UNIVERSIDAD ANDRES BELLO

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Biología

ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA EXPOSICIÓN A POLUCIÓN AMBIENTAL DEL AIRE URBANO DE SANTIAGO EN LA INDUCCION DEL FENOTIPO CLINICO DE LA DEMENCIA FRONTOTEMPORAL EN EL MODELO MURINO *C9ORF72*.

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Licenciado en Biología

Nicolás Adolfo Bernardo Peña Baeza

Directora de Tesis: Brigitte Adriana van Zundert Mathijssen

Co-Directora de: Lorena Patricia Varela-Nallar

Santiago de Chile,

2021

UNIVERSIDAD ANDRES BELLO

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Biología

ESTUDIO DE LA CONTRIBUCION DE LA EXPOSICION A POLUCIÓN AMBIENTAL DEL AIRE DE SANTIAGO EN LA INDUCCION DEL FENOTIPO CLINICO DE LA DEMENCIA FRONTOTEMPORAL EN EL MODELO MURINO *C9ORF72*.

Este Trabajo fue elaborado bajo la supervisión de la Directora de Tesis Dra. Brigitte Adriana van Zundert Mathijssen, en el laboratorio de Neuroepigenética del Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Andrés Bello y aprobada por los miembros de la Comisión de Evaluación.

_____

Dra. Brigitte Adriana van Zundert Mathijssen
Directora de Tesis

_____

Dra. Lorena Patricia Varela-Nallar
Co-Directora de Tesis

_____

Dr. Jimmy Run Stehberg Liberman
Comisión de Tesis

_____

Dr. Ariel Eduardo Reyes Zambrano
Comisión de Tesis

Santiago de Chile, 2021

Dedicatoria.

“Os daré pastores según mi corazón que os apacienten con ciencia e inteligencia”

Agradecimientos.

Quiero partir agradeciendo afectuosamente a Nur Jury Garfe, mi tutora dentro del laboratorio de la Dra. van Zundert. Nur estuvo detrás de este trabajo desde el primer día, por tanto, quien me alentó a avanzar en este lindo y duro proceso de “hacer ciencia” teórica y experimentalmente, así como persona aportando a mi desarrollo profesional. Fue un agrado haber sido su tutorado, así mismo a todos los compañeros del laboratorio de Neuroepigenética por el tiempo compartido durante estos 3 años de trabajo.

A Brigitte van Zundert, directora de tesis. Gracias por recibirme en tu laboratorio, otorgarme un espacio ahí, permitió desarrollarme en el camino de la ciencia y conocer el mundo desde esta perspectiva. Me permitiste encontrar mi visión y vocación, aportando a mi desarrollo como persona-científica, inspirándome a enseñar ciencia básica a futuras generaciones como profesor.

Dentro de la comisión de evaluación quiero agradecer a Jimmy, quien atentamente aporto en este proceso recibiendo mis dudas, igualmente desde el día uno, y aclarando inquietudes en más de una oportunidad. Así mismo para Daisy miembro del grupo de laboratorio del Dr. Stehberg, quien aporto al progreso de mi tesis de pregrado y a la Dra. Lorena como co-tutora de este trabajo.

Finalmente, con un cariño especial quiero hacer mención a Denise Rougier, directora de carrera. Sin su apoyo esto no habría llegado hasta el termino final, no tan solo en la tesis, si no que desde el comienzo en licenciatura en biología. Gracias por creer fielmente en mí, hacerme creer que soy capaz y que me lo merezco.

Índice

1. RESUMEN ix

2. ABSTRACT x

3. INTRODUCCIÓN 1

4. HIPÓTESIS 11

5. OBJETIVOS 12

5.1 Objetivo general: 12

5.2 Objetivos específicos: 12

5.2.1 Estudiar mediante una batería de pruebas conductuales el comportamiento del modelo murino *C9ORF72* a la polución ambiental del aire de Santiago de Chile. 12

5.2.2 Determinar la presencia de marcas asociadas a inflamación mediada por células gliales (GFAP e Iba-1) en el modelo murino *C9ORF72* a la polución ambiental del aire de Santiago de Chile. 12

6. MATERIALES Y MÉTODOS 13

6.1 Desarrollo de un modelo murino de exposición a polución ambiental. 13

6.2 Batería de pruebas conductuales. 14

6.2.1 Prueba de laberinto elevado (ansiedad y locomoción). 14

6.2.2 Prueba de campo abierto (ansiedad y locomoción). 15

6.2.3 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo (memoria). 15

6.2.4 Prueba de interacción social (sociabilidad y memoria social). 16

6.3 Inmunofluorescencia para evaluar marcas de activación glial asociada a inflamación. 16

6.4 Método estadístico. 18

7. RESULTADOS 20

7.1 El modelo *C9ORF72*, pero no los controles, presentaron alteraciones en la memoria de reconocimiento de objetos mediante la prueba de NOR producto de la exposición a la polución ambiental del aire urbano. 20

7.2 El modelo *C9ORF72* y controles expuestos a la polución ambiental del aire no presentaron déficit de locomoción ni una conducta ansiosa en la prueba de campo abierto. 25

7.3 El modelo *C9ORF72* y controles expuestos a la polución ambiental del aire no presentaron déficit de locomoción y/o una conducta ansiosa en la prueba del laberinto elevado. 27

7.4 El modelo *C9ORF72*, pero no los controles, presentó problemas de sociabilidad sin alterar la memoria social mediante la prueba de interacción social cuando se ha expuesto a la polución ambiental del aire. 30

7.5 Análisis de presencia de marcas histopatológicas asociadas a inflamación (GFAP e Iba1) en corteza frontal e hipocampo dorsal. 33

7.6 El modelo *C9ORF72* no presentó un aumento de células GFAP e Iba-1 positivas en la corteza frontal asociativa producto de la exposición a la polución ambiental del aire. 34

7.7 El modelo *C9ORF72* no presentó un aumento de células GFAP e Iba-1 positivas en el giro dentado del hipocampo dorsal producto de la exposición a la polución ambiental del aire. 36

7.8 La polución ambiental del aire contribuyó al aumento de astrocitos activados en el CA1 del hipocampo dorsal, pero no de microglías, en el modelo *C9ORF72*. 38

7.9 El modelo *C9ORF72* no presentó un aumento de células GFAP e Iba-1 positivas en CA3 del hipocampo dorsal producto de la exposición a la polución ambiental del aire. 40

8. DISCUSIÓN. 42

8.1 Presencia de $PM_{2,5}$ y NPs en la polución ambiental urbana del AMS de Chile y su contribución en la inducción del fenotipo clínico de DFT en el modelo murino *C9ORF72*. 42

8.2 Deterioro cognitivo en la memoria de reconocimiento de objetos en la patogénesis de DFT del modelo murino *C9ORF72,* producto de la exposición a la polución del aire urbano. 44

8.3 El modelo de DFT, *C9ORF72* no presentó indicios de una conducta del tipo ansiosa producto de la exposición a la polución ambiental urbana. 46

8.4 El modelo de DFT, *C9ORF72* no presentó indicios de alteración en la función motora asociada a la patogénesis de DFT/ELA producto de la exposición a la polución ambiental urbana. 47

8.5 El modelo murino *C9ORF72* presentó síntomas de desórdenes psiquiátricos primarios asociados a la patogénesis de la DFT con variante de conducta y personalidad. 48

8.5.1 Desordenes psiquiátricos primarios: conducta desinhibida acentuada producto de la exposición a la polución del aire urbano. 48

8.5.2 Desordenes psiquiátricos primarios: comportamiento apático acentuado producto de la exposición a la polución del aire urbano..... 49
8.6 Neuroinflamacion: El modelo de DFT *C9ORF72* solo presentó astrogliosis en el CA1 del hipocampo dorsal y sin evidente alteración de microglías..... 51
9. LIMITACIONES DE ESTE TRABAJO 57
10. CONCLUSIÓN 58
11. BIBLIOGRAFIA 59

Índice de figuras

Figura 1: Modelo ilustrativo experimental del estudio del modelo murino de DFT frente a las NPs de la polución ambiental del aire de Santiago……..……14

Figura 2: Desempeño conductual del modelo *C9ORF72* y controles expuesto a las NPs de la polución del aire mediante la prueba de NOR..…….…….22

Figura 3: índice de discriminación del modelo *C9ORF72* y controles en el NOR; declive cognitivo en el reconocimiento de objetos…….....24

Figura 4: Tiempo de exploración total de los objetos del NOR……...…….....25

Figura 5: Desempeño conductual del modelo *C9ORF72* y controles expuesto a las NPs de la polucion del aire en la prueba de campo abierto…...……27

Figura 6: Comportamiento del modelo *C9ORF72* y controles expuestos a NPs de la polucion del aire en la prueba del laberinto elevado……....29

Figura 7: El modelo de DFT expuesto a las NPs presentó una conducta desinhibida en la prueba del laberinto elevado……...…….…30

Figura 8: Sociabilidad y memoria social del modelo *C9ORF72* y controles expuestos a NPs de la polucion del aire en la prueba de interaccion social de 3 camaras……..…….....32

Figura 9: Inmunofluorescencia de tejido para la estandarización del anticuerpo Iba-1 en el modelo ELA hSOD^{G93A}……...…….33

Figura 10: Inmunofluorescencia de astrocitos y microglías en la corteza frontal Asociativa……..35

Figura 11: Inmunofluorescencia de astrocitos y microglías en el giro dentado de hipocampo dorsal…….37

Figura 12: Astrogliosis en el CA1 del hipocampo dorsal producto de la exposición a las NPs de la polución del aire…….39

Figura 13: Inmunofluorescencia de astrocitos y microglías en CA3 de hipocampo dorsal……..41

Figura 14: Obtención de material particulado disperso en el AMS…….43

Figura 15: Hipertrofia de glías en el CA1 del hipocampo dorsal del modelo *C9ORF72*……..…….55

Figura 16: Hipertrofia de glías en el CA3 del hipocampo dorsal del modelo *C9ORF72*……...56

Índice de Tablas

Tabla 1: Material particulado, fuente de origen y regulación……..……..2

Tabla 2: Modelos murinos de *C9ORF72*: características, genotipo y fenotipo……...10

Tabla 3: Animales fijados para inmunofluorescencia y Anticuerpos……19

1. RESUMEN

La polución ambiental del aire es una mezcla compleja de gases y nanopartículas (NPs) que se encuentran dispersas ampliamente en el ambiente y que pueden tener efectos tóxicos en la salud humana. Las NPs ingresan al organismo, difundiendo hacia diferentes tejidos incluyendo el sistema nervioso central. En la actualidad este estresor ambiental es una problemática mundial y el área metropolitana de Santiago (AMS) de Chile no es la excepción. La exposición crónica a $PM_{2,5}$ y NPs de la polución ambiental urbana ha documentado tener efectos negativos para quienes padecen de la enfermedad de Alzheimer (EA) y si además hay presencia de un factor de riesgo genético, se acelera la aparición de la enfermedad. La demencia frontotemporal (DFT) es un espectro neurodegenerativo de múltiples fenotipos clínicos y la mutante *C9ORF72* es factor de riesgo genético. A diferencia de la EA, no existe evidencia que relacione la DFT y la polución ambiental del aire. Es por eso que nos preguntamos ¿es posible que las NPs provenientes de la polución ambiental del aire contribuyan al desarrollo del deterioro cognitivo y neuroinflamación asociados a la patogénesis de DFT, tal como sucede en la EA? Para resolver esta pregunta se planteó que "la exposición de un modelo murino de DFT a las NPs provenientes de la polución ambiental del aire del área metropolitana de Santiago de Chile provoca trastornos cognitivos, motores y psicológicos e induce inflamación mediada por glías activadas". Para poner a prueba nuestra hipótesis utilizamos el modelo murino transgénico *C9ORF72*, caracterizado por no presentar deficiencia cognitiva (test de NOR) en su edad adulta ni activación glial. Los animales fueron expuestos a la polución ambiental urbana del AMS, donde se evaluó mediante una batería de pruebas conductuales, si dicho estresor ambiental, indujo alguno de los trastornos planteados y además mediante inmunofluorescencia, si indujo la presencia de marcadores de activación glial. La exposición a polución ambiental urbana resulto en: declive cognitivo, trastornos psicológicos, pero no problemas motores, en conjunto con astrogliosis hipocampal en CA1. Estos datos sugieren que las NPs de la polución ambiental del aire podrían contribuir al desarrollo de la patogénesis de DFT en el modelo *C9ORF72*.

2. ABSTRACT

Air pollution is a complex mixture of gases and nanoparticles (NPs) that are widely dispersed in the environment and have been described to have detrimental effects in human health. NPs enter the body, and spread to several tissues, including the central nervous system. This environmental stressor has become a global trend and the metropolitan area of Santiago, Chile is not an exception. Chronic exposure to $PM_{2,5}$ and NPs from urban air pollution have been documented to have negative effects for those suffering Alzheimer's disease (AD), and the evidence suggests that the presence of a genetic risk factor for AD accelerates the appearance of the disease. Frontotemporal dementia (FTD) is a neurodegenerative spectrum of diverse clinical phenotypes, in which the mutant *C9ORF72* is a genetic risk factor. Unlike AD, the evidence associating exposure to urban air pollution and FTD has not been studied yet. Is it possible that urban air pollution's NPs induce the development of cognitive impairment and neuroinflammation associated with the pathogenesis of FTD, as in AD? our hypothesis was that "the exposure of a murine model of FTD to the NPs from the urban air pollution of metropolitan Santiago area induces cognitive, psychological and motor deficits, as well as glial activation mediated-inflammation". To test this, we used the transgenic murine model *C9ORF72*, which has been previously reported not to present cognitive deficits (in the NOR test) or astrogliosis in adult mice. *C9orf72* mice were exposed to the urban air pollution of Santiago. Several behavioral tests were performed to determine whether this environmental stressor triggers cognitive, motors and psychological impairments, and by immunofluorescence, whether it induces glial activation-mediated inflammation. In this thesis we observed cognitive decline, psychological alterations and hippocampal astrogliosis in CA1. In consequence, we conclude that exposure of urban air pollution triggers the development of FTD in the *C9ORF72* transgenic mouse model.

3. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el desarrollo tecnológico ha crecido de manera exponencial debido a las demandas socioeconómicas y culturales. La explotación de regiones urbanizadas ha traído consecuencias negativas a la salud humana, pues en la actualidad existen factores de riesgo como estresores ambientales, tal como el estrés crónico y el más significativo del siglo XXI, la polución ambiental del aire (Brockmeyer et al., 2016; Cohen et al., 2017). Esta última se caracteriza por ser una mezcla de complejas y diversas substancias químicas, tanto orgánicas como inorgánicas, entre las cuales se encuentra presente el material particulado (PM) (Chen et al., 2008; Brooks et al., 2008). El PM es un contaminante aerotransportado, de múltiples fuentes de origen, lo que está directamente relacionado al daño biológico que pueda causar (Chen et al., 2008; Brooks et al., 2008; WHO., 2013; Kim et al., 2015; Brockmeyer et al., 2016). Este se ha clasificado por la organización mundial de la salud (OMS) en 3 fracciones respirables: gruesa (PM_{10}), fina ($PM_{2,5}$) y nanopartículas (NPs), (**Tabla 1**). El índice de calidad del aire, fijado por la OMS y elaborado en base a estudios epidemiologicos, recomienda para $PM_{2,5,}$ un máximo de exposición diaria de 25 $\mu g/m^3$ y una concentración anual de 10 $\mu g/m^3$ (OMS, 2006; WHO, 2013; Brockmeyer et al., 2016). Si un sector urbanizado está por sobre estas cifras se considera como ciudad contaminada y de alto impacto a la salud humana (OMS, 2006; Brook et al., 2008; Block y Calderón-Garcidueñas et al., 2009; Brockmeyer et al., 2016; Cohen et al., 2017; Lu et al., 2019).

En un trabajo publicado por Cohen et al. (2017) se estimó que la exposición crónica a la polución ambiental del aire en 2015 fue responsable del 7,6% de las muertes a nivel global, posicionándose quinto en el ranking de los factores de riesgo ambientales asociados a mortalidad, estableciéndose como un problema de salud pública (Cohen et al., 2017). En otro estudio global, se recapitulo datos de más de 600 áreas urbanas con altos índices de contaminación ambiental, concluyó que las fracciones inhalables de PM grueso y fino son responsables del aumento de la mortalidad diaria en un 77% y un 68% en enfermedades

cardiovasculares y respiratorias respectivamente (Liu et al., 2019). En el estudio, los autores, incluyeron datos publicados acerca de la ciudad de Santiago de Chile. Esta región urbana se ubica en un valle, característica geográfica que genera en la época invernal serios episodios de contaminación ambiental con altas concentraciones de $PM_{2,5}$ causando serias consecuencias en la capital de Chile (Toro et al., 2019), donde se han visto exacerbados los síntomas respiratorios (Prieto-Parra et al., 2017). El impacto negativo de $PM_{2,5}$ y NPs ha sido descrito en el sistema respiratorio (Brooks et al., 2008) y en otros órganos como el sistema nervioso central, donde se le ha atribuido un papel importante en neurodegeneración (Genc et al., 2012), aunque no está del todo claro los mecanismos celulares y moleculares asociado a estos eventos.

Tabla 1: Material particulado, fuente de origen y regulación.

Material particulado (PM)	**Fuente primaria de origen**	**Exposición recomendada por la OMS vs norma chilena (µg/m^3)**		
Material particulado grueso (PM ≥10µm)	Varía desde la quema de madera hasta varios trabajos urbanos, construcción, tráfico vehicular y polvo de carretera.	ANUAL		DIARIA
		OMS	20µg/m^3	50µg/m^3
		SINCA	50µg/m^3	150µg/m^3
Material particulado fino (PM ≤2,5µm)	Incendios forestales, plantas de energía, refinamiento de aceites y gasolina y emisión residencial.	OMS	10µg/m^3	25µg/m^3
		SINCA	20µg/m^3	50µg/m^3
Material particulado ultrafino; nanopartículas NPs (PM ≤0,1µm)	Combustión de vehículos Diesel, variedades de compuestos orgánicos solubles y metales de transición emanados del desarrollo industrial.	No existe regulación		No existe regulación

Tabla 1: Clasificación del material particulado, sus fuentes de origen (OMS., 2006; Brooks et al., 2008; Kim et al., 2015; WHO, 2013) y concentración máxima recomendada en base a los datos otorgados por la organización mundial de la Salud (OMS) y el sistema nacional de información de calidad del aire (SINCA).

La exposición a la fracción particulada fina y NPs, que principalmente provienen de la combustión de tubos de escapes de emisiones vehiculares (Block y Calderón-Garcidueñas et al., 2009; Brockmeyer et al., 2016), son de particular relevancia en el cerebro. Los autores de Maher et al. (2016) utilizaron la técnica de espectroscopia de perdida de energia en muestras *post-mortem* de individuos residentes de ciudades contaminadas (México y Reino Unido), evidenciando la presencia de NPs en células del lóbulo frontal, similares al mineral de magnetita, sugiriendo su fuente exógena. Asimismo, el estudio de Gonzales-Maciel et al. (2017), examinó muestras *post-mortem* de infantes y adultos jóvenes residentes de la ciudad de México (con altos índices de polución) y los compararon con muestras controles de provincias no contaminadas. Los autores observaron NPs derivadas de la combustión en neuronas y astrocitos, en zonas tales como el bulbo olfatorio, corteza frontal y neuroepitelio nasal, a diferencia de las muestras de los individuos de provincias no contaminadas. Datos publicados en Calderón-Garcidueñas et al. (2020), en colaboración con la Dra. Van Zundert mostraron en muestras de autopsias mediante microscopia electrónica de transmisión la presencia de NPs en núcleos de neuronas y astrocitos de corteza frontal, la que era significativamente mayor respecto a las muestras de individuos que vivían en zonas no contaminadas.

La asociación epidemiológica más robusta a la fecha respecto a la exposición a NPs de la polución ambiental urbana y el sistema nervioso central corresponde a la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por presentar en su fenotipo, una discapacidad cognitiva progresiva y conductual, que se caracteriza por la pérdida de la memoria y/o demencia, que afecta áreas cerebrales tales como la corteza cerebral y el hipocampo (Rocca et al., 2011). Su proteinopatía se caracteriza por presentar a nivel molecular agregados de β-amiloide extracelulares y ovillos neurofibrilares extra e intraneuronales, asociados a la disfunción de la proteína Tau al ser fosforilada (Weiner y Lipton et al., 2010; Braak y Del Tredici et al., 2012). Esta enfermedad puede ser tanto familiar como esporádica, y no presenta una única causa. Se han reportado diversos factores de riesgo, uno de los cuales es ser

portador del alelo disfuncional del gen de la apolipoproteina-E4 (ApoE4) (Braak y Del Tredici et al., 2012; Selkoe y Hardy et al., 2016). La evidencia sugiere que la polución ambiental tiene un rol catalizador en el desarrollo de la EA cuando existe un factor de riesgo genético (Calderón-Garcidueñas et al., 2008, 2012, 2016), lo que ha sido corroborado por estudios *in vivo* e *in vitro* los que se detallan a continuación.

En análisis de muestras *post-mortem* de corteza frontal de portadores del alelo *APOE4* expuestos a polución ambiental, se detectaron marcas asociadas a neurodegeneración, que estaban ausentes en individuos sanos (Calderón-Garcidueñas et al., 2012). Además, estos investigadores documentaron que niños y jóvenes adultos sanos residentes de la ciudad de México y portadores del alelo *APOE4*, poseen un bajo desempeño cognitivo, asociado al desarrollo temprano de demencia tipo EA (Calderón-Garcidueñas et al., 2016). El hipocampo es importante para el desarrollo de la memoria y aprendizaje (Strange et al., 2016) y se encuentra ampliamente afectado en la EA. La literatura actual indica que existe vulnerabilidad de dicha área a los efectos de la exposición a las NPs, resultado que es aún mayor en personas portadoras del alelo *APOE4*. Esto también se ha observado en modelos animales para la EA. En el estudio publicado por Cacciottolo et al. (2017), se demostró que la exposición a NPs en un modelo transgénico para la EA (5xFAD) aceleró el desarrollo del péptido β amiloide, en el área del CA1 del hipocampo. En el trabajo de Morgan et al. (2011) se reportó que la exposición crónica a polución del aire resultó en una respuesta inflamatoria generada por gliosis y microgliosis alterando la funcionabilidad de las neuronas, igualmente de la región de CA1 del hipocampo.

En una reciente publicación de Calderón-Garcidueñas et al. (2020) en colaboración con la Dra. van Zundert, se realizó un análisis epigenético de modificaciones represivas post-traduccionales y de daño a DNA en muestras *post-mortem* de individuos provenientes de la ciudad de México, y que además presentaban marcas histopatológicas asociadas a la EA. Los datos sugirieron que la exposición crónica a NPs de la polución del aire no solo conlleva a la

pérdida de marcas represivas de histonas H3K9me2/me3, sino que además se observa un incremento en el marcador de daño de la doble hebra de DNA γ-H2A.X, respecto a controles de ciudades no contaminadas. Dentro de este mismo trabajo, pero desde una perspectiva *in vivo*, animales *C57bl/6j* expuestos a la polución ambiental urbana de Santiago de Chile, también presentaron pérdida de las marcas represivas H3K9me2/me3, junto con un incremento de γ-H2A.X en corteza frontal, además de la fosforilación de la proteína Tau, asociada a la histopatología de la EA.

