

Efecto del estímulo masticatorio y estrés agudo sobre la interleuquina 6, la memoria y el aprendizaje espacial en ratones Balb/c

Effect of shewing stimulus and acute stress on interleukin 6, memory and spatial learning in Balb/c mice

Elías Ernesto Aguirre-Siancas ^{1,a}, Libertad Alzamora-Gonzales ^{2,b}, Erasmo Honorio Colona-Vallejos ^{2,c}, Eliberto Ruiz-Ramírez ^{3,d}, Melissa Aracely Becerra-Bravo ^{3,e}, Oscar Sigifredo Portilla-Flores ^{1,f}, Rosa María Condori-Macuri ^{2,g}, Luis Javier Crispín-Huamaní ^{1,h}, Nelly Maritza Lam-Figueroa ^{1,i}

¹ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú

² Facultad de Biología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú

³ Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú

^a Doctor en neurociencias. ORCID: 0000-0003-4713-5511

^b Doctora en biología. ORCID: 0000-0002-7425-7453

^c Magister en biología molecular. ORCID: 0000-0001-9759-288X

^d Magister en farmacología. ORCID: 0000-0002-5340-7168

^e Bachiller en odontología. ORCID: 0000-0002-3672-4153

^f Bachiller en medicina. ORCID: 0000-0003-3432-6271

^g Bachiller en biología. ORCID: 0000-0002-2177-3462

^h Bachiller en medicina. ORCID: 0000-0002-9044-9594

ⁱ Doctora en medicina. ORCID: 0000-0003-3747-8123

An Fac med. 2023;84(1):63-69 / DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v84i1.24458>.

Correspondencia:

Elías Ernesto Aguirre-Siancas
eaguirres@unmsm.edu.pe

Recibido: 21 de enero 2023

Aprobado: 10 de marzo 2023

Publicación en línea: 27 de marzo 2023

Conflicto de interés: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Fuente de financiamiento: El financiamiento del trabajo fue hecho por el Vicerrectorado de Investigación y Postgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Contribuciones de los autores: EEAS, LAG, EHC, ERR, y MABB conceptualizaron el estudio. Todos los autores participaron en el análisis de datos, redacción del manuscrito, revisiones críticas y aprobaron la versión final del artículo. Además, asumen la responsabilidad por lo publicado.

Citar como: Aguirre-Siancas E, Alzamora-Gonzales L, Colona-Vallejos E, Ruiz-Ramírez E, Ruiz-Ramírez M, Portilla-Flores O, et al. Efecto del estímulo masticatorio y estrés agudo sobre la interleuquina 6, la memoria y el aprendizaje espacial en ratones Balb/c. *An Fac med.* 2023; 84(1):63-69. DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v84i1.24458>

Resumen

Introducción. El estrés agudo altera la memoria y aprendizaje espacial y la expresión de la interleuquina 6 (IL-6), mientras que el estímulo masticatorio evitaría dichos efectos. **Objetivo.** Determinar el efecto del estímulo masticatorio y el estrés agudo sobre la expresión de interleuquina 6, la memoria y el aprendizaje espacial en ratones. **Métodos.** Experimento con 70 ratones albinos machos de 2 meses de edad de la cepa Balb/c que fueron distribuidos aleatoriamente en grupo A1: estrés agudo 1 hora; grupo A2: estrés agudo 1 hora + estímulo masticatorio 1 hora; grupo B1: estrés agudo 2 horas; grupo B2: estrés agudo 2 horas + estímulo masticatorio 2 horas; grupo C1: estrés agudo 3 horas; grupo C2: estrés agudo 3 horas + estímulo masticatorio 3 horas; y grupo D: sin intervención. Durante 3 días, se evaluó la memoria y el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris. La IL-6 fue determinada mediante ELISA. **Resultados.** La IL-6 fue mayor en el grupo B2 vs los demás grupos ($p < 0,001$). Además, en el primer día de evaluación, la adquisición de memoria y aprendizaje espacial fue menor en el grupo A1 vs A2 ($p = 0,042$). **Conclusión.** Solo en el primer día de evaluación encontramos que el estímulo masticatorio previno la disminución de la adquisición de memoria y aprendizaje espacial en ratones sometidos a estrés agudo de baja intensidad. Los resultados en general no fueron concluyentes sobre el efecto del estímulo masticatorio. Además, la IL-6 fue mayor en el estrés + el estímulo masticatorio (grupo B2) sobre el resto.

