

Impacto de la expresión del gen *MAPT* en las relaciones inter-banda de la actividad eléctrica cerebral

A. Maturana-Candelas^{1,2}, J. Poza^{1,2,3}, R. Hornero^{1,2,3}, V. Gutiérrez-de Pablo^{1,2}, C. Gómez^{1,2}

¹ Grupo de Ingeniería Biomédica, Universidad de Valladolid, Valladolid, España, aaron.maturana@gib.tel.uva.es

² Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), España

³ IMUVA, Instituto de Investigación en Matemáticas de la Universidad de Valladolid, Valladolid, España

Resumen

*La enfermedad de Alzheimer (EA) a menudo se relaciona con alteraciones en la actividad eléctrica cerebral. Estas pueden manifestarse como interacciones neurodinámicas entre diferentes bandas de frecuencia en regiones cerebrales específicas. Aunque la EA es una enfermedad multicausal, la implicación de factores bioquímicos en estas alteraciones no es frecuentemente estudiada. Es por ello que la expresión de genes que pueden contribuir a estas perturbaciones es de gran interés. El gen *MAPT* (microtubule associated protein tau) codifica la estructura de la proteína tau, la cual está íntimamente relacionada con la EA. El objetivo de este trabajo es estudiar el impacto de la expresión de este gen en las interacciones inter-banda de la actividad neuronal en la EA. Para ello, se calculó la información mutua (IM) inter-banda a partir de datos de electroencefalograma de 155 sujetos divididos entre pacientes con EA y sujetos de control. A su vez, éstos se subdividieron entre portadores de alelos de riesgo y protectores de *MAPT*. La IM entre la banda zeta y las restantes bandas de frecuencia reveló las diferencias en disrupción más significativas entre genotipos. Este fenómeno podría deberse a las diferencias estructurales de tau, provocadas por diferentes expresiones de *MAPT*, que estarían provocando alteraciones cerebrales incluso en estados preclínicos.*

1. Motivación

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por cambios bioquímicos y anatómicos en el cerebro [1]. Estas alteraciones están asociadas a daño del tejido del sistema nervioso central que culmina en deterioro cognitivo [1]. La disrupción de la integridad estructural cerebral implica variaciones en su funcionalidad, manifestándose en la actividad eléctrica cerebral [2]. En las últimas décadas se han estudiado ampliamente la naturaleza de estas alteraciones y se han desarrollado numerosas técnicas de adquisición y procesado de actividad eléctrica para tal fin. Uno de los métodos más comúnmente empleados para obtener datos funcionales cerebrales es el electroencefalograma (EEG).

El EEG registra información sobre las fluctuaciones de potencial eléctrico en la superficie del cuero cabelludo. Las técnicas de adquisición de EEG pueden realizar un seguimiento de la naturaleza rápida y transitoria de la dinámica neuroeléctrica, gracias a su alta resolución temporal [3]. Además, cuentan con ventajas adicionales, como bajo coste, portabilidad y no invasividad. Estudios previos han demostrado la utilidad de los análisis de señales de EEG en el estudio de las alteraciones de la actividad cerebral provocadas por la EA [3]. Además, el

EEG se ha empleado para llevar a cabo estudios de caracterización de la funcionalidad eléctrica para comprobar el impacto de diversos biomarcadores en la actividad cerebral [4, 5].

Uno de los biomarcadores establecidos como estándar a la hora de diagnosticar EA es la presencia de la proteína tau hiperfosforilada en el tejido nervioso [6]. Tau es una proteína enlazada al citoesqueleto axonal de la neurona, confiriendo estabilidad estructural, además de formar parte de procesos de transporte molecular [6]. Durante la evolución de la EA se observa un desprendimiento de esta proteína a causa de la hiperfosforilación [6]. Este fenómeno resulta en agregados de tau intracelulares llamados ovillos neurofibrilares [6]. Estas estructuras han sido previamente asociadas a efectos neurotóxicos y se ha sugerido como una de las principales causas de atrofia [6]. Por otro lado, se ha demostrado que pequeñas variaciones en la estructura de tau causadas por diferentes genotipos pueden tener un impacto en el desarrollo de la neurodegeneración [7]. Es por ello que el estudio de las características genéticas vinculadas a tau es crucial para comprender sus implicaciones en la actividad neural.