La neuroinflamacion es un concepto importante por destacar en esta tesis, este fenómeno corresponde a una respuesta glial exacerbada, donde cambia el fenotipo morfológico tanto de astrocitos como de microglías, acompañado de la secreción de mediadores proinflamatorios, eventos que contribuyen al proceso de neurodegeneración en el sistema nervioso central (Block y Calderon-Garcidueñas et al., 2009; Ransohoff et al., 2016; Brockmeyer et al., 2016). Sin embargo, no está del todo claro si este fenómeno es causa o efecto del proceso patológico (Ransohoff et al., 2016; McCauley y Baloh et al., 2018).

En el cerebro, las microglías son las células responsables de la inmunidad innata. Activamente censan el parénquima, manteniendo bajo control cualquier alteración mediante la fagocitosis, secreción de citoquinas y factores neurotróficos, reaccionando frente a daño, presencia de patógenos y la aparición de agregados proteicos característicos de enfermedades neurodegenerativas (Nimmerjahn et al., 2005; Bright et al., 2019). Su reactividad puede ser estudiada mediante la expresión de la proteína Iba-1, usada como marcador de activación microglial (Woodward et al., 2017; Haukedal y Freude et al., 2019). Por otro lado, los astrocitos son esenciales para la mantención de la barrera hematoencefálica, secreción de gliotransmisores, regulación sináptica y homeostasis iónica de neurotransmisores (Damiani et al., 2007). La proteína *glial fibrillar acidic protein* (GFAP por sus siglas en inglés), producida por los astrocitos, entrega soporte estructural y fuerza a la red neuronal. GFAP aumenta su expresión considerablemente frente a traumas encefalocranianos y neurodegeneración,

proceso conocido como astrogliosis (Eng et al., 2000; Block y Calderón-Garcidueñas et al., 2009; Moraga-Amaro et al., 2014).

Se ha sugerido que $PM_{2,5}$ y NPs de la polución del aire se interpretarían como patógenos, activando a microglías y astrocitos, cambiando su morfología y generando una respuesta inflamatoria crónica (Block y Calderón-Garcidueñas et al., 2009; Ransohoff et al., 2016). Los cambios del fenotipo morfológico pueden ser estudiados por medio de las proteínas Iba-1 y GFAP, respectivamente (Woodward et al., 2017; McCauley y Baloh et al., 2018). Evidencia de muestras de cerebro humano de individuos expuestos a polución ambiental urbana, mediante análisis histoquímicos, se observó un aumento de astrocitos activados en el bulbo olfatorio y corteza frontal. Dentro de este mismo trabajo además se reportó un aumento de diversas citoquinas y marcadores proinflamatorios evidenciando un proceso de inflamación (Calderón-Garcidueñas et al., 2008; Block y Calderón-Garcidueñas et al., 2009). En estudio publicado por Woodward et al. (2017) mediante inmunofluorescencia contra la proteína Iba1, se observó un aumento en el número de microglías en CA1 del hipocampo de roedores expuestos a NPs. Dentro de este ámbito, en la investigación publicada por Cheng et al. (2016) la exposición temprana a NPs promueve la respuesta inflamatoria mediada por microglías activadas. En esta misma investigación, se mostró *in vitro* que la exposición crónica a NPs induce tempranamente una respuesta inflamatoria, que involucra a microglías activadas y mediadores proinflamatorios.

La exposición crónica a contaminantes aerotransportados impacta al cerebro, desencadenando un proceso patológico, resultando en cambios celulares y moleculares asociados a neuroinflamación y déficits cognitivos que han sido documentados en la EA. Este efecto se acentúa cuando se presenta un factor de riesgo genético como lo es *APOE-4*. Por lo tanto, la exposición a la polución ambiental del aire contribuye como un factor de riesgo ambiental a la EA. De momento no hay investigaciones que aborden una posible relación patológica entre la polución ambiental del aire y otras enfermedades neurodegenerativas (Genc et al., 2012; Brockmeyer et al., 2016; Kilian y Kitazawa et al., 2018). Otra

neuropatología asociada a la pérdida de memoria y discapacidad cognitiva es la demencia frontotemporal (DFT), la que también posee una variedad de factores de riesgos genéticos. Sin embargo, se desconoce si un estresor ambiental, como lo es la polución ambiental del aire, pudiese gatillar la DFT. ¿Es posible que la exposición de un modelo murino de DFT a las NPs provenientes de la polución ambiental del aire del área metropolitana de Santiago de Chile induzca la patología propia de la DFT, cuando además se presenta un factor de riesgo genético como es el de *C9ORF72*, tal como ocurre con la EA?

La DFT corresponde a un grupo de diversos desordenes neurodegenerativos progresivos, caracterizados por la atrofia de los lóbulos frontales y temporales (Ferrari et al., 2011; Devenney et al., 2019). Los síntomas generados por esta enfermedad convergen en un espectro de manifestaciones clínicas y patológicas, por lo tanto, es heterogénea, generando una amplia gama de fenotipos, donde destacan las alteraciones de la memoria, funciones sociales, de personalidad y habilidades lingüísticas (Devenney et al., 2019, Bright et al., 2019). La DFT puede afectar a personas menores de 65 años (Ratnavalli et al 2002). Su proteinopatía se ha descrito en la deposición intraneuronal de las proteínas Tau y TDP-43 (Readmakers et al., 2014; Rainero et al., 2017; Devenney et al., 2019). A la fecha se han descrito diversos factores de riesgo genético para la DFT y la mutante *C9ORF72* es uno de ellos (Ferrari et al., 2011; Peters et al., 2015; Devenney et al., 2019).

Esta mutación afecta al gen del cromosoma 9 en el marco de lectura abierto N° 72 (Peters et al., 2015; O'Rourke et al., 2015; Balendra e Isaacs et al., 2018), generando la presencia de hexanucleótidos producidos a partir del primer intrón de *C9ORF72* (O'Rourke et al., 2015). La evidencia ha descrito que estos transcritos están compuestos de 4 guaninas más 2 citocinas (GGGGCC) y pueden ser elongados desde cientos hasta miles de veces. Se acumulan tanto en el citoplasma como en el núcleo formando "focis" (agregados de RNA), siendo capaces de secuestrar proteínas de unión a RNA y concluir en la traducción de los intrones en proteínas dipéptidas mediante una traducción no convencional

(Ferrari et al., 2011; O'Rourke et al., 2015; Balendra e Isaacs et al., 2018). Se ha propuesto que el principal mecanismo molecular asociado a su patología es la toxicidad celular y muerte neuronal producto de estas 2 causas anteriormente descritas (Belzil et al., 2013; Mackenzie et al., 2014; Balendra e Isaacs et al., 2018; Haukedal y Freude et al., 2019). A la fecha, se ha identificado al gen *C9ORF72* como una proteína importante en la regulación del tráfico endosomal, interactuando en procesos relacionados con la autofagia y endocitosis (Polymenidou et al., 2011; Al-Sarraj et al., 2011; Mori et al., 2013; Rainero et al., 2017; Zhang et al., 2018; Haukedal y Freude et al., 2019). Los hexanucleótidos de *C9ORF72* han sido evidenciados como la principal causa de superposición clínica entre la DFT y el síndrome neuromotor o esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Sin embargo, la haploinsuficiencia (perdida de función del gen) generada por los hexanucleótidos y la ganancia de función asociada a la toxicidad de los RNA foci y proteínas dipéptidas repetidas, no son suficientes para desencadenar la patología de DFT/ELA. No obstante, hay evidencia que indica que la haploinsuficiencia de *C9ORF72*, si es capaz de dirigir una respuesta inmune hiperactiva (Balendra e Isaacs et al 2018; Zhang et al., 2018; Haukedal y Freude et al., 2019). Es más, este gen se encuentra altamente expresado en microglías y se ha asociado a procesos de neuroinflamación en DFT (Lall y Baloh et al., 2017; McCauley y Baloh et al., 2018), el que estaría impactando directamente a la patología y no como un factor secundario a la neurodegeneración de esta (Haukedal y Freude et al 2019).

Finalmente, aportando a la evidencia del modelo transgénico *C9ORF72* desarrollado por Peters et al. (2015), en el trabajo de Jury et al. (2020) realizado en el laboratorio de la Dra. van Zundert, se documentó un análisis epigenético (**Tabla 2**) en el que estos animales se caracterizaron por presentar una significativa disminución de la marca represiva de histonas H3K9me3 tanto en cultivo primario de astrocitos, como en neuronas y astrocitos de la corteza motora, hipocampo y columna vertebral, en los centros densos de heterocromatina de sus respectivos núcleos. Todo esto en conjunto con la pérdida neuronal en hipocampo. Además, este modelo presentó déficit cognitivo

en la prueba de memoria de localización de objetos (OLM por sus siglas en inglés). Esta investigación sugiere que este modelo murino transgénico *C9ORF72*, recapitula características tenues de DFT.

De la misma forma que el desarrollo de la EA en presencia de un factor de riesgo genético (*APOE-4*) se ve acelerado tras la exposición a polución del aire, en esta tesis se estudiará la posible contribución de la polución ambiental del aire de Santiago de Chile en el desarrollo de la patología de DFT. Para ello, animales con susceptibilidad genética para DFT (ratones transgénicos *C9orf72*) serán expuestos a la polución ambiental del aire urbano del área metropolitana de Santiago. Este modelo murino *C9ORF72* es particularmente útil, pues posee el riesgo genético, pero no presenta fenotipo asociado a DFT. Por lo tanto, se evaluará si la exposición a la contaminación ambiental urbana presente en el área AMS conduce al desarrollo de trastornos cognitivos, psicológicos y motores, gatillando un fenotipo clínico tipo-DFT, por medio de una batería de pruebas conductuales. Adicionalmente, en muestras de cortes histológicos de cerebro se analizará la presencia de marcas asociadas a inflamación mediada por glías activadas, a través del marcaje de GFAP e Iba-1 por inmunofluorescencia.

En la **Tabla 2** se recapitulan las características genéticas, toxicidad celular y fenotipo conductual de diversos modelos murinos *C9ORF72*. La tabla contiene evidencia relevante para la discusión de este trabajo, además se adjuntan datos publicados de nuestro laboratorio. Adaptado de Balendra e Isaacs et al. (2018).

Tabla 2: Modelos murinos de *C9ORF72*: características, genotipo y fenotipo.

Referencia	Características del modelo transgénico	Toxicidad celular: - RNA Foci - Proteínas dipeptidas	Proteinopatia asociada a DFT/ELA y/o marcas de inflamación	Fenotipo: motor, cognitivo y conductual
Peters et al., 2015	B6/SJL. Gen *C9ORF72* insertado con CBA. secuencia del exón 1 al 5. hexanucleótidos de 300 a 500 repetidos	RNA foci abundante a través del SNC (antisentido en menor cantidad). Inclusiones de dipéptidos. Aumentan en el transcurso de la edad	No se reporta patología asociada	No se observan alteraciones motoras ni conductuales a través del: Rotarod, grip strength e interacción social de 3 cámaras.
Datos Laboratorio Dra. van Zundert **Jury et al., 2020**	Análisis epigenético del modelo de Peters et al. Pérdida de las marcas represivas H3K9me3/me2 en cultivo primario de astrocitos de columna vertebral (*in vitro*) y neuronas y astrocitos de corteza motora, hipocampo y columna vertebral (*in vivo*)			Presenta problemas de memoria de reconocimiento espacial en la prueba de memoria de localización de objetos (OLM)
O'Rourke et al., 2015	C57BL/6J. Gen *C9ORF72* insertado con CBA. Secuencia completa del gen. hexanucleótidos desde 100 a 1000.	RNA foci sentido como antisentido (GGGGCC y CCCCGG respectivamente) Inclusiones de dipéptidos aumentan en el transcurso de la edad.	No se reporta patología asociada	No se observan alteraciones motoras ni conductuales a través del: Rotarod, grip strength e interacción social de 3 cámaras.
Jiang et al., 2016	C57BL/6J. Gen *C9ORF72* insertado con CBA. Secuencia del exón 1 al 5. hexanucleótidos desde 110 a 450 repetidos	RNA foci sentido como antisentido (GGGGCC y CCCCGG respectivamente) Inclusiones de diversas proteínas dipeptidas.	Presenta agregados de TDP-43.	No hay deficiencias motoras ni déficit en memoria espacial. Se observó conducta del tipo ansiosa.
Lall y Baloh et al., 2017 **McCauly y Baloh et al., 2018**	Evidencian que las hembras *C9ORF72* poseen mayor riesgo de desarrollar neuroinflamacion, sugieren que la presencia de la mutante sería más perjudicial producto del sexo de nacimiento.			

Tabla N°2: Diversos modelos han sido descritos en la ganancia de función del gen *C9ORF72*. En este trabajo se utilizó el modelo descrito por Peters et al., 2015. Otros trabajos como el de O'Rourke *et al;* Jiang *et al;* Lall y Baloh *et al;* McCauly y Baloh *et al.* fueron incluidos, pues recapitulan características relevantes para la discusión de nuestros resultados. Además, se incluye el trabajo de Jury *et al.,* ya que corresponde a los análisis de epigenética del modelo *C9ORF72* realizados en el laboratorio de la Dra. Van Zundert. Adaptado de Balendra e Isaacs et al., 2018.

4. HIPÓTESIS

La exposición del modelo murino de demencia frontotemporal a las nanopartículas provenientes de la polución ambiental del aire del área metropolitana de Santiago de Chile induce provoca trastornos cognitivos, motores y psicológicos e induce inflamación mediada por glías activadas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Evaluar si las NPs provenientes de la polución ambiental urbana del área metropolitana de Santiago de Chile provoca trastornos cognitivos, motores y/o psicológicos e inflamación mediada por glías activadas en el modelo murino de demencia frontotemporal, *C9ORF72*.

5.2 Objetivos específicos:

5.2.1 Estudiar mediante una batería de pruebas conductuales el comportamiento del modelo murino *C9ORF72* a la polución ambiental del aire de Santiago de Chile.

5.2.2 Determinar la presencia de marcas asociadas a inflamación mediada por células gliales (GFAP e Iba-1) en el modelo murino *C9ORF72* a la polución ambiental del aire de Santiago de Chile.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Desarrollo de un modelo murino de exposición a polución ambiental.

En base a lo planteado en la tesis doctoral de Nur Jury y el articulo publicado previamente (Calderón-Garcidueñas et al., 2020), se ustilizaron dos tipos de racks (**Figura 1 y 14**). Cada uno consistió en 9 compartimentos y dentro de ellos se situó a las jaulas que alojaron a los modelos murinos, donde en cada una habitaron 5 de ellos. El “rack polución” se ubicó en el patio del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Andrés Bello. El aire fue obtenido directamente de la ciudad mediante un ventilador que lo distribuyó hacia cada compartimiento. El “rack filtro” utilizó un sistema de filtro BIOMAX^{TM} HEPA 99.7%, modelo (FH12126) de dimensiones 12”x12”x6” y con una eficiencia de 0.3 micrones, el que fue distribuido hacia cada compartimiento.

Se usaron hembras genotipo *C9ORF72* y *B6sjl* como controles, las que fueron distribuidas aleatoriamente en cada uno de los racks ya sea filtro y polución. El manejo de los animales se realizó siguiendo las guías de manejo ético y cuidado de experimentación de animales dispuestas por el “National Institute of Health” (NIH, Maryland, EEUU) y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Vida de la Universidad Andrés Bello (Santiago, Chile). Acta de aprobación 001/2018. Los animales iniciaron el experimento con 1 mes de edad y habitaron en sus respectivos racks desde abril a octubre. En Santiago de Chile, entre dichos meses se alcanzan los mayores niveles de polución ambiental, llegando a 170 μg/m^3 de $PM_{2,5}$ como promedio diario (Diaz-Robles et al., 2011; SINCA; Toro et al., 2019). La edad final en que los animales atravesaron por la batería de pruebas de conducta fue de 8 meses. Una vez terminada la batería conductual, los animales fueron eutanaciados.

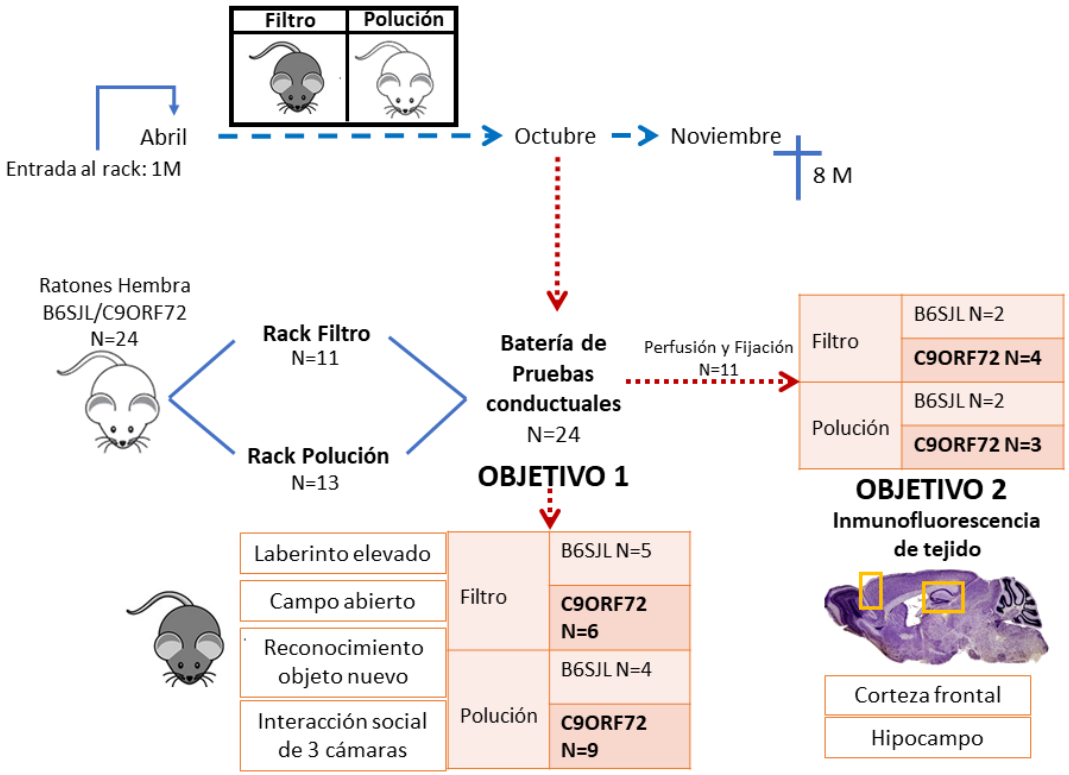


Figura 1: Modelo ilustrativo experimental del estudio de modelo murino de DFT frente a la polución ambiental del aire de Santiago. Ilustración de la metodología de exposición a la polución ambiental del aire y objetivos a satisfacer con este estudio. Cabe destacar que solo para la prueba del **NOR** hubo un N=23, producto de la falla de un video en los animales polución.

6.2 Batería de pruebas conductuales.

A finales del último mes de exposición a contaminación, los animales atravesaron por diversas pruebas de desempeño cognitivo y conductual para evaluar ansiedad, locomoción, memoria de reconocimiento, sociabilidad y memoria social. Cada prueba fue realizada en la sala de entrenamiento, donde los animales estuvieron por 30 minutos previo a cada entrenamiento y se registró el comportamiento con el programa de video DEBUT (NCH software v 5.1.1).

6.2.1 Prueba de laberinto elevado (ansiedad y locomoción).

Se utilizó una estructura compuesta por una cruz de 4 brazos, 2 de los cuales se encontraban cerrados, ubicados frente a frente (25x25x16 cm) a otros 2 abiertos, ubicados del mismo modo (25x25x0,5 cm). El centro de la cruz tenía una base de (5x5x0,5 cm). El aparato se ubicaba a 50 cm del suelo. Se acondicionó la sala de entrenamiento libre de ruidos, con una iluminación a 100lux. La prueba

consistió en dejar en el centro de la cruz al animal con su cabeza posicionada con la mira hacia un brazo cerrado. Se le permitió explorar por 10 minutos, evaluando el tiempo de exploración del brazo abierto y el cerrado, la frecuencia de entrada a cada uno de estos y la distancia total recorrida (Komada et al., 2008).

6.2.2 Prueba de campo abierto (ansiedad y locomoción).

Se usó una arena (caja) transparente de 72x72cm con un alto de 36 cm. El animal se dejó en el centro de la arena y se le dejó explorar por 5 minutos. La cuantificación de esta prueba incluyó el tiempo de exploración en la periferia del box (thigmotaxis), el tiempo en el centro de este y la distancia recorrida a través de este. Para las mediciones, se marcó un cuadrante en la base de la arena (rectangular) de 4 filas y 6 columnas. Conductas del ratón tales como defecación y orina, acicalamiento, congelamiento y posarse en sus 2 patas traseras, fueron registradas (cualitativamente) mientras transcurrió el tiempo de exploración (Brown et al., 1999).

6.2.3 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo (memoria).

Se utilizó la misma arena mencionada en la prueba de campo abierto. Se procedió a la habituación de 5 minutos, 24 horas antes del entrenamiento y un minuto antes del día de la prueba. Los objetos que debieron reconocer los animales fueron: una torre de ladrillo lego (8 cm de largo x3.2 de ancho) y un tubo Falcon™ relleno con arena (9 cm ancho, 5 cm de ancho y 2 cm de profundidad). La fase de entrenamiento se basó en la exploración de 2 objetos iguales por 10 minutos. Luego, en la fase de prueba se cambió uno de los objetos viejos por uno nuevo y se dejó explorar por 10 minutos más. Solamente cambió la identidad de los objetos y no su posición en la arena. La cuantificación del tiempo de exploración de los objetos siempre fue tomada cuando el animal apuntaba sus vibrisas hacia estos, (2 cm o más). No fue cuantificado como tiempo de exploración al estar a mayor distancia, si es que el animal se posó sobre los objetos o si examinó sentado sobre sus patas traseras cercanos al objeto (Antunes et al., 2012; Preston y Eichenbaum et al., 2013; Vogel-Ciernia et al.,

2014). La estimación del índice de discriminación (D2) se realizó mediante la fórmula: $D^2 = d^1/e2$, donde d1 corresponde al tiempo de interacción con el objeto nuevo menos el tiempo con el objeto viejo y e2 el tiempo total de exploración en la sesión de prueba del NOR (Antunes et al., 2012; Akkerman et al., 2012).

6.2.4 Prueba de interacción social (sociabilidad y memoria social).

Se utilizó una arena rectangular transparente, de 3 cámaras separadas, conectadas por una compuerta, ubicada en la cámara del centro. Su apertura/cierre fue manejada por el investigador. El procedimiento constó de un total de 25 minutos: una habituación previa del animal por 5 minutos en la cámara del centro, seguido de 2 sesiones. En la primera sesión se abrieron las compuertas y se dio 10 minutos de exploración. La cámara izquierda se mantuvo vacía y en la cámara derecha se puso un ratón silvestre no relacionado parentalmente, dentro de un cilindro que permite la interacción entre el sujeto de prueba y él. Terminado el tiempo, se cerraron las compuertas dejando al animal en el centro del aparato. La segunda sesión constó de 10 minutos más de exploración. En la cámara previamente vacía se posicionó a otro ratón silvestre nuevo, se abrieron las compuertas y se le permitió explorar. Se cuantificó la interacción del ratón respecto al espacio vacío y a sus compañeros silvestres (Moy et al., 2004).