Palabras clave: Aprendizaje Espacial; Estrés Fisiológico; Interleucina-6; Masticación; Memoria Espacial (Fuente: DeCS BIREME)

Abstract

Introduction. Acute stress alters memory and spatial learning and the expression of interleukin 6, the chewing stimulus would prevent these effects. **Objective.** To determine the effect of chewing stimulation and acute stress on the expression of interleukin 6 and memory and spatial learning in mice. **Methods.** Experiment where 70 male albino mice of the Balb/c of age 2 month were randomly distributed into: Group A1: acute stress 1 hour; Group A2: acute stress 1 hour + chewing stimulus 1 hour; Group B1: acute stress 2 hours; Group B2: acute stress 2 hours + chewing stimulus 2 hours; Group C1: acute stress 3 hours; Group C2: acute stress 3 hours + chewing stimulus 3 hours; Group D: without intervention. For 3 days, spatial memory and learning were tested in the Morris water maze. Interleukin 6 (IL-6) was analyzed by ELISA test. **Results.** IL-6 was higher in the B2 group vs the other groups ($p < 0.0001$). In addition, on the first day of evaluation, the acquisition of spatial memory and spatial was lower in the A1 vs. A2 group ($p = 0.042$). **Conclusion.** Only on the first day of evaluation, we found that the masticatory stimulus prevented the decrease in memory acquisition and spatial learning in mice subjected to low-intensity acute stress. The results were generally inconclusive on the effect of masticatory stimulation. In addition, IL-6 was higher in the stress + masticatory stimulus (group B2) over the rest.

Keywords: Spatial Learning; Stress, Physiological; Interleukin-6; Spatial Learning; Spatial Memory. (Source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

Desde hace ya algunos años, la masticación ha dejado de ser entendida solamente como una actividad eminentemente digestiva; muchos estudios la relacionan como un modulador de diversos procesos en el sistema nervioso central (SNC) ^(1,2). La masticación es una fuente de estimulación sensorial que llega principalmente a la formación hipocampal, y contribuye a preservar y promover los procesos cognitivos; sugiriéndose que la deficiencia masticatoria puede promover alteraciones en funciones superiores ⁽³⁾. Diversos diseños en animales de experimentación han mostrado que la masticación deficiente causa anomalías hipocampales a nivel anatómico, funcional y en última instancia molecular; resaltándose la disminución en: la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, las neuronas piramidales en CA1 y CA3, la neurogénesis del giro dentado, el aumento e hipertrofia de células gliales y el deterioro de la memoria y aprendizaje espacial ^(3,4).

El estrés agudo es una respuesta psicológica, fisiológica e inmediata ante estímulos nocivos y ante cambios ambientales que activan al sistema autónomo y neuroendocrino, donde a través del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA) provoca cambios en el nivel de diversas citoquinas circulantes ⁽⁵⁾. Apretar los dientes y roer o morderse las uñas son comportamientos masticatorios ante el estrés ⁽³⁾. La función masticatoria altera la actividad del eje HPA y del sistema nervioso autónomo, disminuyendo los niveles plasmáticos de catecolaminas y de corticosterona, pudiendo considerarse a la masticación como un factor que contribuiría a reducir las alteraciones inducidas por el estrés sobre las funciones cognitivas ^(1,2,3).

Los estudios acerca de la biología del estrés involucran, principalmente, a las citoquinas inflamatorias como la interleuquina-6 (IL-6) y la interleuquina-1 beta (IL-1 β), así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la proteína C reactiva (PCR) ⁽⁶⁾, los cuales se han estudiado con mayor frecuencia como marcadores de interfaz entre la psicología y la biología,

debido a que estas citoquinas se asocian o responden a estímulos psicosociales ⁽⁷⁾. Estas citoquinas son proteínas solubles de bajo peso molecular secretadas por una diversidad de tipos celulares como los linfocitos, macrófagos, células asesinas naturales, mastocitos y células del estroma; participando en la respuesta inmunitaria y actuando como importantes mediadores asociados a la red de comunicación del sistema inmunitario ⁽⁸⁾.

El estrés agudo induce, principalmente, la expresión de IL-6 ^(5,9). La IL-6 es una glicoproteína de 21 a 26 kDa conformada por 212 aminoácidos, es producida por muchos tipos de células, incluidas las células hematopoyéticas, los miocitos, las células endoteliales y adipocitos ⁽¹⁰⁾. Dentro del SNC, la IL-6 es una molécula con potencial tanto beneficioso como destructivo, pues desempeña funciones esenciales en el desarrollo, la diferenciación y la regeneración celular, pudiendo ser secretada por microglías, astrocitos y neuronas ⁽¹¹⁾. Un experimento en ratas reportó que la deficiencia de IL-6, por bloqueo mediante anticuerpos anti-IL-6, produjo déficit en una tarea de aprendizaje inverso ⁽¹²⁾; sin embargo, otro estudio encontró que la misma deficiencia de IL-6, igualmente por bloqueo, aumentó la potenciación a largo plazo y mejoró la memoria dependiente del hipocampo ⁽¹³⁾. Otro estudio encontró, en ratones *knockout* para IL-6, una mejor memoria y aprendizaje espacial comparados con los ratones no modificados genéticamente, al ser evaluados en un laberinto de brazos radial ⁽¹⁴⁾. Algunos estudios sobre IL-6 y aprendizaje y plasticidad neuronal mostraron que la eliminación genética de IL-6 no interrumpió el aprendizaje y la memoria, mientras que la sobreexpresión, o la aplicación sistémica de IL-6 causó un amplio deterioro de la memoria ⁽¹⁵⁾.