La proteína tau humana está codificada por el gen *MAPT* (microtubule associated protein tau), que abarca alrededor de 150 kb de secuencia de nucleótidos en el cromosoma 17q21.3 [8]. Entre las modificaciones genéticas, la más abundante se manifiesta en forma de polimorfismos de nucleótido único (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) [9]. Los SNP son cambios de base en loci genéticos específicos. Se han realizado múltiples estudios de asociación de todo el genoma para determinar las asociaciones estadísticas entre genotipos concretos y la neurodegeneración [10]. En este sentido, diferentes alelos del gen *MAPT* se han relacionado con la EA [11], lo que indica que diferentes alelos de *MAPT* pueden conferir riesgos o efectos protectores contra los trastornos neurológicos. Previamente, se ha establecido el SNP rs8070723-G como un factor de riesgo significativo en el desarrollo de la EA [12].

Los cambios fisiológicos del cerebro derivados de diferentes especies de tau pueden tener repercusiones en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Debido a que la EA se considera un “síndrome de desconexión”, ello podría reflejarse en anomalías en la comunicación de ciertos subsistemas cerebrales con otros. Se ha sugerido anteriormente que estas sinergias pueden manifestarse en interacciones de la actividad cerebral entre diferentes

bandas de frecuencia [13]. Por este motivo, comprobar en qué medida se alteran estas interacciones en la EA ayudaría a obtener información sobre la perturbación de la funcionalidad cerebral. Así pues, el objetivo de este trabajo es estimar la información que comparte la actividad cerebral en cada banda de frecuencia y las demás. De este modo, será posible cuantificar la disrupción funcional causada por la EA en función de la expresión génica.

2. Materiales y métodos

2.1. Sujetos

Ciento cincuenta y cinco sujetos de edad avanzada (mínimo, 65 años) participaron en este estudio y fueron clasificados como sujetos de control (45) y pacientes con EA (110). La evaluación del estado cognitivo se realizó mediante el test *Mini-Mental State Examination* (MMSE). Cada participante, familiar o representante legal brindó su consentimiento informado, según las recomendaciones del Código de Ética de la Asociación Médica Mundial. Este estudio cumplió con la Declaración de Helsinki y su protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Oporto (Oporto, Portugal, nº 38/CEUP/2018).

2.2. Análisis genético

Se recolectó una muestra de saliva de cada sujeto mediante un kit DNA Genotek Oragene DNA (OG-500). Las muestras biológicas se genotificaron utilizando Thermo Fisher Scientific Axiom™ Spain Biobank Arrays en el Centro Nacional de Genotipado de España (CeGEN, Santiago de Compostela, España), y el *variant calling* del SNP se realizó con Affymetrix Power Tools. Este protocolo fue seguido por análisis individuales y de marcadores, de acuerdo con la guía de mejores prácticas de Affymetrix. El SNP rs8070723 fue calificado como válido en el análisis de control de calidad. Los datos genéticos y demográficos se muestran en la tabla 1.

2.3. Adquisición y pre-procesado de EEG

Se adquirieron cinco minutos de EEG para cada sujeto, con una frecuencia de muestreo de 500 Hz y referenciado promedio. El dispositivo de adquisición fue un sistema EEG Nihon Kohden Neurofax JE-921A de 19 canales. Las posiciones de los electrodos se establecieron en Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, T3, T4, T5, T6, C3, C4, P3, P4, O1, O2, Fz, Cz y Pz del sistema internacional 10–20. Los registros de EEG se obtuvieron en condiciones de reposo en un ambiente relajado y sin ruido con los ojos cerrados. Se

monitorizó el estado de cada sujeto para minimizar la somnolencia. Los datos fueron almacenados en formato ASCII para luego aplicar una etapa de pre-procesado a las señales EEG: (i) sustracción de la media; (ii) filtrado pasabanda con ventana Hamming de 1-30 Hz; (iii) eliminación de ruido causado por la impedancia de los electrodos y señales no cerebrales mediante análisis de componentes independientes; (iv) segmentación de la señal en épocas de 5 segundos; y (v) inspección visual de la señal y rechazo de épocas contaminadas con artefactos. Finalmente, el EEG fue filtrado en las bandas de frecuencia clásicas: delta (1-4 Hz), zeta (4-8 Hz), alfa (8-13 Hz) y beta (13-30 Hz). El procesado y pre-procesado del EEG se realizaron con MATLAB® (versión R2021b, Mathworks, Natick, MA).