6.3 Inmunofluorescencia para evaluar marcas de activación glial asociada a inflamación.

La inmunofluorescencia (IF) corresponde a una técnica de inmunomarcación. Aprovecha la habilidad de los anticuerpos de unirse a antígenos específicos y corresponde a un método esencial para estudiar la localización de proteínas y células. La IF utilizada en esta tesis es la del tipo indirecto o también conocida como “sandwich”, donde se emplean anticuerpos primarios no conjugados para localizar la estructura de interés y luego un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado a una molécula fluorescente para la detección del anticuerpo primario y para amplificar la señal (Mori y Cardiff et al., 2016; Im et al., 2019). Con el fin de evitar reactividad cruzada los anticuerpos deben ser

producidos en diferentes animales. Para la localización de núcleos, de neuronas, astrocitos y microglías, los anticuerpos primarios y sus respectivos anticuerpos secundarios (Alexa fluor) están mencionados en la **Tabla 3** junto a las concentraciones usadas para IF.

Los animales tanto del ‘‘rack polución’’ como los del ‘’rack filtro’’ se sometieron a perfusión intracardiaca y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%, y se extrajo sus cerebros, los que se mantuvieron en PFA durante toda la noche a temperatura ambiente. Los cerebros obtenidos se pusieron en concentraciones crecientes de gradiente de sacarosa (10, 20, 30%) hasta su uso. Se ocupó un criostato (Leica, CM1850) con el cual se obtuvo los cortes sagitales de 40 µm. Estos cortes fueron guardados a -20°C.

La IF se realizó usando el protocolo de Ampuero *et al.* (2016) y Bustos *et al.* (2017). Los tejidos guardados se lavaron con PBS (90 ml de agua purificada más 10 ml de PBS al 1%) y se prosiguió con una solución de bloqueo/permeabilización que incluyó PBS1x-Tritón x100; BSA 3% y suero de burro al 3%. Se dejó en agitación constante por 4 horas a temperatura ambiente. Luego, en otra solución de bloqueo/permeabilización, se incubó además con los anticuerpos primarios y se dejó en agitación constante durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se extrajo la solución y se limpiaron los tejidos (3 veces en agitación constante con PBS-Tritonx100). Finalmente, se incubó con los anticuerpos secundarios (concentración 1:500) en una solución con PBS1x-Triton x100 más BSA al 3% a temperatura ambiente por 2 horas en agitación constante. Tras extraer la solución se llevaron a cabo dos lavados con PBS-Triton x100, y un tercero sólo con PBS por 5 minutos cada uno. Finalmente, los tejidos se montaron en portaobjetos usando el medio de montaje Fluoromont (Sigma, F4680) y se cubrieron. Los resultados se analizaron primero mediante microscopia de epi-fluorescencia y posteriormente, se usó microscopía confocal (Leica SP8 a 60x), con la que se obtuvieron las imágenes correspondientes a las IF realizadas para el conteo de células positivas para astrocitos y microglías por medio de anticuerpos GFAP e Iba-1 respectivamente. El análisis de cada una de ellas fue realizado usando el

programa Fiji (ImageJ). Se analizaron las proyecciones en el plano Z (espesor de la capa) para cada una de las condiciones (aire filtrado y polución del aire) y se estimó un promedio de un Z de = 22 stacks para las 4 áreas evaluadas: corteza frontal e hipocampo dorsal; giro dentado, CA1 y CA3.

Respecto a la cuantificación de células positivas para GFAP e Iba-1, en la corteza frontal se consideró un análisis total de campo (290.91*290.91 micrones: 84μm^2) y uno en el cual se dividió en cuadrantes y se comparó el conteo de células por cuadrante. En el giro dentado se analizó solo un campo de 76 μm^2, y se consideraron las células positivas para GFAP que estuviesen a un mínimo de 15 µm de distancia tanto del brazo superior como del inferior. Lo anterior debido a que los anticuerpos contra GFAP reconocen progenitores neuronales (del proceso denominado neurogénesis) (Gage et al., 2019). Con relación al resto de las áreas cerebrales (CA1 y CA3) el análisis fue hecho en base a todo el campo de la foto (84μm^2). La cuantificación de una célula GFAP positiva se consideró su morfología estrellada (desde su núcleo hacia las proyecciones) Gage et al. (2019), y para una célula Iba-1 positiva se consideró desde el núcleo hacia las proyecciones, particularmente con una morfología tipo araña (Jara et al., 2017). Respecto de NeuN para la detección de neuronas, no fue incluido en el *merge* (acoplamiento de canales) ya que solo fue utilizado para distinguir estas células de la corteza, giro dentado, CA1 y CA3 en relación con el resto del parénquima. Respecto a las IF tomadas en la estandarización de Iba-1 según Jara *et al*. (2017), células iba-1^+ pueden ser encontradas en los animales H*sod*^{g93a} en la corteza frontal asociativa y la corteza motora.

6.4 Método estadístico.

La batería de pruebas conductuales se analizó estadísticamente usando ANOVA de una vía para diferencias entre más de 2 grupos, seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey. En caso de comparación de solamente 2 grupos se utilizó la prueba de *t*-Student.

Tabla N°3.- Animales fijados para inmunofluorescencia y anticuerpos.

Filtro					
Identificación del animal	Modelo/Genotipo	Entrada al rack	Edad de entrada	Meses en el rack	Edad total
Café 462 +	C9ORF72	03/04/2017	1 M 19 D	5 M 25 D	8 meses
Blanca 459 +	C9ORF72	03/04/2017	1 M 19 D	5 M 25 D	8 meses
Café 305 +	C9ORF72	03/04/2017	1 M 19 D	5 M 25 D	8 meses
Negra -	B6	03/04/2017	1 M 19 D	5 M 25 D	8 meses
Ploma 115 -	B6	03/04/2017	1 M 19 D	5 M 25 D	8 meses
Polución					
Miel 165 +	C9ORF72	03/04/2017	1 M 22 D	5 M 25 D	8 meses
Miel 310 +	C9ORF72	03/04/2017	2 M 3 D	5 M 25 D	8 meses
Ploma 306 +	C9ORF72	03/04/2017	1 M 19 D	5 M 25 D	8 meses
Miel 164 +	C9ORF72	03/04/2017	1 m 22 D	5 M 25 D	8 meses
Café -	B6	03/04/2017	1 M 19 D	5 M 25 D	8 meses
Miel 166 -	B6	03/04/2017	1 M 19 D	5 M 25 D	8 meses
ANTICUERPO PRIMARIO					
Marcador celular	Acoplamiento	Especie	Compañía	Catalogo	Concentración
Nuc blue	Núcleo	-	Invitrogen	R37605	1/100
NeuN	Soma Neuronal	Ratón	Millipore	MAB377	1/200
GFAP	Astrocito	Conejo	Dako	Z0334	1/500
Iba-1	Microglía	Cabra	Abcam	ab5076	1/1000
ANTICUERPO SECUNDARIO					
Alexa Fluor	Longitud de onda	Acoplamiento	Compañia	Concentración	
Anti-mouse	633	NeuN	Invitrogen	1/500	
Anti-rabbit	488	GFAP	invitrogen	1/500	
Anti-goat	546	Iba-1	invitrogen	1/500	

Tabla 3: Con un total de 24 animales que pasaron por la batería de pruebas conductuales, 11 fueron escogidos para ser fijados con el fin de tener los cortes sagitales que serán usados para inmunofluorescencia de tejido, en filtro con un N=4 y en polución con un N=7. El restante de los tejidos fue preservado en nitrógeno líquido para otros experimentos.

7. RESULTADOS

7.1 El modelo *C9ORF72*, pero no los controles, presentaron alteraciones en la memoria de reconocimiento de objetos mediante la prueba de NOR producto de la exposición a la polución ambiental del aire urbano.

La prueba de reconocimiento de objeto nuevo (NOR por las siglas en inglés de, *Novel Object Recognition*) constó de dos sesiones. En la primera sesión de entrenamiento los animales fueron expuestos a dos objetos iguales. Se obtuvo información sobre la validación de la prueba, como la motivación del animal a explorar, preferencia de lado, luz o algún problema motor. Se dejó a los animales explorar por 10 minutos. Para la segunda sesión de prueba (test), uno de los objetos fue cambiado por otro distinto, en la misma ubicación, y se dejó al animal explorar nuevamente 10 minutos. Se analizó tanto el tiempo de exploración total de los objetos como el índice de discriminación (D2).

La **Figura 2**, **A** y **B** corresponde a la sesión I y II realizadas a los animales control B6SJL frente a las condiciones de aire filtrado y polución del aire. En la sesión de entrenamiento **(Figura 2A)** no se observó diferencias significativas de exploración entre los 2 objetos idénticos, sugiriendo que los animales no presentaron preferencia de lado. Respecto a la sesión de prueba **(Figura 2B)** Los animales B6SJL expuestos al aire filtrado exploraron más el objeto nuevo $P<0,001$ **(***)**, mientras que el grupo expuesto a polución solo presentó una significancia del $P<0,05$ **(*)**. Si bien los animales controles exploraron significativamente los objetos nuevos, mediante el ANOVA se puede observar una reducción significativa en del tiempo de exploración de los objetos nuevos entre los grupos filtro *versus* polución $P<0,05$ **(#)**. Esto no necesariamente sugiere que, los animales sanos presentaron alguna reducción en la codificación de la novedad de los objetos. Esta diferencia podría ser aclarada aumentando el número de animales, ya que con un N = 4 (polución del aire) sin duda hay pérdida de potencia estadística.

En esta misma **Figura 2**, Las letras **C** y **D** corresponden a la sesión I y II, entrenamiento y prueba respectivamente, realizados al modelo de DFT frente a las condiciones de aire filtrado y polución del aire. La sesión de entrenamiento **(Figura 2C)** no arrojó diferencias significativas, es decir, los animales C9BAC bajo las condiciones de aire filtrado y polución del aire, exploraron de igual manera ambos objetos, comportándose similar a los animales controles. En el caso de la sesión de prueba **(Figura 2D)** tampoco se presentaron diferencias significativas en el tiempo de exploración entre los objetos viejo y nuevo, entre grupos, en sus respectivas condiciones. No obstante, podemos destacar tanto una tendencia en aire filtrado por el objeto nuevo respecto del viejo, como además de la presencia de "outlayers" en la columna del objeto viejo en aire filtrado y en la columna del objeto nuevo en polución del aire.

Cabe destacar que al retirar los "outlayers" del análisis estadístico (datos no mostrados), el ANOVA se vuelve significativo ($P<0.05$) en la diferencia del tiempo de exploración en el grupo filtro, y entre grupos, se observa diferencias ($P<0.05$) en el tiempo de exploración entre los objetos nuevos, viéndose reducido en los animales C9BAC que estuvieron en polución del aire. No cabe duda de que es necesario para resultados más concretos el aumento del numero de animales por condición.

Finalmente, dentro de la misma **Figura 2**, Dado al previo análisis de la sesión de prueba de los animales C9BAC **(D)**, en **(E)** se obtuvo diferencias significativas, usando t-test, respecto al tiempo de reconocimiento del objeto nuevo cuando los animales C9BAC estuvieron en aire filtrado $P<0.05$ **(#)**. Respecto a sus pares en polución del aire **(F)**, no se observaron diferencias significativas, es decir, no hubo diferencias en la codificación por la novedad, vistas a través de la cuantificación del tiempo de exploración entre los objetos viejo y nuevo.

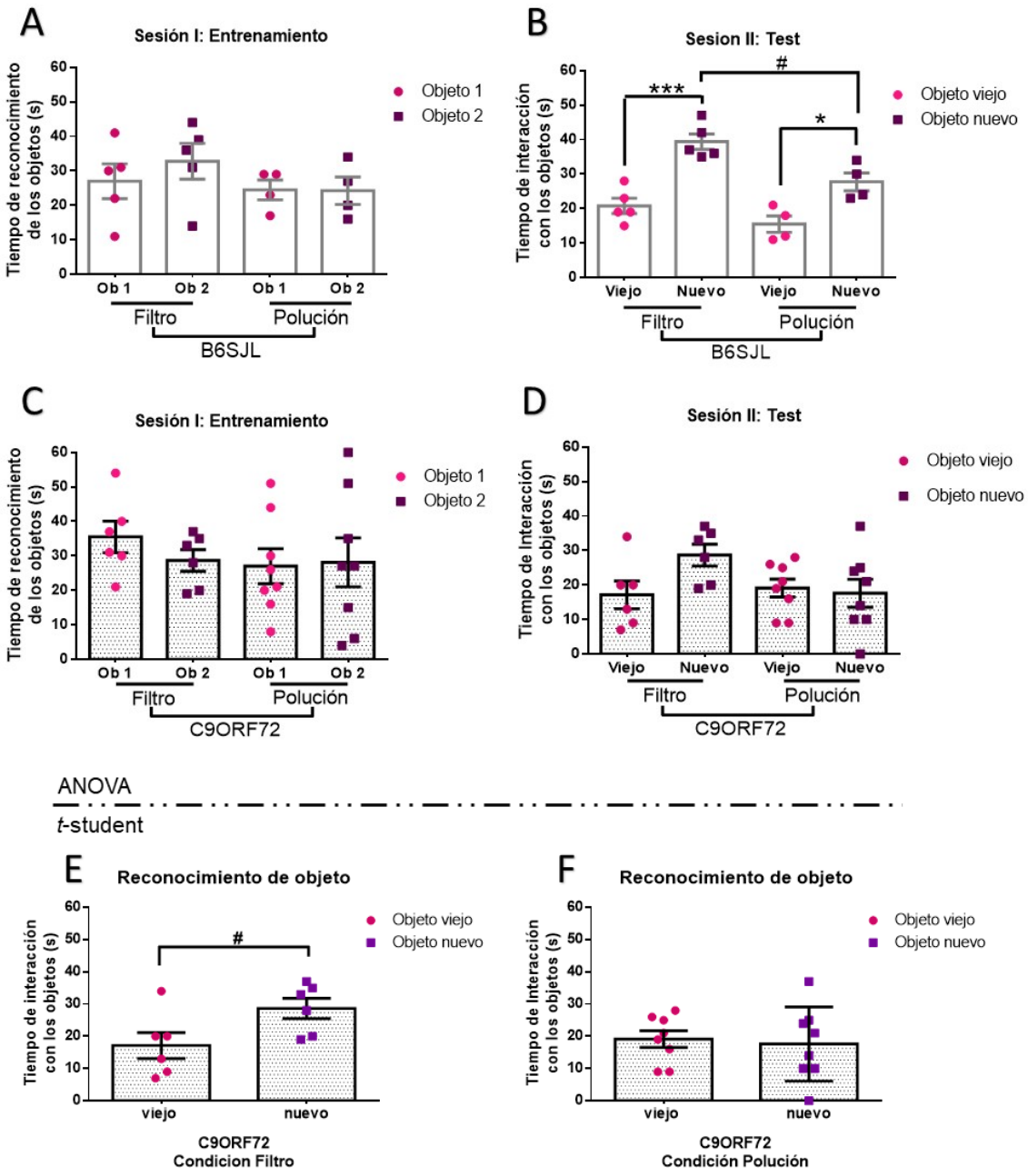


Figura 2: Desempeño conductual del modelo de *C9ORF72* y controles expuestos a la polución del aire mediante en la prueba de NOR. Modelo C9ORF72 sometido a la prueba de NOR con el fin de conocer si la exposición a polución ambiental provocó deterioro de la memoria de reconocimiento asociado a la patogénesis de DFT. **(A)** Control B6SJL en sesión I de entrenamiento y (**B**) sesión II de prueba. **(C)** *C9ORF72* en sesión I de entrenamiento y (**D**) sesión II de prueba. **(E)** y **(F)** corresponden a la prueba *t*-Student en la sesión II test para los animales *C9ORF72* en aire filtrado y polución del aire respectivamente. El objeto 1 (ob1) y objeto 2 (ob2) corresponden a los colores rosa y morado. Mismos colores para objeto viejo y nuevo, respectivamente. Las barras representan el promedio +/- S.E.M. N=23 (B6SJL = 9 en total, 5 en filtro y 4 en polución; *C9ORF72* = 14 en total, 6 en filtro y 8 en polución). Análisis estadístico realizado por ANOVA de una vía y prueba de *t*-Student significancia de ***P*<0,001** (***) y ***P*<0,05** (*

o #). Para ANOVA con símbolo * y objeto viejo *versus* objeto nuevo, y el símbolo # filtro *versus* polución y para *t*-Student el símbolo # objeto viejo *versus* objeto nuevo.

El D2 es una medida directa para el cálculo de diferencias de exploración entre los objetos. Este plantea que aquellos animales que posean un índice menor a 0,5; indica que no discriminan entre el objeto viejo y el objeto nuevo, en cambio, aquellos animales con índices superiores a 0,5 distinguen entre lo viejo y lo nuevo (Antunes et al., 2012; Lueptow et al., 2017). El D2 Arroja una mayor sensibilidad en las diferencias entre grupos y la literatura recomienda el uso tanto del ANOVA como *t*-Student (Akkerman et al., 2012).

Como se puede observar en la **Figura 3**, los animales controles obtuvieron un D2 superior a 0,5 tanto para la condición Filtro como Polución. Sin diferencias significativas mediante el ANOVA **(3A)** y t-test **(3B)** este resultado sugiere que los animales controles distinguieron los objetos presentados.

El modelo de riesgo genético *C9ORF72*, en la variable filtro, se obtuvo un D2 mayor a 0,5, mientras que sus pares expuestos a la polución del aire el valor fue menor a 0,5, sugiriendo la no discriminación de los objetos viejos y nuevo. El ANOVA realizado en la **Figura 3A** para el D2 arrojó diferencias significativas entre los animales C9BAC y controles ($P<0.05$). Luego en el análisis mediante la prueba de *t*-Student (**Figura 3C**), los animales C9BAC bajo la exposición a la polución del aire, presentan diferencias significativas en la discriminación de los objetos, sugiriendo por medio del D2 la no distinción de los objetos presentados en el modelo de DFT.

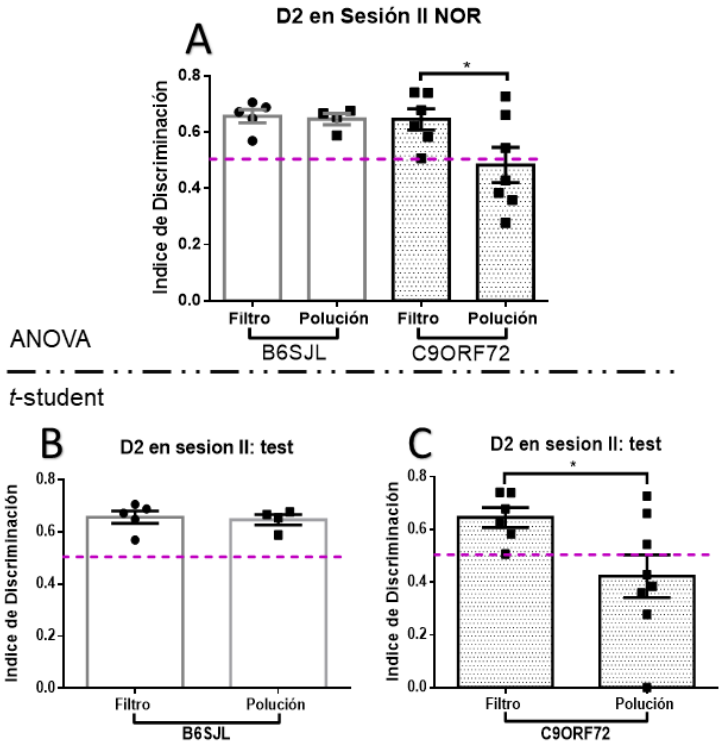


Figura 3: Índice de discriminación del modelo *C9ORF72* y controles en el NOR: declive cognitivo en el reconocimiento de objetos. El D2 aportó información respecto a diferencias en el tiempo de exploración entre objeto viejo y novedoso. **(A)** ANOVA de una vía para el D3 de la sesión II del NOR, hay diferencias significativas entre grupos p<0.05. (**B)** y (**C)** t-Student para NOR. No hay diferencias significativas, discriminación de los objetos viejo y nuevo por parte del control bajo ambas condiciones en contraste del modelo de riesgo genético, donde bajo la polución del aire la discriminación de los objetos esta por bajo el D2, indicando la no distinción de los objetos viejo y nuevo, respecto a sus pares en aire filtrado (D2 superior al 0,5). Las barras representan el promedio +/- S.E.M. línea punteada violeta corresponde al límite del 0,5 del índice de discriminación, N=23 (B6SJL = 9 en total, 5 en filtro y 4 en polución; *C9ORF72* = 14 en total, 6 en filtro y 8 en polución). Análisis estadístico realizado por ANOVA de una vía y prueba de *t*-Student significancia de ***P*<0,05** (*), con símbolo * Filtro *versus* Polución.

La **Figura 4 A** y **B** nos entrega información sobre el tiempo de exploración total de los objetos (que considera la suma de la exploración del objeto familiar y novedoso), tanto para las sesiones de entrenamiento y prueba de los diferentes grupos en sus respectivas condiciones. Todos los grupos interactuaron de igual manera con ambos objetos, descartando algún problema motivacional para explorar (Antunes et al., 2012; Lueptow et al., 2017). En la **Figura A** y **B** no se obtuvo diferencias significativas, validando lo anteriormente mencionado tanto para ambas condiciones, Filtro y Polución.

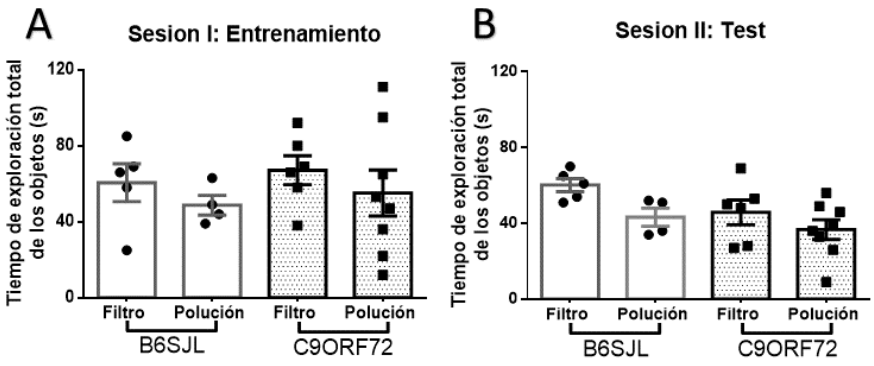


Figura 4: Tiempo de exploración total de los objetos en NOR. El tiempo de exploración total de los objetos en NOR es una evaluación importante frente a la validación de la prueba conductual. En (**A)** tenemos la exploración total en la sesión I de entrenamiento para *C9ORF72* y control. En (**B)** la exploración total correspondiente a la sesión II de prueba para *C9ORF72* y control. Para ninguno se obtuvo diferencias significativas, validado la prueba respecto a preferencia de lado, problemas motivacionales a explorar o locomotores. Las barras representan el promedio +/- S.E.M. N=23 (B6SJL = 9 en total, 5 en filtro y 4 en polución; *C9ORF72* = 14 en total, 6 en filtro y 8 en polución). Análisis estadístico realizado por ANOVA de una vía. Sin diferencias significativas.