En general, por una parte, se entiende que el estrés agudo eleva la expresión sérica de IL-6, y, por otra parte, que el estímulo masticatorio evita los efectos del estrés sobre las funciones cognitivas entre ellas la memoria y aprendizaje espacial; sin embargo, la relación entre todas estas variables no es entendida claramente ni tampoco ha sido previamente investigada, sino solo de manera parcial y

con resultados contradictorios ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. Debido a ello el objetivo de la investigación fue determinar el efecto del estímulo masticatorio sobre el estrés agudo en la expresión sérica de IL-6 y en la memoria y aprendizaje espacial en ratones Balb/c.

MÉTODOS

Diseño y sujetos de

experimentación

Realizamos un estudio experimental en 70 ratones albinos machos de 8 semanas de edad de la cepa BALB/c adquiridas en el Centro de Producción de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú. Los roedores fueron ambientados durante una semana en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; luego de la ambientación, la muestra fue distribuida de manera aleatoria en 7 grupos de 10 ratones cada uno.

Los grupos de experimentación fueron: grupo A1: estrés agudo 1 hora, grupo A2: estrés agudo 1 hora + estímulo masticatorio 1 hora, grupo B1: estrés agudo 2 horas, grupo B2: estrés agudo 2 horas + estímulo masticatorio 2 horas, grupo C1: estrés agudo 3 horas, grupo C2: estrés agudo 3 horas + estímulo masticatorio 3 horas, grupo D: control sin estrés ni estímulo masticatorio.

Inducción del estrés agudo por inmovilización

Después de la semana de ambientación fue inducido estrés por inmovilización a todos los grupos experimentales a excepción del control. Dicha inducción consistió en colocar al roedor en una caja de restricción de movimiento de poliestireno transparente, de acuerdo con el diseño de Lam-Figueroa et al 2020 ⁽¹⁸⁾, como se observa en la figura 1A.

La cuantificación del estrés agudo fue en base al tiempo de permanencia de los animales en la caja de restricción, fue de 1 hora en los grupos A1 y A2; de 2 horas en los grupos B1 y B2 y de 3 horas en los grupos C1 y C2. Dicha inmovilización se realizó una vez al día entre las 8:00 y 13:00 horas durante 3 días consecutivos en cada grupo experimental.

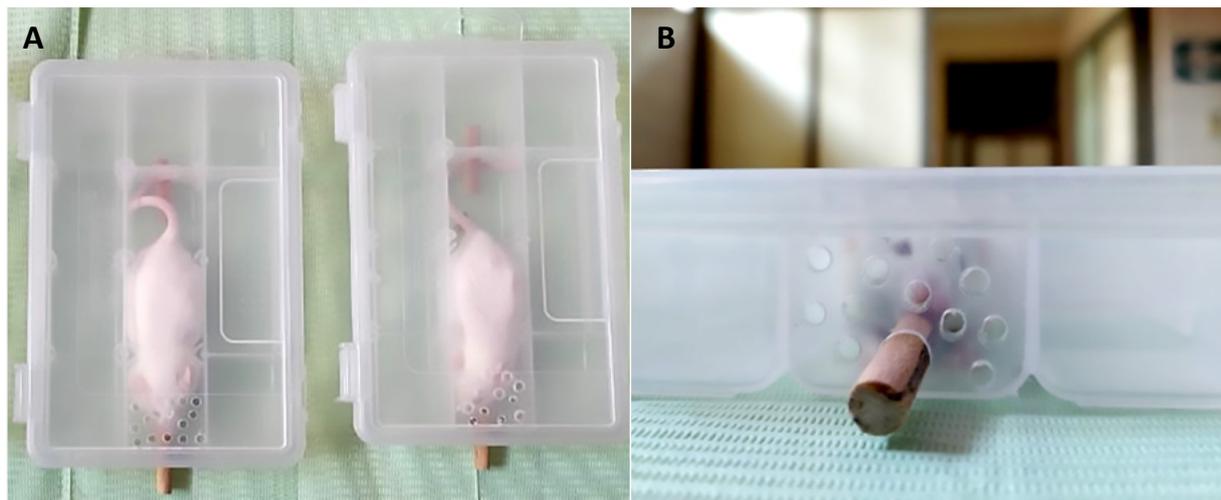


Figura 1. Inducción de estrés agudo y estímulo masticatorio en los ratones Balb/c. A: Inmovilización del animal en la caja de restricción. B: Primer plano del animal royendo la varilla de madera.

Inducción del estímulo masticatorio

A los grupos A2, B2 y C2 se les permitió roer una varilla de madera durante todo el tiempo que duró el sometimiento al estrés agudo por inmovilización, siguiendo lo descrito por el diseño de Kubo *et al.* ⁽¹⁹⁾, como se observa en la figura 1B. La cuantificación de dicha variable fue en base al tiempo que los ratones royeron la varilla que fue de 1 hora en el grupo A1, de 2 horas en el grupo B2 y de 3 horas en el grupo C2. A los grupos A1, B1 y C1 no se les suministró dicha varilla.