2.4. Análisis de EEG

Con el fin de estimar en qué medida la información contenida en la actividad eléctrica es compartida entre bandas de frecuencia, se utilizó la información mutua (IM). La IM permite cuantificar la información compartida entre dos series temporales [14]. Esta medida cuenta con la ventaja sobre el cálculo de correlación simple de ser sensible a interacciones tanto lineales como no lineales [14]. La IM entre dos series temporales $X = \{x_i\}$ e $Y = \{y_i\}$ se define como [14]:

$$IM_{XY} = \sum_{x_i, y_j} P_{XY}(x_i, y_j) \log_2 \frac{P_{XY}(x_i, y_j)}{P_X(x_i)P_Y(y_j)},$$

siendo $P_X(x_i)$ y $P_Y(y_i)$ las probabilidades de que una medición aislada de la serie se encuentre en el i -ésimo elemento de los histogramas $P_X(x)$ y $P_Y(y)$, y siendo $P_{XY}(x, y)$ la densidad de probabilidad conjunta de X e Y . Si las series temporales X e Y son completamente independientes una de otra, la IM es cero [14].

La IM se calculó a partir de cada época de EEG en cada canal consigo misma en diferentes bandas de frecuencia. Por ejemplo, se calculó la IM entre la primera época en el primer canal filtrada en delta y esa misma época filtrada en zeta. Este proceso se iteró para el resto de las bandas de frecuencia, reflejando así las interacciones inter-banda (p. ej. alfa con respecto a delta, zeta y beta). En este trabajo, únicamente se estudió la IM de cada canal consigo mismo debido al elevado coste computacional. A continuación, las interacciones de cada banda con el resto fueron también promediadas, obteniéndose un vector de 19 valores (uno por canal) para cada sujeto y banda “dominante” (delta vs. resto, zeta vs. resto, etc.), clasificados a su vez en portadores del alelo de riesgo o protector. Finalmente, se promediaron los valores de IM por épocas y por sujetos.

SNP rs8070723		Sujetos		Sexo (H:M)		Edad (media ± DT) (años)		MMSE (media ± DT)	
Base	Efecto	C	EA	C	EA	C	EA	C	EA
A	Riesgo	23	62	12:11	34:28	77.7±6.2	81.1±7.0	28.7±1.2	15.7±7.5
G	Protector	22	48	11:11	24:24	81.8±7.8	79.8±7.6	29.0±1.0	14.4±8.4

Tabla 1. Datos genéticos y demográficos. A, adenina; G, guanina; DT, desviación típica; H, hombre; M, mujer; MMSE, puntuación del Mini-Mental State Examination; C, controles; EA, pacientes con enfermedad de Alzheimer.

3. Resultados

La IM del EEG en cada banda de frecuencia fue calculada con respecto a las demás y se promedió entre ellas. Para reflejar las disparidades que pueden revelar los grupos genéticos, se ha propuesto una visualización de los resultados similar a la empleada por Yu *et al.* [15] para expresar diferencias de actividad eléctrica en regiones cerebrales específicas. Para ello, se comparan los valores de controles y los valores de las diferencias entre controles y pacientes. A éstos últimos se les denomina valores de disrupción. De esta manera, quedan expuestas las tendencias provocadas por la enfermedad en un parámetro concreto y cuán disruptivos pueden ser sus efectos en el mismo. En nuestro caso, se ha empleado este método usando la IM. La banda de frecuencia que reveló las diferencias más significativas entre genotipos en ambos ejes fue la banda zeta (p -valores < 0.001 , test U de Mann-Whitney), cuyos resultados son mostrados en la figura 1. Se puede observar que los valores de IM asociados a los sujetos control con alelo de riesgo son más elevados y dispares que los del alelo protector. Por otro lado, los valores de disrupción de IM (*i.e.* eje y) están más agrupados y próximos a cero en el genotipo protector que en el de riesgo. Además, existe una dependencia lineal mayor y negativa en los portadores del alelo de riesgo ($\rho = -0.931$, p -valor < 0.001 , correlación de Pearson) que en los del alelo protector ($\rho = 0.404$, p -valor < 0.086 , correlación de Pearson), siendo ésta última no significativa (para un umbral de significación de $\alpha = 0.05$).