7.2 El modelo *C9ORF72* y controles expuestos a la polución ambiental del aire no presentaron déficit de locomoción ni una conducta ansiosa en la prueba de campo abierto.

La prueba del campo abierto (OFT, por las siglas en inglés de *Open Field Test*) consistió en dejar explorar al animal de forma libre y espontánea durante un período de 5 minutos dentro del campo de prueba. Mediante esta prueba se obtuvo información asociada a la conducta ansiosa y locomoción del animal. Su cuantificación se realizó mediante el parámetro thigmotaxis, que corresponde al tiempo en que el animal explora la periferia del box, considerando el tiempo en que el animal estuvo en movimiento en los bordes de la caja y el movimiento de este más el tiempo que estuvo estático. Además, se cuantificó el tiempo de exploración en el centro del aparato y la distancia recorrida (frecuencia de transiciones por toda la caja).

La **Figura 5A** corresponde al gráfico de thigmotaxis, donde en base a los resultados obtenidos, no se mostraron diferencias significativas. En el gráfico de la **Figura 5B** también se realizó la cuantificación de thigmotaxis, pero se

consideró además el tiempo en que el animal estuvo detenido (quieto, acicalándose, posado en sus patas traseras explorando el borde de la arena, etc.). Estos resultados tampoco mostraron diferencias significativas, lo que sugiere que los animales bajo ninguna condición, ya sea filtro o polución, con o sin riesgo genético, poseen una conducta del tipo ansiosa.

En la **Figura 5C** se representa el tiempo cuantificado en que los animales exploraron el centro del box. Aquellos que exploran o pasan un mayor tiempo en el centro de la cámara se consideran animales no ansiosos y de acuerdo con los resultados obtenidos no hay diferencias significativas tanto para los controles en ambas condiciones como para el modelo con riesgo genético. En la **Figura 5D**, el gráfico nos ilustra la distancia recorrida total por el campo de prueba medido por el número de transiciones (cruces entre cuadrantes) que realizó el animal, obteniendo información respecto a la movilidad y locomoción. Según los resultados obtenidos, no hubo diferencias significativas tanto en el grupo control, como en el modelo *C9orf72*. Esto significa que ninguno de los dos grupos posee problemas de locomoción y ésta tampoco se acentúa en presencia de polución ambiental del aire.

Cabe destacar que los intentos de escape de la caja de los animales C9BAC, fue el comportamiento más repetitivo. Eran los más hiperactivos cuando estaban dentro del aparato. Solían posarse en sus patas traseras, usualmente cerca de los bordades de la cámara, muchas veces de estando apoyados a la muralla. Estas observaciones fueron solo cualitativas.

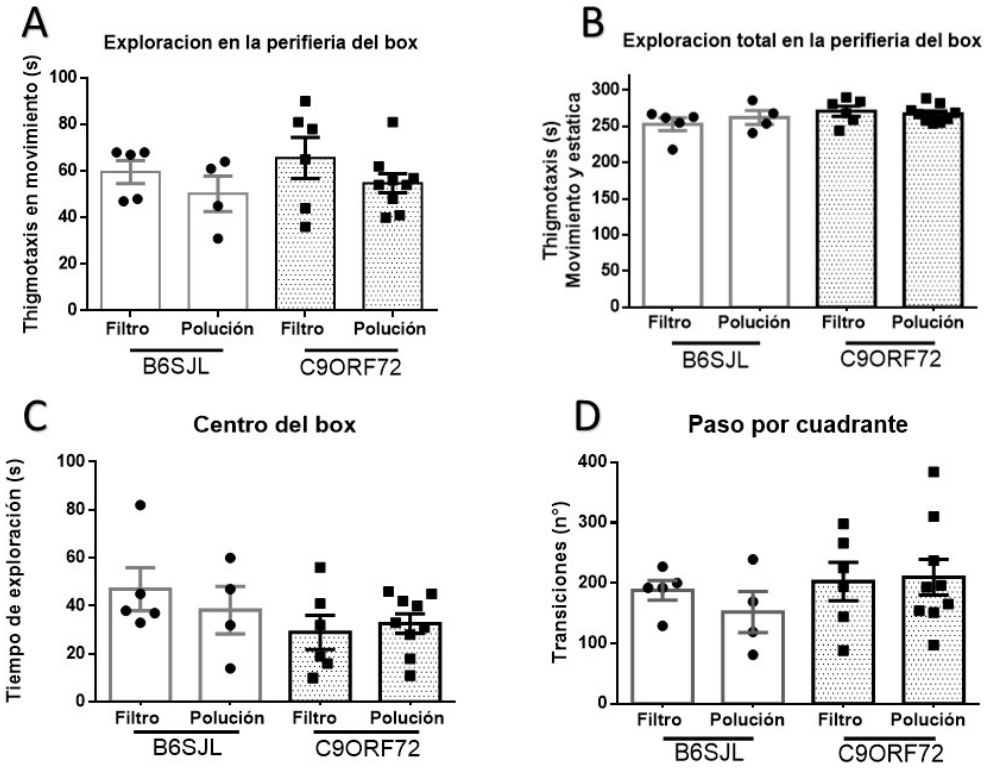


Figura 5: El modelo *C9ORF72* y controles expuestos a la polución ambiental urbana no presentaron déficit locomotor ni conducta ansiosa en la prueba de campo abierto. La prueba del campo abierto nos entrega información respecto a la ansiedad y función motora mediante la thigmotaxis (exploración de la periferia del box) exploración del centro del box y las transiciones realizadas entro de él. En **(A),** se grafica la thigmotaxis del animal solo en movimiento. **(B),** thigmotaxis del animal considerando tanto el movimiento como su tiempo en reposo. **(C),** Tiempo de exploración del centro del box y **(D),** frecuencia de transiciones realizadas dentro del box. Todos los tiempos de exploración fueron medido en segundos. Las barras representan el promedio +/- S.E.M. N = 24 (B6SJL = 9 en total, 5 en filtro y 4 en polución; *C9ORF72* = 15 en total, 6 en filtro y 9 en polución). Análisis estadístico realizado por ANOVA de una vía. Sin diferencias significativas.

7.3 El modelo *C9ORF72* y controles expuestos a la polución ambiental del aire no presentaron déficit de locomoción y/o una conducta ansiosa en la prueba del laberinto elevado.

La prueba del laberinto elevado (EPM por sus siglas en inglés, *Elevated Plus Maze*) consistió en dejar el animal en el centro del aparato mirando hacia uno de los brazos cerrados, luego se les dejó explorar por 10 minutos. En esta prueba

se cuantificó el tiempo que estuvieron en los brazos abiertos y brazos cerrados de la plataforma, además de las transiciones que realizó en está. La exploración de los brazos nos entrega información sobre la conducta o estado de ansiedad de un animal: la exploración en el brazo abierto se asocia a una conducta no ansiosa, en cambio la exploración en el brazo cerrado está asociada a una conducta ansiosa (Kraeuter et al., 2018; Yasuyuki et al., 2018). El número de transiciones (frecuencia) realizados en los brazos de la plataforma se asocian a locomoción y movilidad.

En la **Figura 6A** se grafica la información sobre el tiempo de exploración de los animales en el brazo abierto de la plataforma. De acuerdo con los resultados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de animales para ninguna de sus condiciones. Sin embargo, hubo una tendencia por parte del modelo *C9ORF72* en la condición de polución del aire a explorar mayor cantidad de tiempo el brazo abierto, Se analizaron los datos de filtro y polución mediante prueba de *t*-Student con resultados significativos (Figura 7). Respecto a los animales control, no observamos diferencias significativas dentro del grupo, por ende, hay una igual exploración del brazo abierto.

En el gráfico de la **Figura 6B** se ilustra el tiempo de exploración en el brazo cerrado. Se obtuvo mediante su análisis que la exploración en este brazo difiere significativamente entre los animales C9ORF72 *versus* controles (*P*<0,001"***"). El análisis *a posteriori* arrojó que los animales controles en sus respectivas condiciones de aire (P<0,01 "**") difieren en la exploración del brazo cerrado respecto a los animales C9ORF72 en polución del aire. Respecto al modelo C9ORF72 el análisis arrojo que en aire filtrado exploraron un mayor tiempo el brazo cerrado, a diferencia de sus pares en polución del aire (*P*<0,001 "###").

Finalmente, en la **Figura 6C,** el grafico nos entrega información sobre la frecuencia de transiciones realizadas en la plataforma y de acuerdo con los resultados obtenidos el análisis no arrojó diferencias significativas comparando todos los grupos (ANOVA). Al analizar los datos de filtro y polución de los animales controles mediante prueba de *t*-Student, esta arroja diferencias

significativas (P<0.01, datos no mostrados). Por lo tanto, estos datos sugieren que los animales controles producto de la exposición a la polución del aire presentaron una reducción en las habilidades motoras, mientras que los animales C9BAC no presentaron problemas de locomoción y/o movilidad.

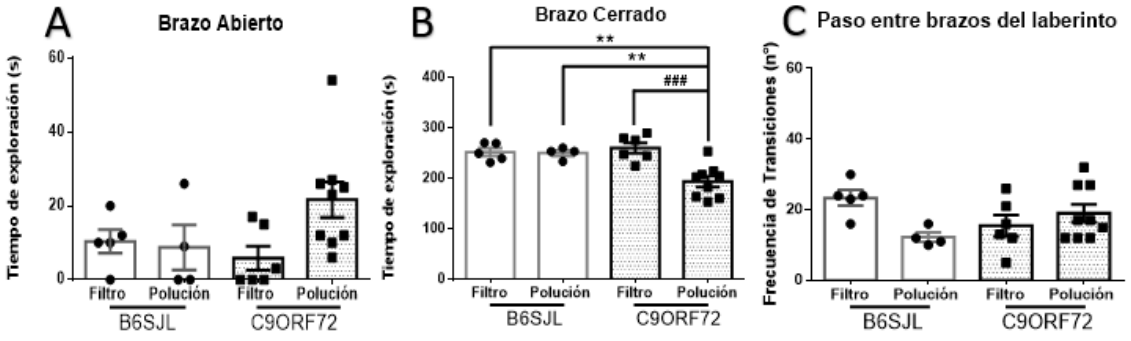


Figura 6: Comportamiento del modelo de *C9ORF72* y controles expuestos a la polución del aire en la prueba del laberinto elevado. En **(A),** la gráfica nos muestra el tiempo de exploración del brazo abierto. En (**B),** el tiempo de exploración del brazo cerrado del laberinto y en (**C),** la frecuencia de transiciones realizadas entre los brazos del laberinto. Barras presentan media y S.E.M. N=24 (B6SJL = 9 en total, 5 en filtro y 4 en polución; C9ORF72 = 15 en total, 6 en filtro y 9 en polución). Análisis estadístico realizado por ANOVA de una vía, ***P*<0,001** (***) y análisis a *posteriori,* test de Tukey, ***P*<0,001** (###) y ***P*<0,01** (**). Para test de Tukey con símbolo * B6SJL *versus C9ORF72*, y con símbolo # Filtro *versus* polución en C9ORF72.

En la **Figura 7** se grafica el análisis de la tendencia observada previamente (Figura 6A), de los animales C9BAC en la exploración del brazo abierto. El análisis (*t*-Student) arrojó diferencias significativas (*P*<0,05 "*") entre condiciones, donde efectivamente, el modelo *C9ORF72* posee un mayor tiempo de exploración del brazo abierto cuando ha sido expuesto a la polución ambiental del aire. La presencia del "outlayer" en la columna de polución, al retirarlo, el resultado sigue siendo estadísticamente significativo.

Este resultado concuerda con el análisis del tiempo de exploración del brazo cerrado, donde estos mismos animales en la condición de polución del aire mostraron el menor tiempo de exploración. Este análisis sugiere que los animales en polución del aire no presentarían una conducta del tipo ansiosa dado al tiempo que pasó en el brazo abierto, por lo tanto, se plantea la idea de una conducta desinhibida potenciada por la exposición a polución del aire urbano.

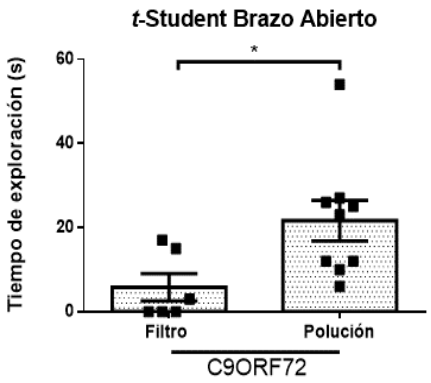


Figura 7: El modelo *C9ORF72* expuesto a la polución del aire presentó una conducta desinhibida en la prueba del laberinto elevado. En la exploración del brazo abierto del laberinto elevado mediante el análisis de *t*-Student, arrojó que el modelo de DFT expuesto a la polución ambiental del aire urbano estuvo un mayor tiempo en el brazo abierto, resultado que se contrapone a un comportamiento del tipo ansioso, sugiriendo una conducta desinhibida. Barras presentan media y S.E.M. prueba de *t*-Student, 2 colas. Diferencias significativas ***P*<0.05** (*). Para prueba de *t*-Student con símbolo * Filtro versus Polución.

7.4 El modelo *C9ORF72*, pero no los controles, presentó problemas de sociabilidad sin alterar la memoria social mediante la prueba de interacción social cuando se ha expuesto a la polución ambiental del aire.

En la prueba de interacción social de 3 cámaras (3CSI por sus siglas en inglés, *three Chamber Social Interaction*) cuya duración total es de 25 minutos y es separada en 2 sesiones. En los primeros 5 minutos se habituó a los animales al campo, luego de ello se inició la sesión I: “preferencia social”, donde se dejó explorar por 10 minutos. Esta sesión entrega información sobre la afiliación y motivación social del animal. Finalmente, los 10 minutos restantes correspondieron a la sesión II: “novedad social”, la que otorga información respecto a la novedad, curiosidad por un nuevo individuo y memoria social (Silverman et al., 2010; Kaidanovich-beilin et al, 2011).

En la **Figura 8A** y **8B** se ilustran las sesiones I y II en animales B6SJL. En el gráfico de la **Figura 8A**, “preferencia social” y en la **Figura 8B**, “novedad social” no se observaron diferencias significativas en el análisis estadístico para ninguna de las 2 sesiones de los animales controles. Esto no implica que la prueba no

funciono, pues en **B** se observa la tendencia tanto del grupo Filtro como el grupo Polución del aire a explorar al sujeto novedoso más que al familiar. Por lo tanto, se debe al bajo número de individuos.

La **Figura 8C** y **8D** corresponden a la sesión I y II cuantificadas en el modelo *C9ORF72*. En la **Figura 8C**, "preferencia social", se obtuvo diferencias significativas entre las condiciones de aire filtrado y polución del aire a lo que respecta el tiempo de exploración de las cámaras (P<0,0001 "****"). El análisis *post hoc* (P<0,05 "*") muestra que el modelo de DFT expuesto a la polución del aire exploró significativamente más la cámara vacía prefiriendo el aislamiento, por tanto, sugiriendo una conducta apática. En la **Figura 8D**, "novedad social", hubo diferencias significativas (ANOVA P<0,01 "**") entre los grupos de aire filtrado y polución del aire. Finalmente, el modelo *C9ORF72* en polución del aire distinguió entre el sujeto familiar y novedoso (P<0,05 "*"), y aunque no hay diferencias significativas en el grupo de aire filtrado, los animales demostraron una tendencia a la interacción con el sujeto novedoso respecto al familiar. Estos datos sugieren una memoria social intacta, aun en presencia de la polución del aire.

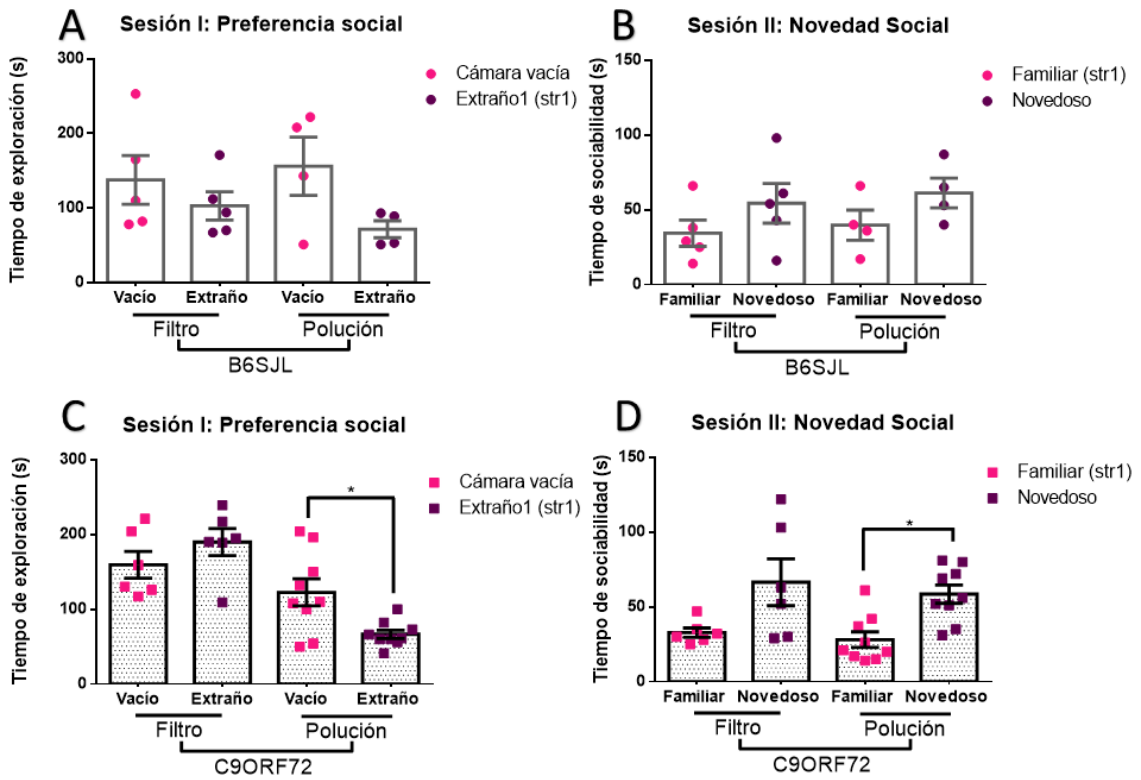


Figura 8: Sociabilidad y memoria social del modelo *C9orf73* y controles expuestos la polución del aire en la prueba de interacción social de 3 cámaras. La prueba constó de 2 sesiones evaluando la sociabilidad y la memoria social. Sesión I (cámara vacía y sujeto extraño (str1) y sesión II (sujeto familiar (str1) y novedoso) respectivamente. En (**A),** se ilustra la preferencia social. Se evaluó el tiempo de exploración entre el sujeto extraño y la arena vacía. (**B),** Corresponde a novedad social. Se evaluó la exploración entre el sujeto familiar y el novedoso. (**A)** y (**B)** representaron a los controles, sin diferencias significativas. (**C)** y (**D)** Corresponde a la preferencia y novedad social respectivamente para el modelo *C9orf72*. Respecto al análisis de preferencia social, arrojó diferencias significativas. (ANOVA ***P*<0,05** "*"). Para este mismo, el análisis a *post hoc* arrojo un ***P*<0,05** (*) respecto al tiempo de exploración en la cámara vacía *versus* el extraño1 en la condición de polución, sugiriendo una conducta apática. Referente a la novedad social se obtuvo diferencias significativas (ANOVA ***P*<0,01** "**"). el análisis *a post hoc* arrojó diferencia de ***P*<0,05** (*) en la condición de polución del aire, sugiriendo el reconocimiento del sujeto novedoso. Barras presentan media y S.E.M. N=24 (B6SJL = 9 en total, 5 en filtro y 4 en polución; C9ORF72 = 14 en total, 6 en filtro y 9 en polución). Análisis estadístico realizado por ANOVA de una vía. Significancia de ***P*<0,0001** (****) y ***P*<0,05** (* o #). Para ANOVA con símbolo * objeto viejo *versus* objeto nuevo, y con el mismo familiar *versus* novedoso.

7.5 Análisis de presencia de marcas histopatológicas asociadas a inflamación (GFAP e Iba1) en corteza frontal e hipocampo dorsal.

Previo a abordar el segundo objetivo, se estandarizó el anticuerpo contra la proteína Iba-1 (Abcam, ab5076) para la detección de microglía. Producto no testeado previamente para IF de tejido en el laboratorio de la Dra. van Zundert. La estandarización está basada en Jara et al., (2017). Para esto se utilizó un modelo murino de ELA (hSOD^{G93A}) donde según los autores, existe reactividad para esta marca de microglía en la corteza frontal asociativa y motora.

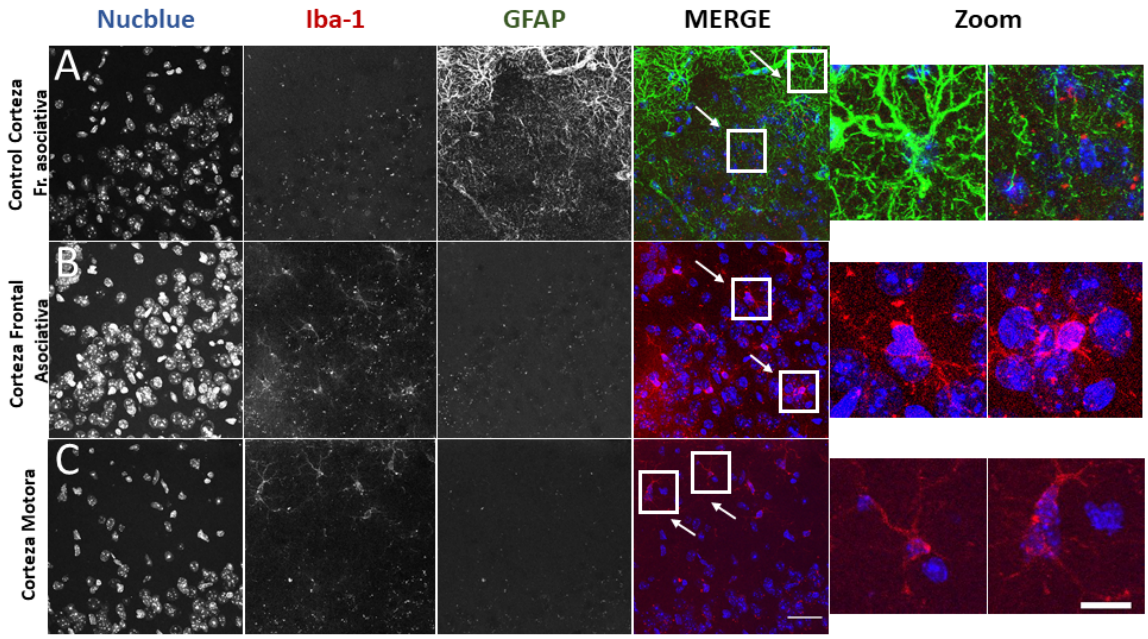


Figura 9: Inmunofluorescencia de tejido para la estandarización del anticuerpo Iba-1 en el modelo hSOD^{G93A}. Estandarización el anticuerpo Iba-1 en el modelo de ELA donde se a evidenciado microglías activadas (Jara et al., 2017). **(A),** corresponde a control sin anticuerpo primario para iba-1 en corteza frontal asociativa. **(B),** IF en corteza frontal asociativa y **(C),** en corteza motora. Las flechas enfocan al zoom realizado a derecha del merge (superposición). Tanto en corteza frontal asociativa como motora se observaron microglías activadas, detectadas por el anticuerpo Iba-1. Se observan las ramificaciones desde el citoplasma en diversas direcciones, apreciado en el Zoom. Las imágenes se obtuvieron del microscopio Leica SP8 a 60x. Escala merge = 40 µm; Escala del acercamiento (zoom) = 13 µm. Los campos corresponden a Nucblue (1:200), GFAP (1:1000), Iba-1 (1:1000). Alexa fluor (1:500).