Procedimiento para evaluar la adquisición de memoria y

aprendizaje espacial

Se empleó el laberinto acuático de Morris (LAM), de acuerdo con los parámetros descritos por Aguirre-Siancas ⁽²⁰⁾ y que consistió en un tanque de plástico de forma circular de 60 cm de diámetro y 30 cm de altura que se dividió en 4 cuadrantes. Dentro del LAM se colocó un dispositivo denominado «*plataforma de escape*» hecho de plástico, con una altura de 23 cm, un área cuadrada superficial de 36 cm² y que se ubicó siempre en el mismo cuadrante. El LAM se llenó hasta los 24 cm de altura con agua tintada de negro, la cual se mantuvo a una temperatura de 22 ± 2 °C. La plataforma de escape quedó oculta 1 cm por debajo del nivel del agua.

La evaluación de la adquisición de memoria y aprendizaje espacial fue realizada en cada animal a medida que terminaban con su tratamiento de restricción. Dicha evaluación se realizó entre las 08:00 y 13:00 horas. Cada ratón realizó 4 ensayos separados por 60 s de descanso. Un ensayo consistió en la liberación del animal, de manera aleatoria, de alguno de los 4 cuadrantes posibles. El ensayo concluyó cuando el roedor se posó por lo menos 15 s sobre la plataforma oculta o si es que nadó un tiempo máximo de 60 s sin encontrar la plataforma, en tal caso el puntaje asignado al ratón fue de 90 s de duración del ensayo. La cuantificación de esta variable se hizo en base al tiempo en que los animales llegaron a la plataforma oculta. Se consideró una mayor adquisición de memoria y aprendizaje espacial cuando menos tiempo demoró el roedor en llegar dicha plataforma. Dicho procedimiento se realizó por 3 días consecutivos. Todos los ensayos fueron filmados y luego se proyectaron en una computadora para obtener los tiempos que demoró cada ratón mediante mediciones cronométricas en concordancia con el procedimiento descrito por Oyuela *et al.* ⁽²¹⁾

Evaluación de la concentración sérica de IL-6

La determinación de la citoquina se realizó al terminar el tercer día de experimentos, luego de la última evaluación de memoria y aprendizaje espacial. La co-

lección de la muestra de sangre fue mediante punción cardiaca en tubos Minicollect® Z serum con una jeringa estéril de 1 mL 25Gx5/8 marca Segurimaxx. La muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

La cuantificación de la citoquina fue mediante un kit de ELISA sándwich para IL-6 (Invitrogen 88706488). La concentración de citoquinas fue calculada utilizando regresión polinómica de orden 2 mediante el lector de ELISA (Sinowa ER500) a D.O₄₅₀ y D.O₆₃₀, todo esto de acuerdo con el diseño de Aguirre-Siancas *et al.* ⁽²²⁾

Aspectos éticos

El protocolo del estudio fue aprobado por el Vicerrectorado de Investigación y Postgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con código A1901021. La manipulación de los animales se realizó respetando las normas internacionales de uso de animales de experimentación de la *Office of Animal Care and Use of National Institutes of Health*.

Análisis estadístico

El análisis y la interpretación de los datos se realizó empleando el programa SPSS versión 20 para Windows. Debido a la normalidad de los datos, evaluado con la prueba de Shapiro-Wilk, utilizamos la prueba t de Student, el análisis de varian-

za (ANOVA) y la prueba de Tukey. El nivel de significancia fue de 0,05.

RESULTADOS

La concentración de IL-6 fue mayor en el grupo de estrés agudo 2 horas + estímulo masticatorio 2 horas respecto a los demás grupos y al control ($p < 0,001$) (Tabla 1). No se encontró diferencias entre las medias del tiempo para realizar la prueba de memoria y aprendizaje espacial entre los grupos de experimentación, este resultado se dio en los tres días de evaluación (Tabla 2). Respecto a la comparación de medias dentro de cada grupo experimental, se observa que, a excepción del grupo A2, el tiempo para realizar la prueba fue mayor en el primer día. Sin embargo, solo en el grupo A1 se observaron diferencias significativas entre las medias del tiempo para realizar la prueba entre los tres días ($p = 0,002$) (Tabla 3).

En la comparación de las medias de los tiempos entre los grupos de estrés + estímulo masticatorio vs grupo con solamente estrés, se encontró que, en el primer día de ensayos, el grupo de estrés 1 hora demoró más tiempo que el grupo de estrés 1 hora + estímulo masticatorio 1 hora en encontrar la plataforma de escape ($p = 0,042$). En las demás comparaciones no hubo diferencias significativas (Tabla 4).

