psicosis. Pirámide.

Robbe, D., & Buzsáki, G. (2009). Alteration of Theta Timescale Dynamics of Hippocampal Place Cells by a Cannabinoid Is Associated with Memory Impairment. *Journal of Neuroscience*, 29(40), 12597–12605.

Rhodes, J. S., Garland, T., & Gammie, S. C. (2003). Patterns of Brain Activity Associated with Variation in Voluntary Wheel-Running Behavior. *Behavioral Neuroscience*, 117(6), 1243–1256.

Tang, Y. (2015). Effects of Long-term Exercise on Spatial Learning, Memory Ability, and Cortical Capillaries in Aged Rats. *Medical Science Monitor*, 21, 945–954.

Titiz, A. S., Hill, M. R. H., Mankin, E. A., M Aghajan, Z., Eliashiv, D., Tchemodanov, N., ... Fried, I. (2017). Theta-burst microstimulation in the human entorhinal area improves memory specificity. *eLife*, 6.

Tulving E, Markowitsch HJ. 1998. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus* 8:198–204.

Van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2(3), 266–270.

Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*, 20(10), 2580–2590.

Vaynman, S. S., Ying, Z., Yin, D., & Gomez-Pinilla, F. (2006). Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Research*, 1070(1), 124–130.

Voskuhl, J., Huster, R. J., & Herrmann, C. S. (2015). Increase in short-term memory capacity induced by down-regulating individual theta frequency via transcranial alternating current stimulation. *Frontiers in Human Neuroscience*, 9.

Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848–858.

Wrann, C. D., White, J. P., Salogiannis, J., Laznik-Bogoslavski, D., Wu, J., Ma, D., ... Spiegelman, B. M. (2013). Exercise Induces Hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 Pathway. *Cell Metabolism*, 18(5), 649–659.

Zheng, L., Yu, M., Lin, R., Wang, Y., Zhuo, Z., Cheng, N., ... Hou, S.-T. (2020). Rhythmic light flicker rescues hippocampal low gamma and protects ischemic neurons by enhancing presynaptic plasticity. *Nature Communications*, 11(1).