4. Discusión

En este trabajo se obtuvieron los valores de IM que reflejan las interacciones inter-banda de cada canal. Dicho de otra manera, se cuantificó la cantidad de información en una

banda que es transmitida o manifestada en el resto de las bandas de frecuencia en la misma región. La banda zeta reveló las mayores diferencias entre genotipos.

Se pueden comprobar diferencias sustanciales entre los resultados obtenidos en los portadores del alelo de riesgo y protector. Estas variaciones parecen deberse no tanto a los pacientes con EA, sino a la naturaleza de la actividad eléctrica de los propios controles. Uno de los aspectos clave es la elevada diversidad de los valores de IM en sujetos control portadores del alelo de riesgo. Esto podría ser debido a una actividad eléctrica aberrante en diferentes regiones cerebrales. Es sabido que el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas está asociado a la pérdida de conectividad funcional [3]. Así pues, se podría sugerir que los sujetos control con alelo de riesgo podrían estar manifestando signos más cercanos a cuadros neurodegenerativos que los sujetos con alelo protector, a pesar de no haber desarrollado todavía ningún deterioro cognitivo.

Por otro lado, los valores más elevados de IM en los controles con alelo de riesgo indican un aumento de información compartida entre el EEG en la banda zeta y el resto. Esto podría ser un indicador de la pérdida de especialización de los subsistemas que trabajan en dicha banda de frecuencia en la misma región cerebral. También podría ser consecuencia de una ralentización del espectro del EEG. A pesar de que el algoritmo de IM es inmune a disminuciones de potencia, sí podría afectar que la actividad de bandas de frecuencia más elevadas influya en los intervalos asignados a zeta. Se conoce bien la ralentización del EEG como un signo de neurodegeneración [3]. Aludiendo al punto anterior, esta observación también podría estar reflejando estadios fisiológicos más próximos a la neurodegeneración.