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, no encontramos diferencias en la adquisición de memoria

Tabla 1. Comparación entre grupos de experimentación de la concentración sérica de interleuquina 6 en ratones Balb/c

Grupos	Interleuquina 6 (pg/mL) Media (DE)	Valor de p ^a	F
A1	17,89 (1,88)		
A2	16,26 (1,04)		
B1	14,01 (4,14)		
B2	38,39 (8,19) ^b	<0,001	16,48
C1	10,57 (0,24)		
C2	10,68 (0,14)		
D	23,68 (8,53)		

A1: Estrés agudo 1 hora; A2: Estrés agudo 1 hora + estímulo masticatorio 1 hora; B1: Estrés agudo 2 horas; B2: Estrés agudo 2 horas + estímulo masticatorio 2 horas; C1: Estrés agudo 3 horas; C2: Estrés agudo 3 horas + estímulo masticatorio 3 horas; D: grupo control.

DE: Desviación estándar. A: Prueba de ANOVA. b Grupo con media que es significativamente diferente a los demás grupos (prueba de Tukey).

y aprendizaje espacial entre los grupos de experimentación en ninguno de los 3 días de evaluaciones. Sin embargo, cuando se evaluó, a los animales agrupándolos por tiempo de exposición al estrés, se encontró una mayor adquisición de memoria y aprendizaje espacial en el grupo sometido a estrés de 1 hora + estímulo masticatorio 1 hora vs estrés de 1 hora, solo en el primer día de evaluación. Este hallazgo no es consistente con las investigaciones que reportan que el estímulo masticatorio previene los déficits de aprendizaje al evitar la disminución del factor neurotrófico derivado del cerebro y regular la expresión de los receptores de cortisol a nivel hipocámpal, los cuales son biomarcadores involucrados en la memoria y aprendizaje^(17, 19, 23). Se sabe

también que una masticación eficiente aumenta la expresión del ARNm de los receptores de glutamato, el cual es necesario para el adecuado metabolismo del neurotransmisor indispensable para la memoria y aprendizaje⁽²⁴⁾

Miyake *et al.*⁽¹⁷⁾, encontraron que el estrés agudo por inmovilización, produce en ratas menor memoria y aprendizaje espacial y menor número de neuronas inmunopositivas al receptor de glucocorticoide en el hipocampo, comparado con el grupo al que se inmovilizó y permitió masticar una varilla de madera; en dicha investigación usaron un protocolo donde previamente entrenaron a los animales en el LAM durante 4 días, después de los cuales los sometieron por una sola vez a estrés agudo por 2 horas y un día después

Tabla 2. Comparación intergrupos mediante análisis de varianza de la adquisición de la memoria y aprendizaje espacial medido en segundos durante los 3 días de trabajo en ratones Balb/c

Grupos	Día 1			Día 2			Día 3		
	Tiempo (s) Media (DE)	Valor de p	F	Tiempo (s) Media (DE)	Valor de p	F	Tiempo (s) Media (DE)	Valor de p	F
A1	57,03 (23,72)			23,07 (12,62)			24,71 (12,38)		
A2	33,32 (18,30)			39,15 (19,99)			19,57 (5,78)		
B1	44,66 (23,56)			26,70 (20,52)			18,37 (10,66)		
B2	37,13 (21,51)	0,068	2,11	26,32 (12,17)	0,56	0,82	16,20 (10,22)	0,13	1,75
C1	54,56 (25,43)			34,29 (21,06)			27,36 (24,00)		
C2	54,61 (17,77)			32,02 (16,62)			27,81 (15,85)		
D	31,76 (14,77)			33,75 (17,63)			13,61 (11,04)		

A1: Estrés agudo 1 hora; A2: Estrés agudo 1 hora + estímulo masticatorio 1 hora; B1: Estrés agudo 2 horas; B2: Estrés agudo 2 horas + estímulo masticatorio 2 horas; C1: Estrés agudo 3 horas; C2: Estrés agudo 3 horas + estímulo masticatorio 3 horas; D: Control.

DE: Desviación estándar. F: estadístico F

Tabla 3. Comparación intragrupo mediante análisis de varianza de la adquisición de la memoria y aprendizaje espacial medido en segundos durante los 3 días de trabajo

Grupos	Día 1 Tiempo (s) Media (DE)	Día 2 Tiempo (s) Media (DE)	Día 3 Tiempo (s) Media (DE)	Valor de p ^a	F
A1	57,03 ^b (23,72)	23,07 (12,62)	24,71 (12,38)	0,002	9,91
A2	33,32 (18,30)	39,15 (19,99)	19,57 (5,78)	0,111	2,58
B1	44,66 (23,56)	26,70 (20,52)	18,37 (10,66)	0,074	3,16
B2	37,13 (21,51)	26,32 (12,17)	16,20 (10,22)	0,068	3,27
C1	54,56 (25,43)	34,29 (21,06)	27,36 (24,00)	0,077	3,09
C2	54,61 (17,77)	32,02 (16,62)	27,81 (15,85)	0,097	2,77

A1: Estrés agudo 1 hora; A2: Estrés agudo 1 hora + estímulo masticatorio 1 hora; B1: Estrés agudo 2 horas; B2: Estrés agudo 2 horas + estímulo masticatorio 2 horas; C1: Estrés agudo 3 horas; C2: Estrés agudo 3 horas + estímulo masticatorio 3 horas.