7.6 El modelo *C9ORF72* no presentó un aumento de células GFAP e Iba-1 positivas en la corteza frontal asociativa producto de la exposición a la polución ambiental del aire.

La **Figura 10** corresponde al set de imágenes representativas de las IF realizadas al modelo DFT y sus respectivos controles en las condiciones de aire filtrado y polución del aire en la corteza frontal asociativa. Los campos que se titulan como núcleos+astrocitos+microglías representan a los marcadores Nucblue, GFAP e Iba-1, respectivamente. Sucesivo a estos, se presenta la colocalización (merge) de los 3 campos anteriores.

En la **Figura 10A**, se observan las imágenes de IF, representativas del conteo de células positivas de los animales controles en sus respectivas condiciones. Con relación a cuantificación, no se pudo realizar análisis estadístico para los animales controles dado el bajo número de individuos (N=2 Filtro; N=2 Polución).

En la misma **Figura 10B**, se muestra las IF correspondientes al modelo de DFT. La cuantificación de GFAP/Iba-1 se ilustra en la **Figura 10C** y **D**. La cantidad de células positivas para GFAP e Iba-1 no cambió producto de la exposición a la polución ambiental del aire. No se observaron diferencias significativas.

Tanto para los animales C9BAC como para los animales controles, observamos que la ubicación de los astrocitos se limitaba solo en las primeras capas de la corteza y ausentes en el resto del campo. Por el contrario, las microglías se localizaron en todo el campo de la foto.

Se concluye que no hay cambios en la corteza frontal asociativa del modelo *C9ORF72* respecto al aumento de células $GFAP^+$ e Iba-1^+ producto de los 6 meses de exposición a la polución ambiental del aire urbano de Santiago.

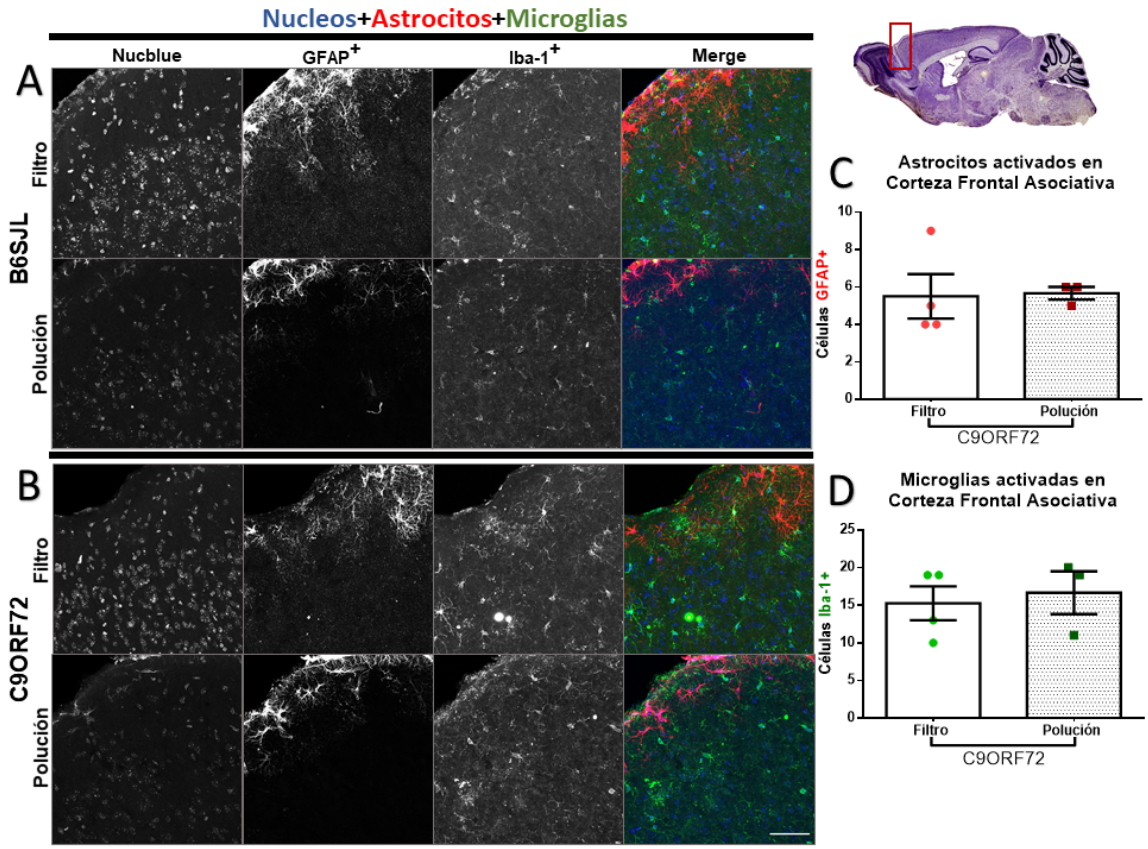


Figura 10: Inmunofluorescencia de astrocitos y microglías en la corteza frontal asociativa. **(A),** Imagen representativa de los animales control B6SJL en sus respectivas condiciones y de igual manera en **(B),** a los animales de riesgo genético C9BAC**.** Células GFAP^{+} (astrocitos) se ubican en las primeras capas de la corteza, sin embargo, solo células Iba-1^{+} (microglías) se distribuyen en todo del campo de la imagen. Dentro de la figura en **(C)** y **(D),** se ilustra la cuantificación de las células positivas para GFAP e Iba-1 respectivamente para los animales C9BAC. En ambos análisis no se observó un cambio significativo por medio de la prueba de *t*-Student en el número de células GFAP^{+} e Iba-1^{+}. Las barras representan media +/- S.E.M. Las imágenes se obtuvieron del microscopio Leica SP8 a 60x. Escala 60µm. Los campos corresponden a Nucblue (1:200), GFAP Dako (1:1000) e Iba-1 (1:1000). Alexa Fluor (1:500). *C9ORF72* N = 7 en total, 4 Filtro y 3 Polución.

7.7 El modelo *C9ORF72* no presentó un aumento de células GFAP e Iba-1 positivas en el giro dentado del hipocampo dorsal producto de la exposición a la polución ambiental del aire.

La **Figura 11** corresponde al set de imágenes representativas de las IF realizadas al modelo DFT y sus respectivos controles en las condiciones de aire filtrado y polución del aire en el giro dentado del hipocampo dorsal. Los campos que se titulan como núcleos+astrocitos+microglías representan a los marcadores Nucblue, GFAP e Iba-1, respectivamente. Sucesivo a estos se presenta la colocalización (merge) de los 3 campos anteriores.

La **Figura 11A** corresponde a las imágenes de IF, representativas del conteo de células positivas de los animales controles en sus respectivas condiciones. En relación con la cuantificación, no se realizó estadística para los animales controles dado el bajo número de individuos (N=2 Filtro; N=2 Polución).

En La **Figura 11B** se observan las IF correspondientes al modelo de DFT. La cuantificación de células GFAP/Iba-1 se ilustran en la **Figura 11C** y **D,** respectivamente. El número de astrocitos y microglías activadas no aumentó producto de la exposición a la polución ambiental del aire. No se observó diferencias significativas.

En resumen, no hay cambios en el giro dentado del hipocampo dorsal, en el modelo *C9ORF72*, respecto al número astrocitos y microglías activados, detectados por los anticuerpos GFAP e Iba-1 cuando se ha estado expuesto a la polución ambiental del aire urbano de Santiago.

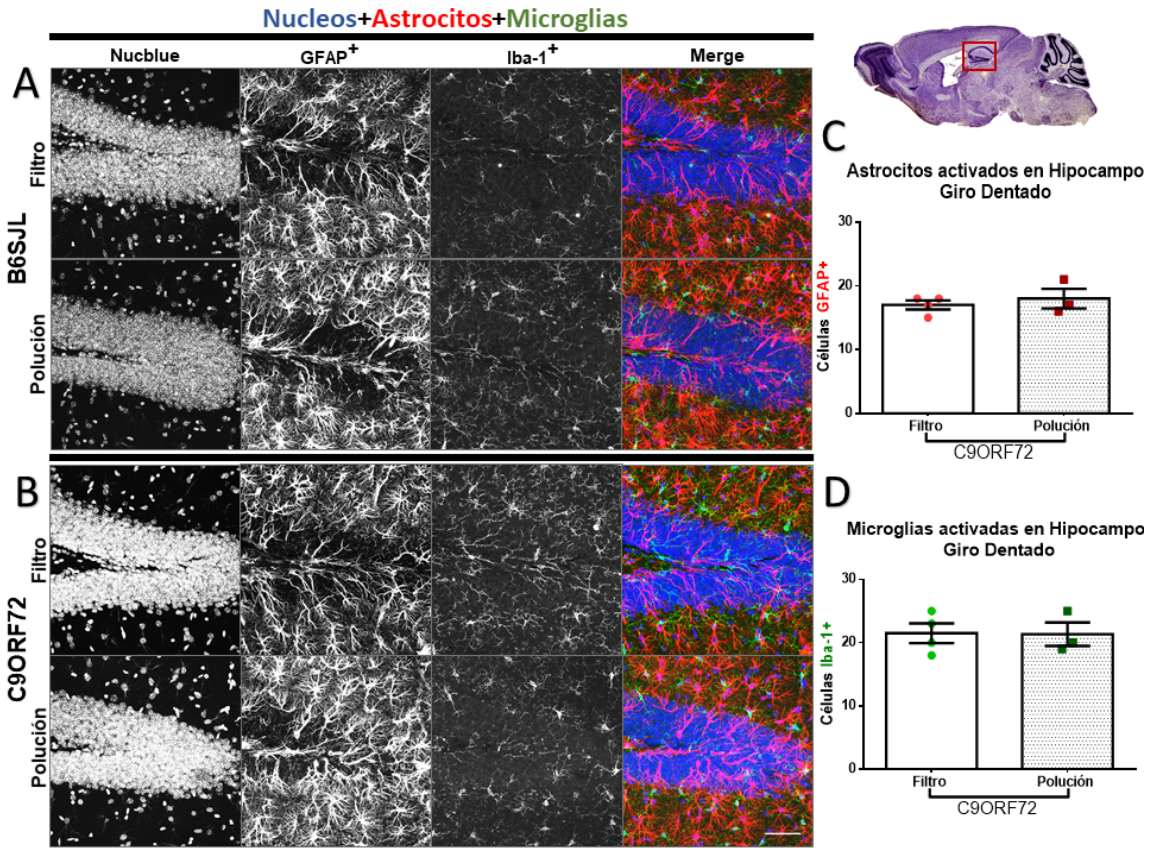


Figura 11: Inmunofluorescencia de astrocitos y microglías en el giro dentado de hipocampo dorsal. (A), Imagen representativa de los animales control B6SJL en sus respectivas condiciones y de igual manera para el modelo *C9ORF72* en **(B)**. Dentro de la figura en **(C)** y **(D),** ilustran la cuantificación de las células GFAP^{+}-astrocitos e Iba-1^{+}-microglías respectivamente para el modelo de DFT. En ambos análisis no se observó un cambio significativo por medio de la prueba de *t*-student en el número de células GFAP^{+} o Iba-1^{+}. Las barras representan media +/- S.E.M. Las imágenes se obtuvieron del microscopio Leica SP8 a 60x. Escala 60µm. Los campos corresponden a Nucblue (1:200), GFAP Dako (1:1000) e Iba-1 (1:1000). Alexa Fluor (1:500). *C9ORF72* N = 7 en total, 4 Filtro y 3 Polución.

7.8 La polución ambiental del aire contribuyó al aumento de astrocitos activados en el CA1 del hipocampo dorsal, pero no de microglías, en el modelo *C9ORF72*.

La **Figura 12** corresponde al set de imágenes representativas de las IF realizadas a los animales C9BAC y sus respectivos controles en las condiciones de aire filtrado y polución del aire en el CA1 del hipocampo dorsal. Los campos que se titulan como núcleos+astrocitos+microglías representan a los marcadores Nucblue, GFAP e Iba-1, respectivamente. Sucesivo a estos se presenta la colocalizacion (merge) de los 3 campos anteriores.

La **Figura 12A**, corresponde a las imágenes de IF, representativas del conteo de células positivas de los animales controles en sus respectivas condiciones. En relación con la cuantificación, no se realizó análisis estadístico para los animales controles dado el bajo número de individuos (N=2 Filtro; N=2 Polución).

En la **Figura 12B** se muestran las imágenes representativas correspondientes al modelo de DFT. La cuantificación de células GFAP/Iba-1 se muestra en la **Figura 12C** y **D** respectivamente. Como resultado, el análisis estadístico arrojo diferencias significativas (P<0,05) respecto a las células GFAP$^+$ en los animales C9BAC, sugiriendo un aumento de astrocitos activados en la condición de polución del aire. Con relación a las células Iba-1$^+$, el análisis estadístico no mostró ningún cambio significativo respecto a su cuantificación.

En resumen, se observa claramente en la imagen representativa del modelo de DFT que en la condición de polución del aire los astrocitos activados (detectados por GFAP) abarcan todo el campo de la foto, respecto a sus pares en la condición de aire filtrado, además se pudo apreciar que la estructura/morfología de las proyecciones y soma de las células GFAP$^+$ eran diferentes en las IF de los animales C9BAC en polución del aire respecto a sus pares en aire filtrado. Este patrón también se observó para las células Iba-1$^+$ en el mismo modelo e igual condición (Figura 15).

Por tanto, la exposición a la polución ambiental del aire urbano de Santiago generó un aumento de astrocitos, sugiriendo astrogliosis en la región CA1 del hipocampo dorsal, sin afectar la activación de microglías.

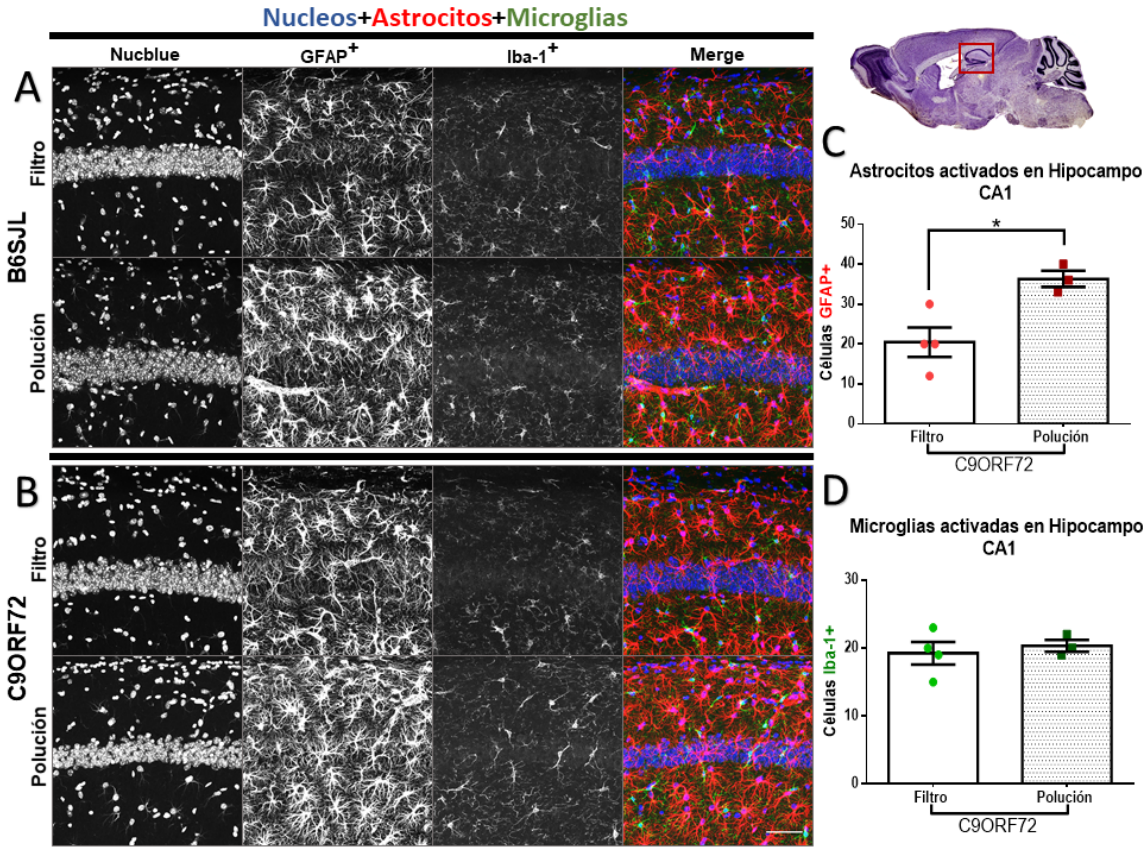


Figura 12: Astrogliosis en el CA1 del hipocampo dorsal producto de la exposición a la polución ambiental del aire. **(A),** representa a los animales B6SJL en sus respectivas condiciones y de igual manera en **(B),** para los animales C9BAC. Dentro de la figura en **C** y **D,** ilustran la cuantificación de las células GFAP^{+}-astrocitos e Iba-1^{+}-microglías respectivamente para el modelo *C9ORF72*. En **(C),** mediante el análisis de la prueba de *t*-Student con una diferencia significativa de ***P*<0,05** (*) sugiere el aumento de células GFAP^{+}-astrocitos. En **(D),** no hubo diferencias significativas por medio de la prueba de *t*-Student para microglías. Las barras representan media +/- S.E.M. Para prueba de *t*-Student con símbolo * Filtro *versus* Polución. Las imágenes se obtuvieron del microscopio Leica SP8 a 60x. Escala 60µm. Los campos corresponden a Nucblue (1:200), GFAP Dako (1:1000) e Iba-1 (1:1000). Alexa Fluor (1:500). *C9ORF72* N = 7 en total, 4 Filtro y 3 Polución.

7.9 El modelo *C9ORF72* no presentó un aumento de células GFAP e Iba-1 positivas en CA3 del hipocampo dorsal producto de la exposición a la polución ambiental del aire.

La **Figura 13** corresponde al set de imágenes representativas de las IF realizadas a los animales C9BAC y sus respectivos controles en las condiciones de aire filtrado y polución del aire en la región el CA3 del hipocampo dorsal. Los campos que se titulan como núcleos+astrocitos+microglías representan a los marcadores Nucblue, GFAP e Iba-1, respectivamente. Sucesivo a estos se presenta la colocalización (merge) de los 3 campos anteriores.

La **Figura 13A**, corresponde a las imágenes de IF, representativas del conteo de células positivas de los animales controles en sus respectivas condiciones. En relación con la cuantificación, no se realizó estadística para los animales controles dado el bajo número de individuos (N=2 Filtro; N=2 Polución).

La **Figura 13B** muestra las IF representativas del modelo DFT. La cuantificación de células GFAP+/Iba-1+ se ilustra en las **Figuras 13C** y **D,** respectivamente. Con relación a la cuantificación el *t*-Student arrojó que no hay diferencias significativas a lo que respecta al número de células $GFAP^+$ e $Iba\text{-}1^+$.

Por lo tanto, no se observó diferencias en el número de astrocitos o microglías activadas detectados por los anticuerpos GFAP e Iba-1 en la región CA3 del hipocampo dorsal en el modelo de DFT producto de la exposición a la polución ambiental del aire urbano de Santiago.

Cabe destacar que, al igual que en CA1 fue posible apreciar que la estructura/morfología de las proyecciones y soma de las células $GFAP^+$ eran diferentes en las IF de los animales C9BAC en polución del aire respecto a su par en aire filtrado. Este patrón también se observó para las células $iba\text{-}1^+$ en el mismo modelo e igual condición (**Figura 16**).

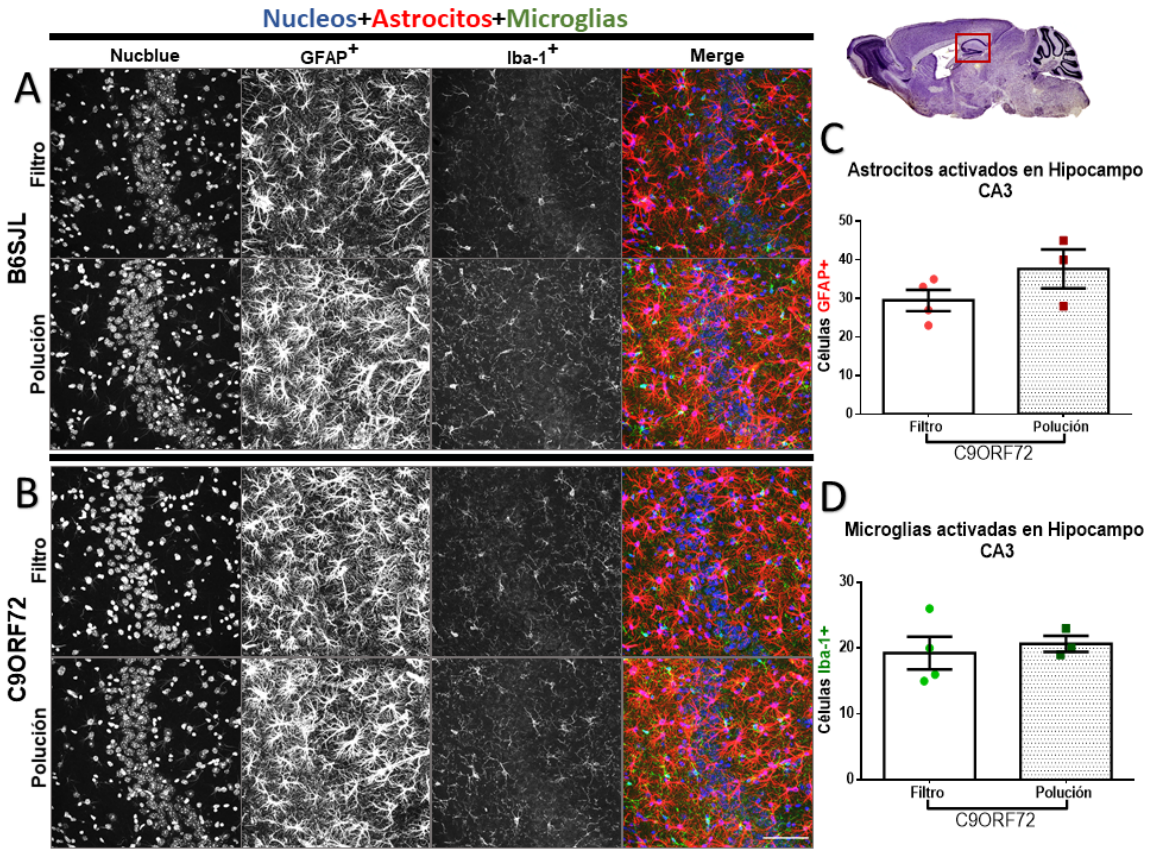


Figura 13: Inmunofluorescencia de astrocitos y microglías en CA3 del hipocampo dorsal. **(A)** Imagen representativa de los animales B6SJL en sus respectivas condiciones y de igual manera en **(B)** se presentan los animales C9BAC. Dentro de la figura en **(C)** y **(D)** ilustran la cuantificación de las células GFAP⁺-astrocitos e Iba-1⁺-microglías respectivamente para el modelo de DFT. En ambos análisis no se observó un cambio significativo por medio de la prueba de *t*-Student en el número de células GFAP⁺ o Iba-1⁺. Las barras representan media +/- S.E.M. Las imágenes se obtuvieron del microscopio Leica SP8 a 60x. Escala 60µm. Los campos corresponden a Nucblue (1:200), GFAP Dako (1:1000) e Iba-1 (1:1000). Alexa Fluor (1:500). *C9ORF72* N = 7 en total, 4 Filtro y 3 Polución.