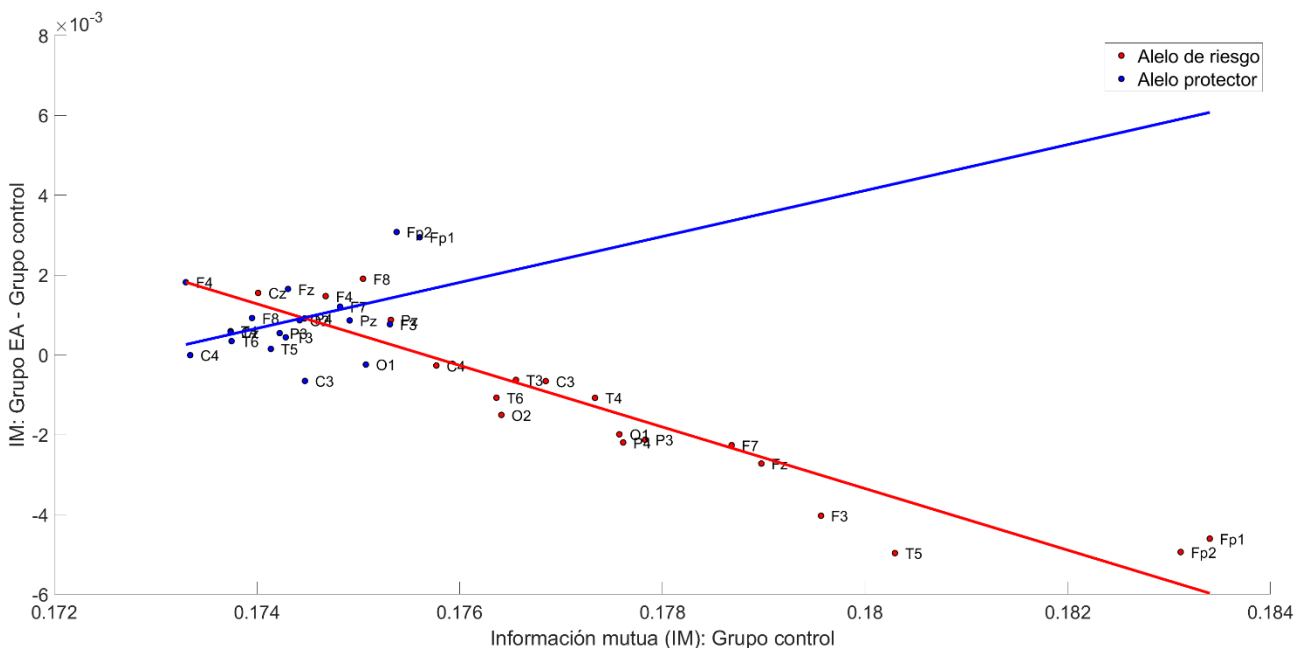


Figura 1. Diagrama de dispersión entre los valores de IM en controles y los valores de disrupción de IM en cada canal de registro. Cada valor representa el promedio de la IM entre el EEG la banda zeta y el resto de bandas de frecuencia.

Por último, el hecho de que los valores de disrupción estén más próximos a cero en el caso de los portadores del alelo protector sugiere un efecto amortiguador, manteniendo las propiedades de la actividad eléctrica en la EA más próximas a estadios preclínicos.

Las diferencias observadas entre grupos genéticos podrían deberse a múltiples causas relacionadas con la naturaleza estructural de tau. Para empezar, podría ser una cuestión de cantidad; se ha sugerido que los distintos alelos *MAPT* están asociados con diversas concentraciones de tau en sujetos amiloides positivos [16]. Otra razón podría ser un plegamiento anormal de tau; un estudio previo sugirió que las alteraciones en el plegamiento de tau pueden conducir a agregaciones de proteínas más elevadas causadas por una mayor interacción tau-tau [17]. Por ello, dado que la conformación espacial de la proteína puede influir en su agregación, una isoforma de tau cuya configuración afecte a su plegamiento podría conducir a mayores concentraciones de esta molécula y desarrollar respuestas citotóxicas e inmunológicas más intensas. Este plegamiento también podría repercutir en la propagación de tau por el tejido nervioso, lo cual podría tener un impacto en sus efectos citotóxicos. Anteriormente, se ha reportado una asociación entre diferentes configuraciones estructurales de tau y distintos patrones de propagación en el cerebro [18].

A pesar de que los resultados son relevantes, es necesario mencionar ciertas limitaciones de este estudio. El más evidente es la inviabilidad de estudiar la IM entre diferentes canales debido al elevado coste computacional asociado. Realizar este cálculo permitiría comprobar interacciones entre sistemas cerebrales alejados entre sí que trabajen en diferentes bandas de frecuencia sincrónicamente. Por otro lado, aunque la actividad cerebral a nivel de sensor ofrece información sobre los procesos de activación local, la aplicación de un algoritmo de localización de fuentes podría ser útil para afinar la interpretación fisiológica de los resultados. Por último, muchos otros SNPs han sido documentados previamente en *MAPT*, siendo el rs8070723 sólo uno de ellos. Ampliar este estudio exploratorio a diferentes variaciones de este gen sería crucial para sugerir un vínculo causal entre las alteraciones inter-banda y las propiedades de tau.