DE: Desviación estándar. F: Estadístico F. a Prueba de ANOVA para muestras relacionadas. b Media es significativamente diferente de las otras dos.

evaluaron su memoria y aprendizaje. En el presente trabajo se empleó un protocolo diferente, pues los animales fueron evaluados en el LAM inmediatamente después del estrés agudo. Estas diferencias procedimentales pueden explicar los resultados no concordantes, aunque hay coincidencias parciales si observamos los resultados entre los grupos A1 vs A2 en el primer día de evaluación.

El estrés agudo, a diferencia del estrés crónico, genera una respuesta adaptativa que proporciona la energía que contribuye a que los organismos vivos puedan superar el factor estresante al cual son sometidos⁽²⁵⁾. En el estrés agudo se activa inmediatamente el sistema nervioso simpático y poco tiempo después el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), produciéndose el aumento sistémico de catecolaminas y posteriormente de cortisol, los cuales mantiene sus niveles

plasmáticos dependiendo la intensidad del estímulo estresor⁽²⁶⁾. Se encontró una menor adquisición de memoria y aprendizaje espacial en los ratones sometidos a estrés por 1 hora (grupo A1) en el primer día, comparado con el segundo y tercer día dentro del mismo grupo. Sugiriendo que el estrés de baja intensidad (1h), al pasar los días, tiene algún rol en el mejoramiento de la memoria y aprendizaje. *Ye et al.*⁽²⁷⁾, empleando el LAM, encontró que el estrés agudo de baja intensidad mejora la memoria y aprendizaje espacial comparando animales sometidos a estrés agudo vs controles no estresados. Los investigadores explican dichos resultados a través de la regulación de los receptores sensibles a ácido (ASIC), donde el aumento de la corriente de ASIC sería consecuencia del incremento de cortisol en el estrés agudo⁽²⁷⁾. Resaltando que los ASIC se expresan en gran medida en las neuronas centrales y sensoriales periféricas

y están implicadas en múltiples procesos fisiológicos y patológicos⁽²⁸⁾.

El estrés produce cambios a nivel inmunológico, con variación en la expresión de diversas citoquinas que pueden generar diversas alteraciones como los trastornos psiquiátricos, enfermedades sistémicas como las infecciones, las enfermedades autoinmunes y el cáncer⁽⁶⁾. En diversos trabajos en modelos murinos se ha encontrado que el estrés agudo aumentó la expresión de IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) comparados con los controles no estresados^(5, 9, 29). En nuestro trabajo se ha encontrado que la IL-6 fue mayor en los roedores tratados con estrés agudo 2 horas + estímulo masticatorio 2 horas. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por *Chiba et al.*⁽³⁰⁾, quienes encontraron que los ratones inmovilizados en un cilindro masticando una tira de plástico durante 1

Tabla 4. Comparación entre grupos expuestos a estrés agudo versus estrés agudo más estímulo masticatorio durante diferentes tiempos de exposición

Comparaciones entre grupos	Día 1 Tiempo (s) Media (DE)	Valor de p ^a	Día 2 Tiempo (s) Media (DE)	Valor de p ^a	Día 3 Tiempo (s) Media (DE)	Valor de p ^a
A1 vs A2	57,03 (23,72)	0,042	23,07 (12,62)	0,075	24,71 (12,38)	0,310
	33,32 (18,30)		39,15 (19,99)		19,57 (5,78)	
B1 vs B2	44,66 (23,56)	0,520	26,70 (20,52)	0,970	18,37 (10,66)	0,680
	37,13 (21,51)		26,32 (12,17)		16,20 (10,22)	
C1 vs C2	54,56 (25,43)	0,990	34,29 (21,06)	0,810	27,36 (24,00)	0,970
	54,61 (17,77)		32,02 (16,62)		27,81 (15,85)	

A1: Estrés agudo 1 hora; A2: Estrés agudo 1 hora + estímulo masticatorio 1 hora; B1: Estrés agudo 2 horas; B2: Estrés agudo 2 horas + estímulo masticatorio 2 horas; C1: Estrés agudo 3 horas; C2: Estrés agudo 3 horas + estímulo masticatorio 3 horas.

DE: Desviación estándar. a Prueba t de Student para muestras relacionadas.

hora tuvieron niveles incrementados de IL-6, aunque en los ensayos de nuestro estudio esta diferencia se encontró en los animales después de 2 horas de tratamiento. Del mismo modo, en pacientes con desordenes temporomandibular y en sus controles sanos se halló que el apretamiento repetitivo de los dientes aumentó los niveles de IL-6⁽³¹⁾. Además, en experimentos *in vitro* de músculos maseteros de ratones estimulados por electrochoque, que fueron alimentados con una dieta extradura, se ha demostrado un aumento en la expresión y liberación de IL-6 en el músculo, lo cual fue mediado por ATP y receptores purinérgicos P2Y/P2X^(32,33).