8. DISCUSIÓN.

8.1 Presencia de $PM_{2,5}$ y NPs en la polución ambiental urbana del AMS de Chile y su contribución en la inducción del fenotipo clínico de DFT en el modelo murino *C9ORF72*.

A la fecha el AMS corresponde a una de las 4 ciudades de Chile que críticamente sobrepasa las normas establecidas tanto por la agencia nacional de la calidad del aire como de la OMS, excediendo en los meses de invierno el estándar de 50 $\mu m/m^3$ de $PM_{2,5}$, causando serias consecuencias a la salud en la población (Liu et al 2019; Toro et al., 2019). La evidencia plantea que producto de las características geográficas y meteorológicas del AMS, el estancamiento del aire y la precaria ventilación son las principales causas de la polución del aire urbano, viéndose favorecido el proceso de transformación química atmosférica, propuesto como la principal causa de formación y toxicidad del PM y NPs, además, corroborando la idea de que las NPs poseen su origen en el exterior (Maher et al., 2016; 2019; Toro et al., 2019). En Prieto-Parra et al. (2017) corroboraron que la exposición crónica a $PM_{2,5}$ en el AMS causó síntomas respiratorios en niños no asmáticos y los aumenta en aquellos que padecen la condición.

En nuestro laboratorio se estandarizo el modelo: "*real-world exposure to urban air pollution"* (modelo real de exposición a polución ambiental urbana). La **Figura 14** describe los resultados de la tesis doctoral de Nur Jury Garfe (datos publicados en Calderón-Garcidueñas et al. 2020) en la obtención de información de tráfico aéreo (material particulado disperso) de $PM_{2,5}$ y NPs en el AMS del año 2017. Este modelo experimental fue utilizado en esta tesis y en la colaboración con Calderón-Garcidueñas et al. 2020. Con esta metodología de exposición a contaminación urbana los ratones recibieron aire filtrado y aire directamente de la polución ambiental urbana del AMS.

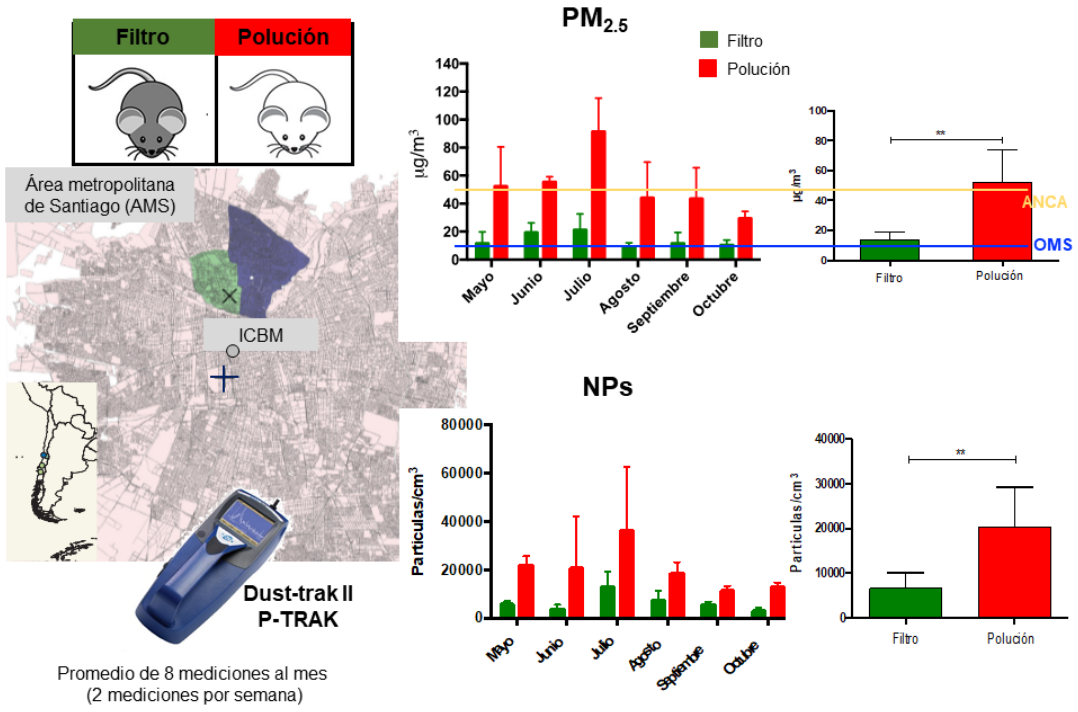


Figura 14: Obtención de material particulado disperso en el AMS. En los gráficos de **PM2,5** y **NPs** se ilustran las mediciones para el rack filtro (verde) y el rack polución (rojo). Las mediciones fueron comparadas con las cifras oficiales de la estación de monitoreo del Sistema de información de calidad del aire (SINCA) ubicada en parque O'higgins (cruz azul). Los resultados arrojaron que en la medición del material particulado en el rack polución la presencia de $PM_{2.5}$ y NPs del ambiente urbano es significativamente mayor al rack con aire filtrado, destacando la eficiencia del filtro. Sugiriendo la presencia tanto de $PM_{2,5}$ y NPs en el AMS. Se utilizó Dusttrak para la medición de $PM_{2.5}$ Y P-TRAK para medir NPs. Punto gris Instituto ciencias biomédicas (IBCM). Línea celeste y amarilla corresponden a las normas propuestas por la OMS y la agencia nacional de la calidad del aire respectivamente. Adaptado de Calderón-Garcidueñas et al., 2020; Toro et al., 2019; Liu et al., 2019.

Nuestros resultados experimentales en la exposición a 6 meses de polución ambiental del aire del AMS del modelo *C9ORF72* (Peters et al., 2015), que posee riesgo genético, pero no presenta fenotipo descrito para la DFT, expuso características patológicas propias de esta enfermedad y como fue mencionado al principio de este trabajo la DFT posee una variedad de fenotipos clínicos y para efectos de esta discusión, se enfocara en la DFT de variante de conducta (bv-FTD), pues según la evidencia de Moore et al. (2019), este fenotipo clínico corresponde al diagnóstico más significativo a nivel global, además, sobre el 40% de quienes son diagnosticados con bv-FTD son portadores de la mutante C9ORF72, siendo este factor de riesgo genético el de mayor incidencia.

8.2 Deterioro cognitivo en la memoria de reconocimiento de objetos en la patogénesis de DFT del modelo murino *C9ORF72,* producto de la exposición a la polución del aire urbano.

En esta tesis se analizó la memoria de reconocimiento de objetos, un tipo de memoria que es símil en roedores a la memoria episódica humana. Es estudiada mediante la prueba NOR y requiere del control de múltiples áreas frontotemporales como la corteza frontal, la que guía adecuadamente el proceso de recuperación la memoria, asociada a su contexto y el lóbulo medio temporal donde las cortezas perirrinal y entorrinal lateral, en conjunto con el hipocampo, se encargan de la formación de la familiaridad (sesión I NOR) y la codificación de la novedad (sesión II NOR) de la memoria de objetos respectivamente (Antunes et al., 2012; Preston y Eichenbaum et al., 2013; Vogel-Ciernia et al., 2014; Strange et al., 2016; Denninger et al., 2018).

En lo que respecta a nuestros animales *B6sjl*, en la prueba del NOR, los resultados estadísticos arrojaron que, tanto en las condiciones de filtro como en polución, exploraron el objeto nuevo significativamente más que el viejo, sugiriendo que no hubo reducción en la codificación por la novedad de los objetos presentados. Sin embargo, los animales controles en polución del aire demostraron una reducción en el tiempo de reconocimiento de los objetos viejo y nuevo (reducción por la novedad de los objetos), por lo que se pensó que efectivamente la polución del aire podría generar un efecto negativo en animales sanos. No obstante, con el análisis del índice de discriminación se confirma con un valor del D2 superior a 0,5 tanto para los animales que estuvieron en aire filtrado como en polución del aire, que distinguen significativamente el objeto viejo del objeto nuevo. Creemos que para sugerir que los animales sanos presentasen signos de pérdida de memoria episódica se requiere, enfáticamente, aumentar el número de animales y por el otro, un mayor tiempo de exposición a polución del aire urbano.

Los animales *C9ORF72*, en la prueba NOR, mediante la prueba estadística (ANOVA) no arrojaron diferencias significativas en el tiempo de exploración de los objetos viejo y nuevo, esto valido para ambas condiciones, no obstante, se observó una tendencia por parte de aquellos animales que estuvieron en aire filtrado al reconocimiento del objeto nuevo por sobre el viejo. En el análisis de la prueba de *t*-Student para el modelo *C9ORF72* presente en aire filtrado arrojó que no hubo un déficit cognitivo en la prueba de NOR, pues exploraron el objeto nuevo significativamente. Por el contrario, en sus pares expuestos a la polución del aire, no hubo una diferencia significativa en la exploración de los objetos viejo y nuevo. Esto sugiere una reducción en la capacidad por la novedad, analizada en la sesión de prueba (test).

Para el índice de discriminación, que revela información respecto a la discriminación de los objetos presentados, Akkerman et al. (2012) sugiere que los resultados sean sujetos a análisis estadístico tanto por ANOVA como prueba de *t*-Student para un mejor entendimiento de los resultados.

El análisis por ANOVA sugirió que los animales C9BAC en aire filtrado distinguen entre los objetos presentados con un D2 superior a 0,5, lo que es similar al resultado de los animales controles, pero difiere significativamente de sus pares *C9ORF72* en polución del aire. Respecto a los análisis de prueba de *t*-Student, este reveló que el D2 para los animales *C9ORF72* en la condición de polución del aire fue significativamente menor a sus pares en aire filtrado, sugiriendo la no distinción de los objetos viejo y nuevo. Este resultado más la reducción en la capacidad por la novedad, indicaría la inducción de un declive cognitivo por medio de la prueba de NOR.

Asociaciones epidemiológicas y trabajos *in vivo* indican que la exposición crónica a polución del aire ($PM_{2,5}$ y NPs) impacta negativamente el desarrollo cognitivo (Babadjouni et al., 2017; Schicowsky et al., 2020) y se ha visto que esto es un más perjudicial cuando se padece de demencia y se porta vulnerabilidad genética como ocurre en la EA (Calderon-Garcidueñas et al., 2009; Calderon-Garcidueñas et al., 2012, 2016; 2020; Brockmeyer et al., 2016; Cacciotolo et al., 2017).

Estudios en neuroimagen asociados a la degeneración de las áreas frontotemporales, donde se ven involucrada las secciones prefrontales y las medio-temporales, donde dentro de esta ultima el hipocampo es el más afectado, evidencian un claro déficit en la memoria episódica para quienes sufren de DFT (Devenney et al., 2019). Si bien, según la evidencia de Miller y Guerra et al. (2019) la pérdida de memoria episódica vista mediante problemas de reconocimiento de objetos previamente presentados es un hecho, este declive cognitivo no es tan dramático como la demencia de la EA, sin embargo, se presenta en casi todos los diagnósticos de los espectros clínicos de la DFT (Devenney et al., 2019; Miller y Guerra et al., 2019).

En base a los datos presentados, se concluye que la exposición a la polución ambiental urbana del AMS, por un periodo de 6 meses estaría impactando negativamente las habilidades cognitivas relacionadas a memoria en un modelo murino de riesgo genético para la DFT.

8.3 El modelo de DFT, *C9ORF72* no presentó indicios de una conducta del tipo ansiosa producto de la exposición a la polución ambiental urbana.

En base a los resultados obtenidos en el análisis de la conducta ansiosa por medio de la prueba del EPM y el OFT no se observó algún cambio significativo (Ramos et al., 2008; Seibenhener et al., 2015; Kraeuter et al., 2018). En esta tesis se utilizó el modelo de Peters et al (2015) descrito en la **Tabla 2**, donde además se reporta el modelo de O'Rourke et al. (2015). En ambos artículos no se reportó una conducta ansiosa. Por el contrario, Jiang et al. (2016), sí lo reportó por medio del EPM y otra prueba llamada "marble burying". No obstante, este modelo C9BAC (C9BAC-C9-450B) que vislumbro dicha conducta, difiere al usado en esta tesis tanto en la cepa (F1) C57BL/6J como a las características de los animales transgénicos generados, lo que sugiere la importancia de la construcción del modelo transgénico en los resultados esperados (**Tabla 2**).

Respecto a la exposición a la polución ambiental de aire, la literatura señala que la exposición prolongada a $PM_{2,5}$ conlleva al desarrollo de un estado ansioso (Cheng et al., 2016; Lu et al., 2019). Sin embargo, los resultados obtenidos no difieren de la literatura propuesta por Peters et al. (2015). En la DFT, la ansiedad no es un comportamiento de alta frecuencia ni se asocia al grado severidad de la enfermedad misma, situación que no es así para otros tipos de demencia (Kazui et al., 2016; Liu et al., 2017).

8.4 El modelo de DFT, *C9ORF72* no presentó indicios de alteración en la función motora asociada a la patogénesis de DFT/ELA producto de la exposición a la polución ambiental urbana.

Cambios en la actividad locomotora, son indicativos de una función cerebral anormal (Kraeuter et al., 2018). Se ha descrito en diversos trabajos que pacientes de DFT tienen probabilidad de desarrollar trastornos de la función motora (Kazui, 2016; Kelley, 2016; Liu, 2017). Con el fin de evaluar el fenotipo locomotor del modelo *C9ORF72* frente al estresor ambiental, consideramos la frecuencia de transiciones realizadas en el OFT, en otros trabajos también conocido como la distancia ambulatoria recorrida por el animal a través de la arena, y las transiciones entre los brazos del EPM (Ramos et al., 2008; Seibenhener et al., 2015; Sturman et al., 2018; kraeuter et al., 2018). Nuestros resultados coinciden con los presentados por Peters et al. (2015), modelo de esta tesis, y en la evidencia de los modelos discutidos en O'Rourke et al (2015) y Jiang et al (2016).

Los hexanucleótidos G4C2 de la mutante C9ORF72, presente tanto en DFT como en la ELA, son la principal causa de superposición en el desarrollo de ambas patologías. Su combinación genera el espectro conocido como DFT con síndrome neuromotor (Polymenidou et al., 2011; Al-Sarraj et al., 2011; Balendra e Isaacs et al., 2018; McCauley y Baloh et al., 2018; Devenney et al 2019). No obstante, solo un 10% a 15% de quienes padecen de DFT, manifiestan síntomas del síndrome neuromotor, con expectativas de vida de no mas de 2 a 3 años.

Por lo tanto, en base a nuestros resultados experimentales e hipótesis planteada concluimos que la exposición a polución del aire urbano del AMS no generó de forma evidente alteración de la función motora de los animales C9BAC. Si bien los animales controles, a través del EPM presentaron (datos no mostrados) una reducción en la frecuencia de transiciones en el aparato, se requiere de incluir otros análisis, pues en el OFT, donde también se analizó la distancia recorrida no arrojó evidencia que soportase la idea de una reducción de las habilidades motoras en un animal sano, producto de la exposición a la polución del aire urbano. Sería importante para sumar evidencia a este trabajo el estudio de la proteinopatia asociada a TDP-43, importante en el desarrollo de la variante DFT/ELA, la que ha sido vista en pacientes de DFT en corteza frontal e hipocampo (Al-sarraj et al., 2011; Dennevey et al., 2019; Bright et al., 2019).

8.5 El modelo murino *C9ORF72* presentó síntomas de desórdenes psiquiátricos primarios asociados a la patogénesis de la DFT con variante de conducta y personalidad.

8.5.1 Desordenes psiquiátricos primarios: conducta desinhibida acentuada producto de la exposición a la polución del aire urbano.

La evidencia experimental para el entendimiento de la conducta desinhibida en ratones en los trabajos de Borbolato et al., 2009 y Lorivet et al., 2020, sugieren que la desinhibición es interpretada como una conducta contraria a la conducta del tipo ansiosa, en esta última los roedores prefieren los espacios cerrados respecto a los abiertos. Los autores obtuvieron resultados significativos en el tiempo de exploración del brazo abierto del EPM.

Nuestros resultados experimentales arrojaron que es significativamente menor el tiempo de exploración en el brazo cerrado del EPM, por parte de los animales C9BAC en la condición de polución del aire, respecto a sus pares en aire filtrado y a los controles en sus respectivas condiciones. Este resultado sugiere un menor comportamiento del tipo ansioso (Kraeuter et al., 2018; Yasuyuki et al., 2018). Lo que es resonante con el análisis del brazo abierto del EPM, donde el modelo

C9ORF72 expuesto a polución del aire fueron los que exploraron significativamente más el brazo expuesto u “hostil”.

La evidencia sugiere que los individuos que padecen DFT presentan un comportamiento de desinhibición, asociada a embote emocional (Mioshi et al., 2007; Joshi et al., 2014; Kazui et al., 2016; Liu et al., 2017; Miller y Guerra et al., 2019). La conducta desinhibida se ha visto tanto en el espectro de DFT con variante de conducta y personalidad, donde la desinhibición se presenta a temprana edad (Mioshi et al., 2007; Kelley et al., 2016; Liu et al., 2017), como en otros espectros clínicos de la DFT (Devenney et al., 2019). Un estudio epidemiológico de Japón de Kazui et al., (2016) reportó que este comportamiento se presentó en un 50% de los pacientes del estudio, además es una conducta “pasada por alto” pero que en los cuidadores es la que genera mayor estrés. No obstante, se carecen de métodos estandarizados para el entendimiento de la condición de desinhibición en humanos, pues este comportamiento se asocia a conductas del tipo sexuales (Chapman et al., 2019).

Nuestros resultados sugieren que la previa exposición a la polución del aire urbano del AMS al modelo de DFT, el que presenta riesgo genético, pero no su fenotipo, estaría induciendo un síntoma clínico descrito en pacientes que padecen DFT.

8.5.2 Desordenes psiquiátricos primarios: comportamiento apático acentuado producto de la exposición a la polución del aire urbano.

Como fue mencionado anteriormente la DFT es un espectro de fenotipos, cuyas manifestaciones clínicas involucran la alteración de la personalidad y comportamiento. Para analizar esto, la batería de pruebas conductuales incluyó la interacción social de 3 cámaras, con la cual se evaluó el fenotipo neuropsicológico del modelo *C9orf72* mediante la sociabilidad y la memoria social de los animales (Silverman et al., 2010; Kaidanovich-beilin, 2011; Toth, 2013).

Para nuestros animales controles no se observó ningún resultado significativo en el análisis de la preferencia social (sociabilidad) o memoria social (novedad social), producto de la previa exposición a la polución del aire urbano. Esto no implica que el experimento no haya funcionado, pero si es necesario aumentar el número de animales, con lo cual se podrían obtener resultados para análisis más certeros.

En el caso de los animales C9BAC, en el análisis de sociabilidad se obtuvo diferencias significativas entre las condiciones de aire filtrado *versus* polución del aire. Estos individuos en aire filtrado prefirieron interactuar con el roedor desconocido presentado en una de las cámaras mientras que sus pares en polución del aire optaron por estar en el compartimiento vacío. El hecho de que los animales C9BAC en aire filtrado interactuaran con los animales desconocidos es congruente con los resultados presentados por Peters et al. (2015) y O'Rourke et al. (2015). Esto sugiere que la exposición a la polución del aire urbano del AMS podría estar contribuyendo a generación de una conducta del tipo apático. Síntoma clínico que se manifiesta en aquellos que padecen de DFT y que se ve acentuado por la polución del aire urbano.

La apatía es un estado de indiferencia, falta de motivación o desinterés social y corresponde a una alteración de la conducta social tanto psicológica como psiquiátrica (Srikanth et al., 2005; Kazui et al; 2016; Devenney et al., 2019). El estado de apatía se ha visto presente tanto en la DFT con variante de conducta y personalidad como en otros espectros clínicos de la DFT (Kazui et al, 2016; Kelley et al, 2016; Devenney et al., 2019).

La evidencia epidemiológica (Kazui et al, 2016; Kelley et al, 2016) destaca este síntoma respecto de otros pues a medida que se va deteriorando la memoria, también se va desarrollando crónicamente un comportamiento apático en los pacientes, sugiriendo un puente entre el deterioro cognitivo y la conducta social (Srikanth et al., 2005; Kazui et al; 2016). Se ha descrito que quienes manifiestan el síntoma de la apatía, progresa desde desinterés social a total aislamiento.

Cabe destacar que los autores Gascon et al., 2014 y Alfieri et al., 2014 han reportado la alteración de la conducta social (sociabilidad) a través de la prueba de interacción social de 3 cámara en modelos murinos de DFT, pero a diferencia de este trabajo, los citados al comienzo utilizaron otros factores de riesgo genético para la DFT y sin la presencia, además, de un estresor ambiental. Por lo tanto, esta estandarización del modelo de DFT, *C9orf72* en la exposición a la polución ambiental urbana del AMS, estaría gatillando el desarrollo de una conducta apática. Apoyando a la hipótesis previamente planteada.

Finalmente, con respecto al análisis de la sesión 2 de novedad social donde se evaluó memoria social, observamos que el modelo *C9ORF72* distingue el sujeto novedoso y familiar, bajo la polución del aire y de igual manera se observa una tendencia por parte de aquellos expuestos al aire filtrado. Con estos análisis fue demostrado que no hubo alteración de la memoria de reconocimiento social.

8.6 Neuroinflamacion: El modelo de DFT *C9ORF72* solo presentó astrogliosis en el CA1 del hipocampo dorsal y sin evidente alteración de microglías.

Nuestro segundo objetivo constó en conocer sí la exposición crónica a polución ambiental urbana del aire de Santiago contribuyo al desarrollo de neuroinflamacion en los animales *C9ORF72*. Mediante la técnica de IF, se buscó constatar el aumento de células positivas utilizando marcadores de activación glial; GFAP para la detección de astrocitos activados e Iba-1 para microglías activadas.

Respecto a los animales controles no hubo resultado de ningún tipo dado al bajo número de individuos por condición (Filtro N=2/Polución N=2), lo que hizo imposible realizar algún análisis estadístico para la cuantificación de marcadores de activación glial. Esto limito a que los análisis solo se enfocaran al modelo *C9orf72* en sus respectivas condiciones.