5. Conclusión

A la vista de los resultados obtenidos, se puede sugerir que la expresión del gen *MAPT* tiene un impacto en las interacciones inter-banda. Estas alteraciones podrían estar ligadas a diferentes configuraciones estructurales de la proteína tau. Además, la banda zeta es más sensible al genotipo que las demás, puesto que las interacciones de esta con el resto de bandas son las más significativas. Esto podría arrojar pistas sobre procesos cerebrales concretos que puedan verse más alterados por causas bioquímicas.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por la 'Comisión Europea' y el 'Fondo Europeo de Desarrollo Regional' (FEDER) a través del proyecto 'Análisis y correlación

entre la epigenética y la actividad cerebral para evaluar el riesgo de migraña crónica y episódica en mujeres' ('Programa de Cooperación Transfronteriza Interreg V-A España-Portugal 2014-2020'), por el 'Ministerio de Ciencia e Innovación - Agencia Estatal de Investigación' y FEDER a través del proyecto PGC2018-098214-A-I00, y por el 'CIBER en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)' a través del 'Instituto de Salud Carlos III' cofinanciado con fondos FEDER.

Referencias

- [1] Alzheimer's Association. 2022 Alzheimer's disease facts and figures, 2022.
- [2] D'Amelio, M., & Rossini, P. M. Brain excitability and connectivity of neuronal assemblies in Alzheimer's disease: from animal models to human findings. *Prog. Neurobiol.*, vol 99, sup 1, 2012, pp 42-60.
- [3] Vecchio, F., *et al.* Resting state cortical EEG rhythms in Alzheimer's disease: toward EEG markers for clinical applications: a review. *Suppl. Clin. Neurophysiol.*, vol 62, 2013, pp 223-236.
- [4] Smailovic, U., *et al.* Quantitative EEG power and synchronization correlate with Alzheimer's disease CSF biomarkers. *Neurobiol. Aging*, vol 63, 2018, pp 88-95.
- [5] Smailovic, U., *et al.* Synaptic molecular and neurophysiological markers are independent predictors of progression in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.*, vol 83, sup 1, 2021, pp 355-366.
- [6] Chi, H., *et al.* Tauopathy. In *Cognitive Disorders*. IntechOpen, 2018.
- [7] Chornenkyy, Y., *et al.* Tau and TDP-43 proteinopathies: kindred pathologic cascades and genetic pleiotropy. *Lab. Invest.*, vol 99, sup 7, 2019, pp 993-1007.
- [8] Pittman, A. M., *et al.* Untangling the tau gene association with neurodegenerative disorders. *Hum. Mol. Genet.*, vol 15, sup 2, 2006, pp 188-195.
- [9] Collins, F. S., *et al.* Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science*, vol 278, sup 5343, 1997, pp 1580-1581.
- [10] Tábuas-Pereira, M., *et al.* (2020). Alzheimer's disease genetics: Review of Novel Loci associated with disease. *Curr. Genet. Med. Rep.*, vol 8, sup 1, 2020, pp 1-16.
- [11] Gerrish, A., *et al.* The role of variation at A β PP, PSEN1, PSEN2, and MAPT in late onset Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.*, vol 28, sup 2, 2012, pp 377-387.
- [12] Allen, M., *et al.* Association of MAPT haplotypes with Alzheimer's disease risk and MAPT brain gene expression levels. *Alzheimer's Res. Ther.*, vol 6, sup 4, 2014, pp 1-14.
- [13] Morillas-Romero, *et al.* Spontaneous EEG theta/beta ratio and delta-beta coupling in relation to attentional network functioning and self-reported attentional control. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.*, vol 15, sup 3, 2015, pp 598-606.
- [14] Jeong, J., *et al.* (2001). Mutual information analysis of the EEG in patients with Alzheimer's disease. *Clin. Neurophysiol.*, vol 112, sup 5, 2001, pp 827-835.
- [15] Yu, M., *et al.* Selective impairment of hippocampus and posterior hub areas in Alzheimer's disease: an MEG-based multiplex network study. *Brain*, vol 140, sup 5, 2017, pp 1466-1485.
- [16] Kauwe, J. S., *et al.* Variation in MAPT is associated with cerebrospinal fluid tau levels in the presence of amyloid-beta deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol 105, sup 23, 2008, pp 8050-8054.
- [17] Rudenko, L. K., *et al.* Intraneuronal tau misfolding induced by extracellular amyloid- β oligomers. *J. Alzheimer's Dis.*, vol 71, sup 4, 2019, pp 1125-1138.
- [18] Hallinan, G. I., *et al.* Tau misfolding efficiently propagates between individual intact hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, vol 39, sup 48, 2018, pp 9623-9632.