Dentro de las limitaciones, consideramos que el empleo de más pruebas comportamentales, para evaluar la memoria y aprendizaje espacial, podrían habernos dado una visión más completa sobre dicha variable, dada la existencia de laberintos terrestres que tiene otro tipo de marco conceptual al que se ha empleado en el trabajo. Además, el empleo de indicadores más sensibles como pruebas genómicas podrían darnos una mayor precisión en los resultados de las variables estudiadas.

En conclusión, el estímulo masticatorio previene la disminución en la adquisición de memoria y aprendizaje espacial en ratones sometidos a estrés agudo de baja intensidad, como fue visible en el primer día de evaluación en el grupo inmovilizado por 1 hora. Además, en el grupo donde solamente se indujo estrés agudo por 1 hora, se observó una mejora de la adquisición de información espacial a medida que pasaron los días. Por otra parte, la IL-6 fue mayor en el grupo de estrés + el estímulo masticatorio por 2 horas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lopez-Chaichio L, Padiar-Molina M, O'Valle F, Gil-Montoya J, Catena A, Galindo-Moreno P. Oral health and healthy chewing for healthy cognitive ageing: A comprehensive narrative review. *Gerodontology*. 2021; 38(2): 126-135. DOI: 10.1111/ger.12510.
- Chuhuaicura P, Dias F, Arias A, Lezcano M, Fuentes R. Mastication as a protective factor of the cognitive decline in adults: A qualitative systematic review. *Int Dent J*. 2019; 69(5): 334-340. DOI: 10.1111/idj.12486.
- Aguirre-Siancas EE. Bases neurocientíficas de la función masticatoria y su efecto sobre el estrés y las funciones cognitivas. *Rev Chil Neuropsiquiatr*. 2017; 55: 9-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272017000100002>
- Piaincino M, Tortarolo A, Polimeni A, Bramanti E, Bramanti P. Altered mastication adversely impacts morpho-functional features of the hippocampus: A systematic review on animal studies in three different experimental conditions involving the masticatory function. *PLoS one*. 2020; 15(8): e0237872. DOI: 10.1371/journal.pone.0237872.
- Qing H, Desrouleaux R, Israni-Winger K, Migneur Y, Fogelman N, Zhang C et al. Origin and Function of Stress-Induced IL-6 in Murine Models. *Cell*. 2020; 182(2): 372-387.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.054.
- Estevao C. The role of yoga in inflammatory markers. *rain Behav Immun Health*. 2022;20:100421. DOI:10.1016/j.bbih.2022.100421.
- Misiak B, Stańczykiewicz B, Kotowicz K, Rybakowski J, Samochowiec J, Frydecka D. Cytokines and C-reactive protein alterations with respect to cognitive impairment in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review. *Schizophr Res*. 2018; 192:16-29. DOI: 10.1016/j.schres.2017.04.015
- Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young H, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv. Sci. (Weinh.)*. 2021; 8(15): e2004433. DOI:10.1002/advs.202004433
- Tang L, Cai N, Zhou Y, Liu Y, Hu J, Li Y et al. Acute stress induces an inflammation dominated by innate immunity represented by neutrophils in mice. *Front Immunol*. 2022; 13: 1014296. DOI:10.3389/fimmu.2022.1014296.
- Villar-Fincheira P, Sanhueza-Olivares F, Norambuena-Soto I, Cancino-Arenas N, Hernandez-Vargas F, Troncoso R et al. Role of Interleukin-6 in Vascular Health and Disease. *Front Mol Biosci*. 2021; 8: 641734. DOI:10.3389/fmolb.2021.641734.
- Kummer K, Zeidler M, Kalpachidou T, Kress M. Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function. *Cytokine*. 2021; 144: 155582. DOI:10.1016/j.cyt.2021.155582.
- Donegan J, Girotti M, Weinberg M, Morilak D. A novel role for brain interleukin-6: facilitation of cognitive flexibility in rat orbitofrontal cortex. *J Neurosci*. 2014; 34(3): 953-962. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3968-13.2014.
- Lyra E Silva N, Gonçalves R, Pascoal T, Lima-Filho R, Resende E, Vieira E et al. Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*. 2021; 11(1): 251. DOI:10.1038/s41398-021-01349-z.
- Braida D, Sacerdote P, Panerai AE, Bianchi M, Aloisi AM, Iosué S, Sala M. Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice. *Behav Brain Res*. 2004; 153(2):423-429. DOI:10.1016/j.bbr.2003.12.018
- Wei H, Chadman K, McCloskey D, Sheikh A, Malik M, Brown W et al. Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors *Biochim Biophys Acta*. 2012; 831-842. DOI:10.1016/j.bbadis.2012.01.011.
- Yaman-Sözbiçir İ, Ayaz-Alkaya S, Bayrak-Kahraman B. Effect of chewing gum on stress, anxiety, depression, self-focused attention, and academic success: A randomized controlled study. *Stress Health*. 2019; 35(4): 441-446. DOI:10.1002/smi.2872.
- Miyake S, Yoshikawa G, Yamada K, Sasaguri K, Yamamoto T, Onozuka M, et al. Chewing ameliorates stress-induced suppression of spatial memory by increasing glucocorticoid receptor expression in the hippocampus. *Brain Res*. 2012; 1446: 34-9. DOI:10.1016/j.brainres.2012.01.011.
- Lam-Figueroa N, Alzamora-Gonzales L, Colón-Vallejos E, Arone-Farfán R, Ruiz-Ramírez E, Crispin-Huamani L, Portilla-Flores O, Alarcón-Velásquez L, Aguirre-Siancas E. Influencia del tipo de masticación sobre el estrés crónico en los niveles leucocitarios. *Rev Chil Neuro-Psiquiat*. 2020; 58: 221-229. DOI: 10.4067/S0717-92272020000300221.
- Kubo K, Kotachi M, Suzuki A, Iinuma M, Azuma K. Chewing during prenatal stress prevents prenatal stress-induced suppression of neurogenesis, anxiety-like behavior and learning deficits in mouse offspring. *Int J Med Sci*. 2018; 15(9): 849-858. DOI:10.7150/ijms.25281.
- Aguirre-Siancas E. Influence of chewing behaviour on memory and spatial learning in albino BALB/c mice. *Neurologia*. 2017;32(4): 236-240. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.11.008>
- Oyuela R, Lareo L, Muñoz L, Morales L, Echeverry S, Uribe A, et al. Efecto en el aprendizaje y la memoria espacial de un péptido sintético en ratas: estudio preliminar. *Psicol. Caribe [Internet]*. 2004; 13: 1-14. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=21301302>
- Aguirre-Siancas E, Alzamora-Gonzales L, Colón-Vallejos E, Arone-Farfán R, Ruiz-Ramírez E, Portilla-Flores O, et al. Efecto del estrés crónico y de la masticación sobre los niveles séricos de interleuquina-6 e interferón-gama. *Rev Chil Neuro-Psiquiat*. 2022; 60(4): 394-402. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272022000400394>
- Yao D, Mu Y, Lu Y, Li L, Shao S, Zhou J et al. Hippocampal AMPA receptors mediate the impairment of spatial learning and memory in prenatally stressed offspring rats. *J Psychiatr Res*. 2022; 151: 17-24. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2022.03.032.
- Akazawa Y, Kitamura T, Fujihara Y, Yoshimura Y, Mitome M, Hasegawa T. Forced mastication increases survival of adult neural stem cells in the hippocampal dentate gyrus. *Int J Mol Med*. 2013;31(2):307-314. doi:10.3892/ijmm.2012.1217
- Del Giudice M, Buck C, Chaby L, Gormally B, Taff C, Thawley C et al. What Is Stress? A Systems Perspective. *Integr Comp Biol*. 2018; 58(6): 1019-1032. DOI:10.1093/icb/icy114.
- Hinds JA, Sanchez ER. The Role of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis in Test-Induced Anxiety: Assessments, Physiological Responses, and Molecular Details. *Stresses*. 2022; 2(1):146-155. DOI:10.3390/stresses2010011.
- Ye S, Yang R, Xiong Q, Yang Y, Zhou L, Gong Y et al. Acute stress enhances learning and memory by activating acid-sensing ion channels in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 498(4): 1078-1084. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.122.
- Foster V, Rash L, King G, Rank M. Acid-Sensing Ion Channels: Expression and Function in Resident and Infiltrating Immune Cells in the Central Nervous System. *Front Cell Neurosci*. 2021; 15: 738043.