Los resultados obtenidos en la cuantificación para astrocitos activados arrojo que los animales *C9ORF72* no presentaron un aumento significativo de células

GFAP$^+$ en corteza frontal ni en áreas como el giro dentado y el CA3 del hipocampo dorsal. No obstante, si hubo un aumento significativo de células GFAP$^+$ en el área de CA1 del hipocampo en los animales *C9ORF72* que estuvieron expuesto a polución del aire respecto a sus pares en aire filtrado. Peters et al. 2015 no reporto que este modelo de DFT presentase activación glial en el hipocampo. Por lo tanto, este descubrimiento sugiere que la previa exposición a polución ambiental urbana estaría contribuyendo a la astrogliosis en el CA1 del hipocampo.

La astrogliosis o también gliosis reactiva corresponde a un estado de activación caracterizado por cambios moleculares y morfológicos de los astrocitos (hipertrofia de las glías), además de un aumento en la proliferación de estos (Pekny et al., 2014; Sajja et al., 2016). Los autores de Lana et al. 2021, reportaron que la triada (interacción) neurona-astrocitos-microglías, es fundamental para el desarrollo de la sinaptogénesis; maduración y funcionabilidad. Sin embargo, se propone que, sí la respuesta glial frente a un estímulo tal como la inflamación se hace crónica, podrían afectar dicho proceso de formación de las sinapsis, contribuyendo a la neurodegeneración y al deterioro de la memoria (Pekny et al., 2014; Sajja et al., 2016; Lana et al., 2021).

Respecto a la DFT, se presenta como síntoma clínico la astrogliosis hipocampal, vista en pacientes que padecen de la enfermedad como en modelos animales para el estudio de la patología *C9ORF72*/DFT (Devenney et al 2019; Bright et al., 2019; Ghasemi et al., 2021). La reciente evidencia plantea que las células gliales no presentan del todo la patología asociada a la mutante C9ORF72 (RNA foci, proteínas de dipéptidos repetidos). Sin embargo, si se evidencio en este mismo trabajo que astrocitos son capaces de generar neurotoxicidad en individuos *C9ORF72*/ELA, afectado la viabilidad de motoneuronas (Ghasemi et al., 2021).

Resultados previamente discutidos en este trabajo sugirieron que los animales *C9ORF72* producto a la exposición a polución urbana, arrojaron la pérdida de memoria de reconocimiento a través de la prueba del NOR. Las áreas cerebrales del CA1 y CA3 del hipocampo cooperan mutuamente en los procesos

involucrados en la codificación de la memoria, si bien sus funciones no son iguales en dicho proceso, se requieren entre sí (Strange et al., 2016; Lana et al., 2021). La literatura ha reportado que CA1 es vulnerable frente a la exposición a polución del aire en modelos murino para la EA (Morgan et al., 2011; Woodward et al., 2017; Cacciottolo et al., 2017) y en la reciente evidencia de Sahu et al., 2021, los autores reportaron astrogliosis hipocampal en conjunto con marcas histopatológicas propias de la EA en un modelo murino (APP/PS1) expuesto a material particulado ($PM_{2,5}$).

Nuestros resultados tanto en la inflamación del CA1 del hipocampo y el deterioro cognitivo descrito previamente a través de la prueba del NOR sugieren que nuestro modelo murino recapitularía característica clínica de la DFT. No obstante, para conducir a mejores entendimientos sobre esta asociación que involucra la pérdida de memoria e inflamación mediada por gliosis en el modelo *C9orf72*, requiere de la integración de marcas histopatológicas de la DFT, involucradas cuando se ha visto inflamación en el hipocampo y pérdida de memoria, tal como la proteína asociada a microtúbulos Tau y la proteína de unión a DNA/RNA TDP-43 ambas marcas histopatológicas de la DFT (Miller y Guerra et al., 2019).

Respecto a microglías activadas no hubo un aumento significativo en la cuantificación de células Iba-1^{+} producto de la exposición a la polución del aire urbano en ninguna de las áreas estudiadas. Resultados que no difieren de los propuesto por Peters et al., 2015, modelo de esta tesis. La literatura estima que en la patología *C9orf72*/DFT, se ha asociado a una respuesta glial alterada, por sobre todo en microglías. Este gen es importante en el tráfico de membrana (Lall y Baloh et al., 2017; McCauley y Baloh et al., 2018) y los modelos murinos deficientes en la función de C9ORF72 presentan una respuesta microglial hiperactiva, sugiriendo una función anormal en quienes padecen de DFT (Brettschneider et al., 2012; London et al., 2013; O'Rourke et al., 2016; Bright et al., 2019). Además, los autores de Lall y Baloh et al., 2017 y McCauley y Baloh et al., 2018, reportaron que ratones hembra *C9orf72* son más susceptibles al desarrollo de una función microglial alterada. No obstante, a pesar de evidencia

descrita arriba, los 6 meses de exposición a polución ambiental urbana, no fueron suficientes para observar cambios mediante los marcadores de activación microglial en el modelo murino de esta tesis. Esto sugiere que para cada modelo animal del estudio de la patología de C9ORF72 es clave la construcción del modelo transgénico en los resultados esperados.

A la fecha la evidencia más reciente de Ghasemi et al 2021, recapitula que la pérdida completa de la expresión de C9ORF72 resulta en un estado proinflamatorio mediado posiblemente por células mieloides y que la haploinsuficiencia es suficiente para afectar las funciones competentes de las células mieloides. No obstante, en este mismo trabajo los autores evidencian que las células gliales a diferencia de neuronas no presentan del todo la histopatología típica de C9ORF72 (RNA foci y proteínas dipéptidas repetidas). Por lo tanto, creemos que es necesario un estudio más en detalle respecto a la alteración microglial. Seria efectivo, analizar otro tipo de marcadores que involucren la reactividad microglial (Western Blot de TNF-α, interleuquinas 1-6), además de aumentar los meses de exposición a PM, con el fin de ver algún resultado notorio en la gliosis microglial.

Finalmente cabe destacar que en los análisis de IF pudimos observar, cualitativamente (**Figura 15** y **16**), que morfológicamente se presentó, tanto en astrocitos como microglías en las áreas de CA1 y CA3 del hipocampo cambios asociados a la hipertrofia celular, es decir, aumento del volumen del soma y de las ramificaciones que se proyectan a partir de él, al comparar las condiciones de aire filtrado y polución del aire. Para corroborar esto, es necesario añadir a futuro un análisis de intensidad de fluorescencia con el fin de corroborar lo propuesto por los autores de Zhang et al., 2018; Bright et al., 2019; Haukedal y Freude et al., 2019 a lo que respecta que si el cambio morfológico de las glías es producto de la presencia de la mutante C9ORF72 o si bien se deba a la exposición de la polución del aire urbano (2019).

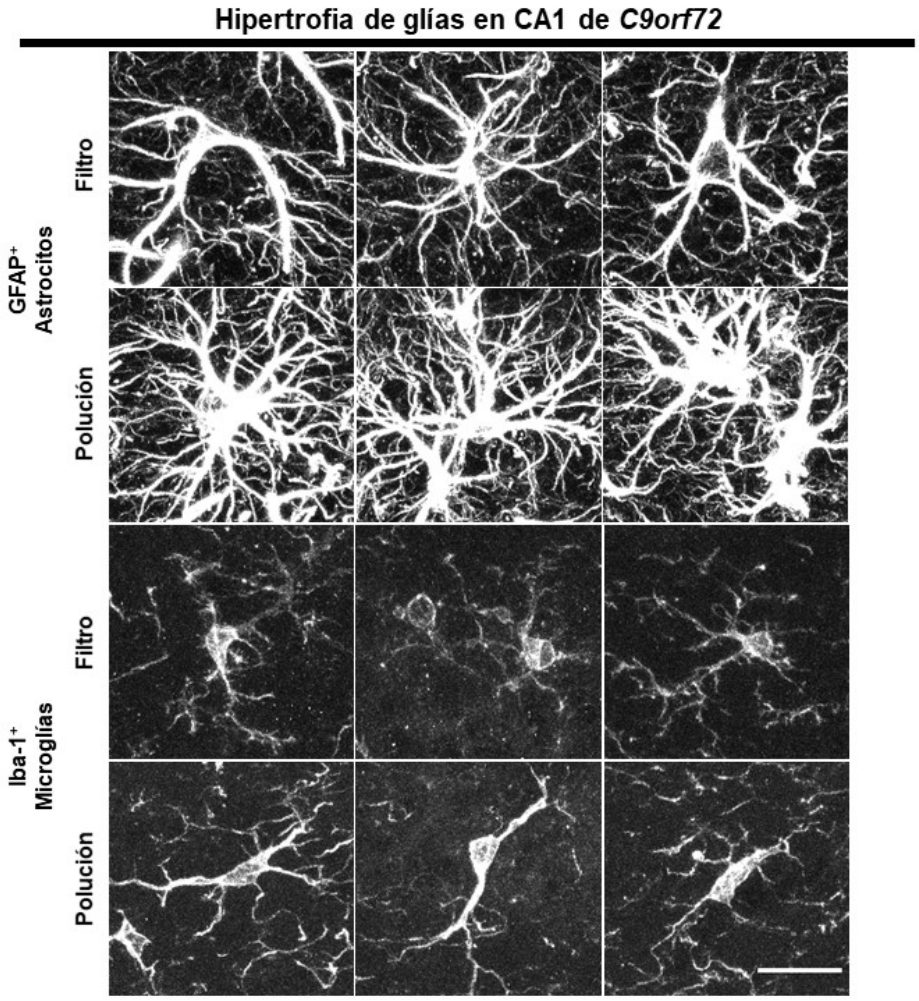


Figura 15: Hipertrofia de glías en el CA1 del hipocampo dorsal del modelo de DFT *C9ORF72*. Cada una de las imágenes corresponden a un acercamiento tomado a partir de las IF representativas. Estos recuadros ilustran a células GFAP$^+$ e Iba-1$^+$, astrocitos y microglías respectivamente. Dado a nuestras observaciones (cualitativas) estas glías presentarían hipertrofia celular (cambio morfológico) cuando se ha estado expuesto a polución ambiental del aire. Es por esto que se sugiere para resultados y análisis más concretos, realizar el protocolo de intensidad de fluorescencia. Barra escala del acercamiento: 19,3 µm.

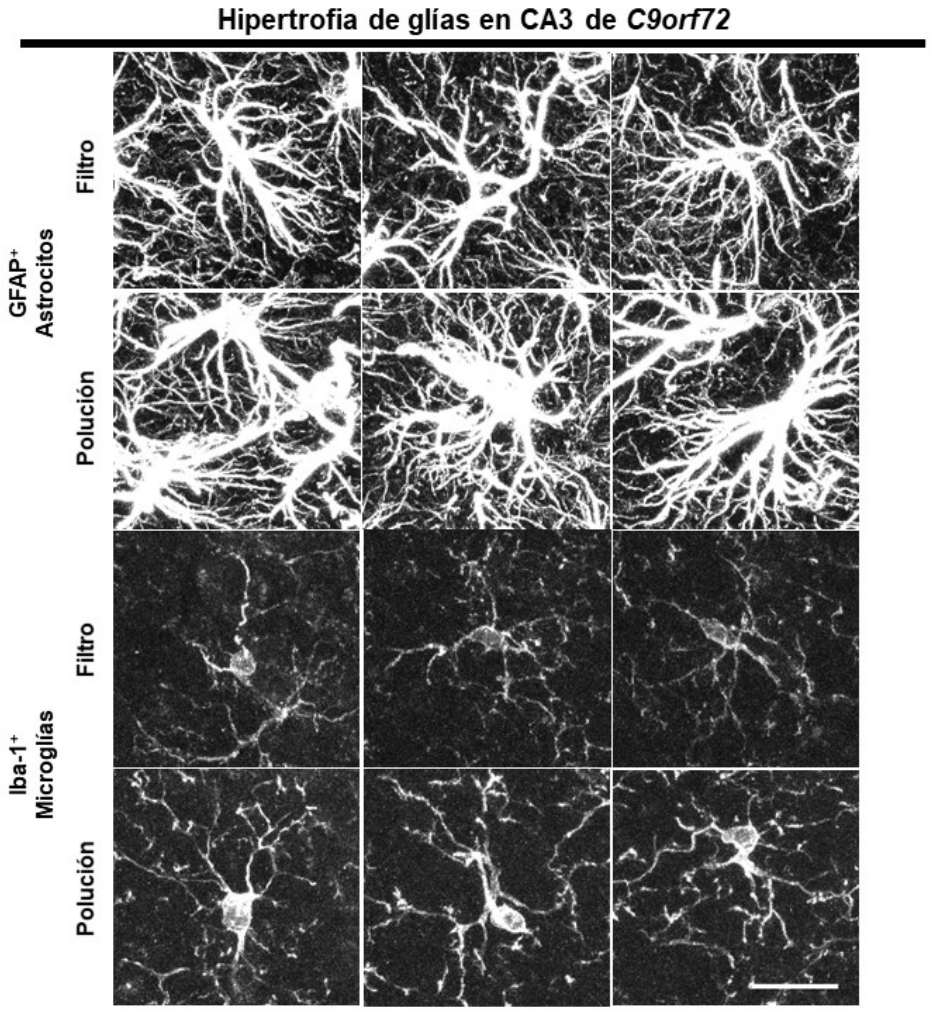


Figura 16: Hipertrofia de glías en el CA3 del hipocampo dorsal del modelo de DFT *C9ORF72*. Cada una de las imágenes corresponden a un acercamiento tomado a partir de las IF representativas. Estos recuadros ilustran a células GFAP$^+$ e Iba-1$^+$, astrocitos y microglías respectivamente. Dado a nuestras observaciones (cualitativas) estas glías presentarían hipertrofia celular (cambio morfológico) cuando se ha estado expuesto a polución ambiental del aire. Es por esto que se sugiere para resultados y análisis más concretos, realizar el protocolo de intensidad de fluorescencia. Barra escala del acercamiento: 19,3 µm.

9. LIMITACIONES DE ESTE TRABAJO

- Es importante hacer énfasis que este estudio posee una limitante importante a destacar, que se asoció al número de individuos totales de un N=24 y 23 en el caso del NOR. Esto generó pérdida de potencia estadística asociada a la batería de pruebas conductuales. Esta limitante también aplicó de sobremanera para la cuantificación de células positivas mediante IF. En el caso de los controles los que posee un N=4 (2 individuos para cada condición) hizo prácticamente imposible obtener conclusiones respecto del modelo B6SJL y a su vez, analizar las diferencias respecto al modelo de riesgo genético.
- A la fecha no hay evidencia publicada respecto al modelo transgénico *C9ORF72* desde el punto de vista de la DFT y su relación con el riesgo genético de dicho gen. En su mayoría la literatura está enfocada en el desarrollo de la ELA. A su vez, tampoco se ha descrito anteriormente que este modelo ELA/DFT u otro para el estudio de DFT haya sido expuesto a la polución ambiental urbana.
- Dado que la patología *C9ORF72*ELA/DFT puede converger en una variante de fenotipos, los resultados a obtener pueden variar en función de la construcción del modelo transgénico. No todos ellos presentan el gen C9ORF72 en su totalidad o solo partes de él, por ende, la histopatología como agregados de RNA y/o proteínas dipéptidas repetidas variaran, además el método biotecnológico por el cual es generado el transgénico (cromosoma artificial bacteriano y/o vector viral) y la cepa del animal también son factores por considerar.
- Los resultados en los modelos murinos de exposición a polución ambiental dependen de la composición de los contaminantes ambientales presentes, la dosis a la que se encuentren expuestos, protocolo de exposición, edad y género (Block y Calderón-Garcidueñas et al., 2009; Brockmeyer et al., 2016; Ransohoff et al., 2016).

10. CONCLUSIÓN

El modelo murino transgénico para el estudio de la DFT fue expuesto a la polución ambiental del aire urbano de Santiago de Chile y nuestros resultados experimentales sugieren que, los 6 meses de exposición al estresor ambiental contribuirían con la inducción de trastornos tales como la pérdida de la memoria de reconocimiento de objetos, desordenes psiquiátricos primarios; desinhibición y apatía y astrogliosis en el área del CA1 del hipocampo. Esto es particularmente interesante pues cada uno de estos síntomas clínicos observados, son característicos del fenotipo clínico de la DFT de variante de conducta y personalidad. Si bien nuestros descubrimientos son interesantes, metodológicamente es necesario mejorar la potencia estadística de nuestros resultados, además de incluir análisis de marcas histopatológicas propias de la enfermedad y otros marcadores asociados a inflamación, para satisfacer la hipótesis planteada. No obstante, esta estandarización de un modelo animal el cual posee riesgo genético, como lo es el de C9ORF72, pero que no presenta fenotipo descrito, es pionera y valida la importancia de acarrear con un factor de riesgo genético y como las NPs presentes en la polución del aire urbano podrían acentuar el desarrollo de una enfermedad, lo que podría explicar lo “esporádico” de estas. Por otro lado, nos enfrenta a la problemática ambiental a la que estamos expuestos, en particular, en el AMS, lo que requiere de la intervención de la salud pública y de los organismos responsables del control y calidad del aire.

11. BIBLIOGRAFIA

Akkerman, S., Prickaertsa, J., Steinbuscha, H. W. M. y Bloklandb, A. (2012). Object recognition testing: Statistical considerations. *Elsevier, Behavioural Brain Research;* 232 (2012) 317– 322. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.03.024

Alfieri., J., A. Pino., N. S. y Igaz,. L. M. (2014). Reversible Behavioral Phenotypes in a Conditional Mouse Model of TDP-43 Proteinopathies. *Journal in Neuroscience;* 34(46): 15244–15259. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1918-14.2014

Al-Sarraj, S., King, A., Troakes, C., Smith, B., Maekawa, B., Bodi, I., Rogelk, B., Al-Chalabi, A., Hortobáfyi, T. y Shaw, C. (2011). p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmatic and intracelular inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTLD y MND/ALS. *Acta in neuropathology;* 122:691-702. DOI: 10.1007/s004021-011-0911-2

Ampuero, E., Jury, N., Hartel, S., Marzolo, M.P. y van Zundert, B. (2017). Interfering of the Reelin/ApoER2/PSD95 signaling axis reactivates dendritogenesis of mature hipocampal Neurons. *Journal Cellular Physiology*; 232: 1187-1199. DOI: 10.1002/jcp.25605

Antunes, M. y Biala, G. (2011). The novel objetc Recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Springer, Cong process* 13: 93-110. DOI: 10.1007/s10339-011-0430-z.

Balenddra, B., y Isaacs., A. (2018). C9orf72 mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nature reviews Neurology;* 14, 544–558. DOI:10.1038/s41582-018-0047-2

Ballard, C., Gauthier, S., Cobett, A., Brayne, C., Aarsland, D. y Jones, E. (2011). Alzheimer's Disease. *Lancet;* 377 (9770): 1019-31. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9

Belzil, VV., Gendron, T. F. y Petrucelli, L. (2013). RNA-mediated toxicity in neurodegeneration disease. *Neuroscience, molecular Cellular* 56: 404-419. DOI: 10.1016/j.mcm.2012.12.006

Bieniek, K. F., Murray, M., Rutherford, N., Castanedes-Casey, M., De Jesus-Hernandez, M., Liesinger, A. M., Baker, M. C., Boylan, K., Rademakers, R. y Dickson, D. (2014). Tau Pathology in Frontotemporal Lobar Degeneration with C9ORF72 Hexanucleotide Repeat Expansion. *Acta in Neuropathology*. 125(2): 289-302. DOI: 10.1007/S00401-012-1048-7.

Block, M. y Calderón-Garcidueñas, L., (2009). Air Pollution: Mechanisms of neuroinflammation & CNS Disease. *Trends Neuroscience*. 32(9): 505-516. DOI: 10.1016/j.tins.2009.05.009

Blokhuis, A., Groen, E., Koppers, M., van den Berg, L. y Pasterkamp, R. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis*. Acta in Neuropathology;* 125;777–794. DOI 10.1007/s00401-013-1125-6

Braak, H. y Del Tredici, K. 2012. Azheimer's disease: pathogenesis and prevention. *Alzheimers Dementia*; 8(3):227-33. DOI: 10.1016/j.jalz.2012.01.011.

Bright, F., Werry, E. L., Stone, C. D., Ittner, L. M., Halliday, G. M., Hodges, J. R., Kiernan, M. C., Loy, C. T., Kassiou, M. y Kril., J. J. (2019). Neuroinflammation in frontotemporal dementia. *Nature review neurology* 15**,** 540–555 DOI: 10.1038/s41582-019-0231-z

Brockmeyer, S. y D'Angiulli, D. (2016). How Air Pollution Alters Brain Development: The Role of Neuroinflammation. *Translational Neuroscience;* 7; 24-30. DOI: 10.1515/tnsci-2016-0005

Brown, R. E., Corey, S. C. y Moore, A. K. (1999). Difference in measures of exploration and fear in MHC-congenic C57BL/6J and B6-H-2K. *Behavior Genetics;* 26: 263-271.

Bustos. F., Ampuero, E., Aguilar, R., Jury, N., Varela-Nallar, L., Faahi, F., Toledo J., Lata, J., Cubillos, P., Henríquez B., Guerra, M., Stehberg, J., Neve, R. L., Inostrosa, N. C., Wyneken U., Fuenzalida M., Hartel, S., Sena-Estebes, M.,

Rots, M. G., Montecinos, M. y van Zundert, B. (2017). Epigenetic editing of the Dlg4/PSD95 gene improves cognition in aged and Alzheimer's disease mice. *Brain, Journal of neurology;* 1-17. DOI: 10.1093/brain/awx272.

Cacciottolo, M., Wang, X., Driscoll, I., Woodward, N., Saffari, A., Reyes, J., Serre, M. L., Vizuete, W., Sioutas, C., Morgan, T. E., Gatz, M., Chui H. C., Shumaker, S. A., Resnick, S. M., Espeland, M. A., Finch, C. y Chen. J. C. (2017). Particulate air pollutants, APOE alleles and their contributions to cognitive impairment in older women and to amyloidogenesis in experimental models. *Translational Psychiatry;* 7, 1022: DOI: 10.1038/tp.2016280

Calderón-Garcidueñas, L., Solt, A. C., Henríquez-Roldán, C., Torres-Jardón, R., Nuse, R., Herrit, L., Villareal-Calderón, R., Osnaya, N., Stone, I., García, R., Brooks D, M., Gonzáles-Maciel A., Reynoso-Robles, R., Delgado-Chavéz R. y Reed, W. (2008). Long-term Air Pollution Exposure Is Associated with Neuroinflammation, an Altered Innate Immune Response, Disruption of the Blood-Brain Barrier, Ultrafine Particulate Deposition, and Accumulation of Amyloid β β-42 and α α-Synuclein in Children and Young Adults. *Toxicologic Pathology*. 36: 289-310. DOI: 10.1177/0192623307313011

Calderón-Garcidueñas, L., Kavanaughb, M., Block, M., D'Angiullid, A., Delgado-Cháveze R., Torres-Jardón R., González-Maciel, A., Reynoso-Roblesa, R., Osnaya O, Villarreal-Calderon, R., Guoh, R., Huah, Z., Zhuh, H., Perry, G y Diaz, P. (2012). Neuroinflammation, Hyperphosphorylated Tau, Diffuse Amyloid Plaques, and Down-Regulation of the Cellular Prion Protein in Air Pollution Exposed Children and Young Adults. *Journal of Alzheimer's Disease* 28: 93–107. DOI 10.3233/JAD-2011-110722

Calderón-Garcidueñas, L., Jewells, V., Galaz-Montoya, C., van Zundert, B., Pérez-Calatayud, A., Ascencio-Ferrel, E., Valencia-Salazar, G., Sandoval-Cano, M., Carlos, E., Solorio, E., Acuña-Ayala, H., Torres-Jardón, R., y D'agiulli, A. (2016). Interactive and additive influences of gender BMI and Apolipoprotein 4 on cognition in children chronically exposed to high concentración of PM2.5 and ozone. APOE4 females are at highest risk in

Mexico City. *Elsevier, Environmental Research;* 150: 411-422. DOI: 10.1916/j.envres.2016.06.026.

Calderón-Garcidueñas, L., Herrera-Soto, A., Jury, N., Barbara A. Maher, B., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Ruiz-Rudolphg, P., van Zundert, B. y Varela-Nallar, L. (2020). Reduced repressive epigenetic marks, increased DNA damage and Alzheimer's disease hallmarks in the brain of humans and mice exposed to particulate urban air pollution. *Elsevier: Environmental Research*. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109226

Chapmanm, K., R. y Spitznagel, M., B. (2019). Measurement of sexual disinhibition in dementia: A systematic review. *International Journal of geriatric Psychiatry*. DOI: 10.1002/gps.5208

Chen, H., Goldberg, M. S. y Villeneuve, P. J. (2008). A Systematic review of the relation between Long-term exposure to Ambient Air Pollution and chronic disease. *Review environmental health*. 23: 243-297.

Cohen, A., Brauer, M., Burnett, R., Anderson, H. R., Frostad, F., Estep, K., Balakrishnan, K., Brunekreef, B., Dandona, L., Dandona, R., Feigin, V., Freedman, G., Hubbell, B., Jobling, A., Kan, H., Knibbs, L., Liu, Y., Martin, R., Morawska, L., Arden Pope III, C., Shin, H., Straif, K., Shaddick, G., Thomas, M., van Dingenen, R., van Donkelaar, A., Vos, T., Murray, J. L. C. y Forouzanfar, M. (2017). Estimates and 25-years trend of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the global burden of disease study 2015. *Lancet* 389: 1907-1918. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30505-6

Damiani, C. L. y O'Callaghan, J. P. (2007). Recapitulation of cell signaling event associated with astrogliosis using the brain slice preparation. *Journal of Neurochemicals*, 100: 720-726.

Díaz-Robles, L.A., Saavedra, H., Schiappacasse, L.N. y Cereceda-Balic, F. (2011). The air quality in Chile: twenty years of challenge. *Environmental Manag*. Air Waste Manag. Assoc. 28–33

Devenney, E. M., Rebekah, M. A. y Hodges, J. R. (2019). Frontotemporal dementia. *Handbook of Clinical Neurology, Geriatric Neurology;* Vol. 167. DOI: 10.1016/B978-0-12-804766-8.00015-7

Eichenbaum, H. (2017). Prefrontal–hippocampal interactions in episodic memory. *Nature reviews*. DOI: 10.1038/nrn.2017.74

Eng, F. L., Ghimikar, R. S. y Lee, Y. L. (2000). Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-thirty-one years. *Neurochemical research*. 25: 1439-1451.

Ferrari, R., Kapogiannis, D., Huey, E. D. y Momeni, P. (2011). FTD and ALS: a tale of two desease. *Current Alzheimer Research*: 8(3): 273-294. DOI: 10.2174/156720511795563700

Gage., F. H. (2019). Adult neurogenesis in mammals. *Science*, 364(6443), 827–828. doi:10.1126/science.aav6885

Ghasemi, M., Keyhanian, K. y Douthwright, C. (2021). Glial Cell Dysfunction in C9orf72-Related Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Cells Review*: 10, 249. DOI: 10.3390/cells10020249

Gonzáles-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Torres-Jardon, R., Mukherjee P. S. y Calderón-Garcidueñas, L. (2017). Combustion-Derived nanoparticles in key brain target cells and organelles in Young urbanites: culprit hidden in plain sight in Alzheimer's desease development. *Journal of Alzheimer's Desease*. 59(1):189-208 DOI: 10.3233/JAD-170012

Greaves, C. V. y Rohrer, J. D. (2019). An update on genetic frontotemporal dementia. *Journal of Neurology*. 266(8):2075-2086. DOI: 10.1007/s00415-019-09363-4

Haukedal., H. y Freude., K. (2019). Implications of Microglia in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Elsevier: Journal of Molecular Biology*. 9; 1818-1829. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.02.004

Im, K., Mareninov, S., Palma Díaz M. F. y Yong, W. H. (2019). An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods of Molecular Biology*. 1897: 299–311. DOI:10.1007/978-1-4939-8935-5_26.

Jara, J., Genç, B., Stanford1, M., J., Pytel, P., Roos, R., Weintraub S., Mesulam, M., Bigio, E., Miller, R y Özdinler, P. (2017). Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *Journal of Neuroinflammation* 14:129. DOI 10.1186/s12974-017-0896-4

Jury, N., Abarzua, S., Diaz, I., Guerra, M. V., Ampuero, E., Cubillos, P., Martinez, P., Herrera-Soto, A., Arredondo, C., Rojas, F., Manterola, M., Rojas, A., Montecino, M., Varela-Nallar, L y van Zundert, B. (2020). Widespread loss of the silencing epigenetic mark H3K9me3 in astrocytes and neurons along with hippocampal-dependent cognitive impairment in C9orf72 BAC transgenic mice. *Clinical epigenetics*. DOI: 10.1186/s13148-020-0816-9.

Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Order, J. y Woodgett, J. R. (2011). Assessment of social interaction behaviors. *Journal of Visualized Experiments*. (48):2473. DOI: 10.3791/2473

Kazui, H., Yoshiyama, K., Kanemoto, H., Suzuki, Y., Sato, S. y Hashimoto, M. (2016). Differences of Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia in Disease Severity in Four Major Dementias. *PLoS ONE* 11(8): e0161092. DOI: 10.1371/journal.pone.0161092

Kelley, R. E. y El-Khoury, R. (2016). Frontotemporal Dementia. *Neurology Clinicals* 34; 171–181. DOI: 10.1016/j.ncl.2015.08.007

Kilian., J. y Kitazawa., M. (2018). The emerging risk of exposure to air pollution on cognitive decline and Alzheimer's disease - Evidence from epidemiological and animal studies. *Journal of Biomedical* J;41(3):141-162. DOI: 10.1016/j.bj.2018.06.001

Kim, K-H., Kabir, E. y Kabir, S., (2015). A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Elsevier: Environment International*. 74: 136–143. DOI: 10.1016/j.envint.2014.10.005

Komada, M., Takao, K. y Miyakawa, T., (2008). Elevated Plus Maze for Mice. *Journal of Visualized Experiments* 22: 1088. DOI: 10.3791/1088

Kraeuter, A. K., Guest, P. C. y Sarnyai, Z. (2018). The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. In: Guest P. (eds) Pre-Clinical Models. *Methods in Molecular Biology*, vol:1916.10. DOI: 1007/978-1-4939-8994-2_4

Lall., D. y Baloh., R. H. (2017). Microglia and C9orf72 in neuroinflammation and ALS and frontotemporal dementia. *Clinical Investigation.* 2017;127(9):3250–3258. DOI: 10.1172/JCI90607

Lana D., Ugolini, F., Nosi, D., Wenk, G. L. y Giovannini, M., G. (2021) The Emerging Role of the Interplay Among Astrocytes, Microglia, and Neurons in the Hippocampus in Health and Disease. *Front. Aging Neurosci. 13:651973.* DOI: 10.3389/fnagi.2021.651973

Liu, C., Chen, R., Sera, F., Vicedo-Cabrera, Y., Tong, G. S., Coelho, M. S. Z. S., Saldivia, P. H. N., Lavigne, E., Matus, P., Valdes Ortega, N., S. Osorio Garcia, M., Pascal, M., Stafoggia, M., Scortichini, M., Hashizume, Y., Honda, M., Hurtado-Diaz, J., Cruz, B., Nunes, J. P., Teixeira, H., Kim, A., Tobias, C., Íñiguez, B., Forsberg, C., Åström, M. S., Ragettli, Y-L., Guo, B., Chen, M. L., Bell, C. Y., Wright, N., Scovronick, R. M., Garland, A., Milojevic, J., Kyselý, A., Urban, H., Orru, E., Indermitte, J. J. K., Jaakkola, N. R. I., Ryti, K., Katsouyanni, A., Analitis, A., Zanobetti, J., Schwartz, J., Chen, T., Wu, A., Cohen, A., Gasparrini, y Kan, H. (2019). Ambient Particulate Air Pollution and Daily Mortality in 652 Cities. *The new england journal of medicine.* Vol 381. DOI: 10.1056/NEJMoa1817364

Liu, S., Liu, J., Wang, X., Shi, Z., Zhou, Y., Li, J. y Ji, Y. (2018). Caregiver burden, sleep quality, depression, and anxiety in dementia caregivers: A comparison of frontotemporal lobar degeneration, dementia with Lewy bodies, and Alzheimer's disease. *International Psychogeriatrics*. 30(8), 1131-1138. DOI: 10.1017/S1041610217002630

Lorivel, T., Cendelin, J., y Hilber, P. Familiarization effects on the behavioral disinhibition of the cerebellar Lurcher mutant mice: use of the innovative Dual Maze. *Behavioural Brain Research*. DOI: 10.1016/j.bbr.2020.112972

Lu, J.G. (2019). Air pollution: A systematic review of its psychological, economic, and social effects. *Elsevier, Current Opinion in Psychology*: 32:52–65. DOI: 10.1016/j.copsyc.2019.06.024

Lueptow, L.M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of Visualized Experiments*. (126):55718. DOI: 10.3791/55718

Mackenzie, I.R.A., Frick, P. y Neumann, M., (2014). The neuropathology associated with repeat expansión in theC9ORF72 gene. *Acta in neuropathology;* 127: 347-357. Springer. DOI: 10.1007/s00401-013-1232-4

Maher, B. A., Ahmed, I. A., Karloukovski, V., Maclaren, D. A., Foulds, F. G., Allsop, D., Mann, D. M., Torres-Jardón, R. y Calderón-Garcidueñas, L. (2016). Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. *Proc. Natl. Acade. Sci*. U.S.A 113, 10797-10801 DOI: 10.1073/pnas.16059411117

McCauley, M.E. y Baloh, R.H. (2018). Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta in Neuropathology;* 137(5):715-730. DOI: 10.1007/s00401-018-1933-9

Miller, B. y Guerra J., J., M. (2019). Frontotemporal dementia. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 165. DOI: 10.1016/B978-0-444-64012-3.00003-4

Mioshi, E., Kipps, C. M., Dawson, K., Mitchell, J., Graham, A. y Hodges, J. R. (2007). Activities of daily living in frontotemporal dementia and Alzheimer disease. *Neurology*; 68(24):2077-84. DOI: 10.1212/01.wnl.0000264897.13722.53

Moore, K., M. (2020). Age at symptom onset and death and disease duration in genetic frontotemporal dementia: an international retrospective cohort study. The lancet: neurology. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30394-1

Moser, M-B. y Moser, E.I. (1998). Functional Differentiation in the Hippocampus. *HIPPOCAMPUS;* 8:608–619.

Moraga-Amaro, R., Jerez-Baraona, J. M., Simon, F. y Stehberg, J. (2014). Role of astrocytes in memory and psychiatric disorders. *Journal of Physiology Paris;* 108(4-6):240-51. DOI: 10.1016/j.jphysparis.2014.08.005

Mori, H., y Cardiff, R. D. (2016). Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible. The Tumor Microenvironment, 1–12. DOI:10.1007/978-1-4939-3801-8_1

Mori, K., Weng, S. M., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., Schmid, B., Kretzschmar, H. A., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Haass, C. y Edbauer, C. (2013). The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLD/ALS. *Science*: 80; 1335–1338. DOI: 10.1126/science.1232927

Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J. y Crawley, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strain: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Gen Brain Behavior;* 3(5): 287-302

Nimmerjhan, A., 2005. Resting microglial cell are highly Dynamic surveillant of brain parenchyma in vivo. Science

OMS, organización mundial de la salud. (2006). Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre.

Peters, O. M., Toro-Cabrera, G., Tran, H. F., Gendron, T., McKeon, J. E., Metterville, J., Weiss, A., Wightman, N., Salameh, J. Kim, J., Sun, H., Boylan K. B., Dickson D., Kennedy Z., Lin Z., Yong-jie Z., Lillian D., Chris J., Gao Fen-Biao., Sapp P. C., Horvitz R., Bosco D. A., Brown. S., de Jong P. Petrucelli L., Mueller C. y Brown, R. H. (2015). Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat

Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Elsevier: Neuron*. 88, 902-909.

Pekny, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis, *Neuroscience Letter*. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.12.071

Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C. y Hutt, K. (2011). Long pre-m RNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature, Neuroscience* 14:459– 468. DOI:10.1038/nn.2779

Preston, A., R. y Eichenbaum, H. (2013). Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Current biology*. DOI: 10.1016/j.cub.2013.05.041

Prieto-Parra, L., Yohannessen, K., Brea, C., Daniella Vidal, D., Ubilla, C. A. y Ruiz-Rudolph, P. (2017). Air pollution, PM2.5 composition, source factors, and respiratory symptoms in asthmatic and nonasthmatic children in Santiago, Chile. *Elsevier: environment International*.DOI: dx.doi.org/10.1016/j.envint.2017.01.021.

Ramos, A., Pereira, E., Martins, G. C., Wehrmeister T. D. y Izídio, G. S. (2008). Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behavioural Brain Research*; 193(2), 277-288. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.06.007

Ransohoff., R. M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 353 (6301), 777-783. DOI: 10.1126/science.aag2590

Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K. y Hodges, J. R. (2002). The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 58: 1615-21. DOI: 10.1212/WNL.58.11.1615.

Readmakers, R., Cruts, M. y van Broeckhoven, C. (2004). The role of Tau (MAPT) in the frontotemporal dementia and the related taupathies. *Humans Mutation* 24: 277-295. DOI: 10.11138/FNeur/2017.32.1.0079

Rainero, I., Rubino, E., Michelerio, A., D´Agata, F., Gentile, S. y Pinessi, L., (2017). Recent advances in the molecular genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Funtional Neurology*; 32(1):7-16. DOI:

Rocca, W. A., Petersen, R. C., Knopman, D. S., Hebert, L. E., Evans, D. A., Halls, K. S., Gao, S. y White, L. R. (2011). Trends in the inciden and prevalence of Alzheimer's disease, dementia, and cognitive impairment in the United States. *Alzheimers Dementia;* 7: 80-93. DOI: 10.1016/j.jalz.2010.11.002.

Okuyama, T., (2018). Social memory engram in the hippocampus. *Neuroscience research;* 129:17;23. DOI: 10.1016/j.neures.2017.05.007.

Sajja, V. S. S. S., Hlavac, N. y VandeVord, P. J. (2016) Role of Glia in Memory Deficits Following Traumatic Brain Injury: Biomarkers of Glia Dysfunction. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 10:7. DOI: 10.3389/fnint.2016.00007

Sahu, B., Mackos, A. R., Floden, A. M., Wold, L. E. y Combs, C., K. (2021). Particulate matter exposure exacerbates Aβ plaque deposition and gliosis in APP/PS1 mice. *Journal of Alzheimers Disease*: 80(2): 761–774. DOI: 10.3233/JAD-200919.

Schikowski, T. y Altuğ, H. (2020). The role of air pollution in cognitive impairment and decline. *Elsevier: neurochemistry international*: vol 136. DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104708.

Selkoe, D. J. y Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 years. *EMBO, molecular Medicine*. 8:595. DOI: 10.15252/emmm.201606210

Seibenhener, M. L. y Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized. Experiments;* (96), e52434. DOI: 10.3791/52434

Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C. y Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature review, Neuroscience;* (7):490-502. DOI: 10.1038/nrn2851

Srikanth., S. Nagaraja A., V. y Ratnavalli, E. (2005). Neuropsychiatric symptoms in dementia-frequency, relationship to dementia severity and comparison in Alzheimer's disease, vascular dementia and frontotemporal dementia. *Journal of the Neurological Sciences:* (236) 43 – 48

Strange, B. A., Witter, M.P., Lein, E. S. y Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature review, Neuroscience:* 15(10); 655-69. DOI: 10.1038/nrn3785

Sturman, O., Germain, P-L., y Bohacek, J. (2018). Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*, 21:5, 443-452. DOI: 10.1080/10253890.2018.1438405

Toro, A. R., Kvakić, M., Klaić, Z. B., Koračin, D., Morales, S., Raú. G. E. y Leiva, G. M. A. (2019). Exploring atmospheric stagnation during a severe particulate matter air pollution episode over complex terrain in Santiago, Chile, *Environmental Pollution.* DOI: 10.1016/j.envpol.2018.10.067.

Toth, J., y Neumann, I., D. (2013). Animal models of social avoidance and social fear. *Springer, Cellular Tissue Research;* 354:107–118. DOI 10.1007/s00441-013-1636-4

Sugimoto, H. y Tsukiura, T., (2018). Contribución of the medial prefrontal cortex to social memory. *Brain Nerve*, 753-761. DOI:10.11477/mf.1416201076

Weiner, M. F. y Lipton, A. M. (2010). Manual de Enfermedad de Alzheimer y otras Demencias. Ed medica panamericana.

Woodward, N., Payam, P., Airan, S., Shirmohammadi, F., Haghani A, Sioutas, C., Cacciottolo, M. y Morgan, T. (2017). Traffic-related air pollution impacto n mouse brain accelerates myelin and neuritic aging changes with specificity for CA1 neurons. Neurobiology of aging 53: 48-58. *Elsevier.* DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.01.007

World Health Organization (WHO). (2013). Health effects of particulate matter. Policy implications for countries in eastern Europe, Caucasus and central Asia. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. Recuperado de: [http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/189051/Health-effects-of-particulate-matter-final-Eng.pdf].

Yang, W., Sidman, R., Taksir, T., Treleaven, C., Fidler, J., Cheng., S., Dodge, J. y Shihabuddin, L. (2011). Relationship between neuropathology and disease

progression in the SOD1(G93A) ALS mouse. *Experimental Neurology*; 277(2): 287-295. DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.11.019

Zhang, M., Ferrari, R., Tartaglia, M. C., Keith, J., Surace, E. I., Wolf, C., Sato, M. Grinberg, Y. Liang, Z. Xi, K. Dupont, P. McGoldrick, A. Weichert, P.M. McKeever, R. Schneider, M.D. McCorkindale, C. Manzoni, R. Rademakers, N.R. Graff-Radford, D.W. Dickson, J.E. Parisi, B.F. Boeve, R.C. Petersen, B.L. Miller, W.W. Seeley, J.C. van Swieten, J. van Rooij, Y. Pijnenburg, J. van der Zee, C. Van Broeckhoven, I. Le Ber, V. Van Deerlin, E. Suh, J.D. Rohrer, S. Mead, C. Graff, L. Öijerstedt, S. Pickering-Brown, S. Rollinson, G. Rossi, F. Tagliavini,W.S. Brooks, C. Dobson-Stone, G.M. Halliday, J.R. Hodges, O. Piguet, G. Binetti, L. Benussi, R. Ghidoni, B. Nacmias, S. Sorbi, A.C. Bruni, D. Galimberti, E. Scarpini, I. Rainero, E. Rubino, J. Clarimon, A. Lleó, A. Ruiz, I. Hernández, P. Pastor, M. Diez-Fairen, B. Borroni, F. Pasquier, V. Deramecourt, T. Lebouvier, R. Perneczky, J. Diehl-Schmid, J. Grafman, E.D. Huey, R. Mayeux, M.A. Nalls, D. Hernandez, A. Singleton, P. Momeni, Z. Zeng, J. Hardy, J. Robertson, L. Zinman, E. Rogaeva, R. Ferrari, D.G. Hernandez, M.A. Nalls, J.D. Rohrer, A. Ramasamy, J.B.J. Kwok, C. Dobson-Stone, W.S. Brooks, P.R. Schofield, G.M. Halliday, J.R. Hodges, O. Piguet, L. Bartley, E. Thompson, I. Hernández, A. Ruiz, M. Boada, B. Borroni, A. Padovani, C. Cruchaga, N.J. Cairns, L. Benussi, G. Binetti, R. Ghidoni, G. Forloni, D. Albani, D. Galimberti, C. Fenoglio, M. Serpente, E. Scarpini, J. Clarimón, A. Lleó, R. Blesa, M.L. Wald&ouml, K. Nilsson, C. Nilsson, I.R.A. Mackenzie, G.-Y.R. Hsiung, D.M.A. Mann, J. Grafman, C.M. Morris, J. Attems, T.D. Griffiths, I.G. McKeith, A.J. Thomas, P. Pietrini, E.D. Huey, E.M. Wassermann, A. Baborie, E. Jaros, M.C. Tierney, P. Pastor, C. Razquin, S. Ortega-Cubero, E. Alonso, R. Perneczky, J. Diehl-Schmid, P. Alexopoulos, A. Kurz, I. Rainero, E. Rubino, L. Pinessi, E. Rogaeva, P. St George-Hyslop, G. Rossi, F. Tagliavini, G. Giaccone, J.B. Rowe, J.C.M. Schlachetzki, J. Uphill, J. Collinge, S. Mead, A. Danek, V.M. Van Deerlin, M. Grossman, J.Q. Trojanowski, J. van der Zee, C. Van Broeckhoven, S.F. Cappa, I. Leber, D. Hannequin, V. Golfier, M. Vercelletto, A. Brice, B. Nacmias, S. Sorbi, S.

Bagnoli, I. Piaceri, J.E. Nielsen, L.E. Hjermind, M. Riemenschneider, M. Mayhaus, B. Ibach, G. Gasparoni, S. Pichler, W. Gu, M.N. Rossor, N.C. Fox, J.D. Warren, M. Grazia Spillantini, H.R. Morris, P. Rizzu, P. Heutink, J.S. Snowden, S. Rollinson, A. Richardson, A. Gerhard, A.C. Bruni, R.Maletta, F. Frangipane, C. Cupidi, L. bernardi, M. Anfossi, M.Gallo, M. Elena Conidi,N. Smirne, R. Rademakers, M. Baker, D.W. Dickson, N.R. Graff- Radford, R.C. Petersen, D. Knopman, K.A. Josephs, B.F. Boeve, J.E. Parisi, W.W. Seeley, B.L. Miller, A.M. Karydas, H. Rosen, J.C. van Swieten, E.G.P. Dopper, H. Seelaar, Y.A.L. Pijnenburg, P. Scheltens, G. Logroscino, R. Capozzo, V. Novelli, A.A. Puca, M. Franceschi, A. Postiglione, G. Milan, P. Sorrentino,M. Kristiansen, H.-H. Chiang, C. Graff, F. Pasquier, A. Rollin, V. Deramecourt, T. Lebouvier, D. Kapogiannis, L. Ferrucci, S. Pickering-Brown, A.B. Singleton, J., Hardy, P. y Momeni, A. (2018). C6orf10/LOC101929163 locus is associated with age of onset in C9orf72 carriers. *Brain* 141 2895–2907. DOI: 10.1093/brain/awy238.