- DOI:10.3389/fncel.2021.738043.
29. Wang S, Wang C, Yu Z, Wu C, Peng D, Liu X et al. Agarwood Essential Oil Ameliorates Restrain Stress-Induced Anxiety and Depression by Inhibiting HPA Axis Hyperactivity. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(11): 3468. DOI: 10.3390/ijms19113468.
30. Chiba K, Tsuchiya M, Koide M, et al. Involvement of IL-1 in the Maintenance of Masseter Muscle Activity and Glucose Homeostasis. *PLoS One.* 2015; 10(11):e0143635. DOI:10.1371/journal.pone.0143635.
31. Louca Jounger S, Christidis N, Svensson P, List T, Erberg M. Increased levels of intramuscular cytokines in patients with jaw muscle pain. *J Headache Pain.* 2017; 18(1): 30. DOI: 10.1186/s10194-017-0737-y.
32. Buvinic S, Vásquez W, Beato C, Cid F, Quezada E, Blanco N et al. Interleukin 6 in Masticatory Muscles: Dual Role Related to Muscle Activity and Muscle-Bone Loss After Unloading. *FASEB J.* 2021; 35. DOI:10.1096/fasebj.2021.35.S1.03469.
33. Beato C, Vicencio N, Casas M, and Buvinic S. Mouse masseter muscle activity induces IL1 β and IL6 expression mediated by extracellular ATP signaling. *FASEB J.* 2018; 32:S1. DOI:10.1096/fasebj.2018.32.1_supplement.857.5.