

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**REGULACIÓN DE NF κ B POR ESPECIES REACTIVAS
DE OXÍGENO Y CALCIO EN NEURONAS
HIPOCAMPALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO
ÁLVARO GONZALO ÁLVAREZ MARTÍNEZ**

DIRECTORES DE TESIS

DRA. MARIA ANGÉLICA

CARRASCO FRIZ

DR. JORGE HIDALGO TAPIA

Programa de Fisiología y Biofísica

Instituto de Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

PROFESORA

PATROCINANTE

DRA. JENNY FIEDLER TEMER

Departamento de Bioquímica y

Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas

Universidad de Chile

2008

a mis queridos sobrinos Laura y Gabriel

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de esta tesis no pudo haberse realizado si no es por el aporte de muchas personas. Mil gracias....

A Denise y Nancy, por el trabajo compartido, la ayuda en la realización de experimentos por las conversaciones mientras realizábamos interminables mediciones.

A la Doctora María Angélica Carrasco y al Doctor Jorge Hidalgo, por el apoyo incuantificable, por los consejos, las discusiones de resultados, el constante aporte al trabajo y los permisos para actividades anexas.

A Paola H, Mónica, Tati, Andrea, Mario, Carla, Luis, Paola F, Paola Ll y a toda la gente de los laboratorios del pasillo por la ayuda experimental, las conversaciones casuales y los comentarios oportunos.

A la Doctora Jenny Fiedler, por su gran aporte en mi formación como estudiante, ayudante e investigador, por los consejos y motivaciones.

A los profesores que me permitieron ser sus ayudantes en distintos ramos, actividad fundamental en mi desarrollo a lo largo de estos años

A Ítalo y Gonzalo, por la amistad forjada entre laboratorios, el apoyo constante (?) y las conversaciones fundamentales (?).

A todos mis amigos, Mange, Nacho, Chepo y excompañeros de carrera por lo aprendido y enseñado.

A mi amada Carolina, por su inconmensurable participación en la redacción de esta tesis, por estar permanentemente conmigo, por su apoyo y cariño incondicional y por sus palabras, siempre importantes.

A mis hermanas, Ángela y Débora, a mi mamá y a mi papá, a toda mi familia, por su presencia eterna, por su amor, por tenerme y sostenerme durante toda mi vida y porque sin ellos jamás habría llegado a este lugar.

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT 1060177

FONDAP Centro de Estudios Moleculares de la Célula 15010006.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Especies reactivas de oxígeno	1
1.2 ROS y Calcio neuronal.....	5
1.3 El factor transcripcional NFκB.....	9
1.4 NFκB, ROS y Calcio.....	11
2. HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1 Materiales	15
4.2 Métodos	16
5. RESULTADOS	22
5.1 Medición de Especies Reactivas de Oxígeno y de Calcio	22
5.2 Producción de ROS y aumento de calcio intracelular atenuada por inhibición del aumento de calcio citoplasmático.....	26
5.3 Traslocación de eGFP-p65 en células neuronales, ante estímulos eléctricos en presencia o ausencia de inhibidores de la generación de ROS y de la liberación de Ca²⁺.....	36
6. DISCUSIÓN.....	45
7. CONCLUSIONES	51
ANEXO RESULTADOS.....	51
Medición de la razón GSH/GSSG.....	52
BIBLIOGRAFÍA	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies reactivas de oxígeno.....	2
Figura 2. La actividad celular es modificada por los ROS a distintos niveles.....	4
Figura 3. Múltiples puntos de comunicación entre ROS y la señalización por calcio en distintos tipos celulares.....	8
Figura 4. Activación de la vía canónica de NFκB.....	10
Figura 5. Esquema de plasmidio HyperCyto.....	20
Figura 6. Respuesta del plasmidio HyperCyto a H ₂ O ₂ exógeno.....	24
Figura 7. Medición de especies reactivas de oxígeno y calcio en neuronas estimuladas eléctricamente.....	25
Figura 8. Medición del aumento de calcio intracelular en neuronas estimuladas eléctricamente, en medio de reposo sin calcio.....	28
Figura 9. Medición del aumento de calcio intracelular en neuronas estimuladas eléctricamente, en presencia de BAPTA-AM.....	29
Figura 10. Medición del aumento de calcio intracelular en neuronas estimuladas eléctricamente, en presencia de ryanodina.....	30
Figura 11. Medición de producción de ROS en medio de reposo sin calcio en neuronas estimuladas eléctricamente.....	31
Figura 12. Medición de producción de ROS en presencia de BAPTA-AM en neuronas estimuladas eléctricamente.....	32
Figura 13. Medición de producción de ROS en presencia de ryanodina en neuronas estimuladas eléctricamente.....	33
Figura 14. Medición de producción de ROS en presencia de DPI, en neuronas estimuladas eléctricamente.....	34
Figura 15. Medición del aumento de calcio intracelular en neuronas estimuladas eléctricamente, en presencia de DPI.....	35
Figura 16. Traslocación de eGFP-p65 en neuronas hipocampales estimuladas con 50 Hz 4000p y 50 Hz 1000p.....	37
Figura 17. Análisis de la traslocación de eGFP-p65 al núcleo.....	38
Figura 18. Traslocación de eGFP-p65 en neuronas hipocampales estimuladas con 50 Hz y 1000p en presencia o ausencia de H ₂ O ₂	42
Figura 19. Traslocación de eGFP-p65 en neuronas hipocampales estimuladas con 50 Hz y 1000p en presencia o ausencia de NAC.....	43
Figura 20. Traslocación de eGFP-p65 en neuronas hipocampales estimuladas con 10 Hz y 1000p en presencia o ausencia de NAC.....	44
Figura 21. Mecanismo propuesto en la regulación de NFκB por ROS y calcio.....	50
Figura 22. Participación del par GSH: GSSG en el control de los ROS.....	54
Figura 23. Medición de la razón GSH:GSSG.....	55

ABREVIATURAS

2-VP:	2-vinilpiridina
ACSF:	Fluido cerebrospinal artificial
BAPTA-AM:	1,2-bis (2-aminofenoxi)etano-N,N, N', N'-ácido tetraacético
CICR:	liberación de calcio inducida por calcio
DHCF-DA:	Dihidroclofluorosceína diacetato
DIV:	Dias in vitro
DMT1:	Transportador de metales divalentes 1
DMSO:	Dimetilsulfoxido
DPI:	Difeniliodonio
EE:	Estímulo Eléctrico
EGF:	Factor de crecimiento epitelial
eGFP:	Proteína Fluorescente Verde aumentada
eNOS:	Oxido Nítrico Sintasa endotelial
GSH:	Glutación o glutatión reducido
GSSG:	Glutación oxidado o disulfuro de glutatión
HBSS:	Solución salina balanceada Hanks
iNOS:	Oxido Nítrico Sintasa inducible
IκB:	Inhibidor del factor nuclear derivado de Linfocito B
IKK:	Quinasa del inhibidor del factor nuclear derivado de Linfocito B
LTP:	Potenciación a largo plazo
LTD:	Depresión a largo plazo
NAC:	N-acetil cisteína
NFκB:	Factor nuclear derivado de Linfocito B
NEMO:	Modulador esencial de NF κ B
NGF:	Factor de crecimiento neurotrófico
NIK:	Quinasa inductora de NF κ B
NMDA:	N-metil-D-aspartato
PDTC:	Pirroditiocarbamato
PFA:	Paraformaldehído
PI3K:	Quinasa de 3 fosfatidil-inositol
PKC:	Proteína Quinasa C
PKB:	Proteína Quinasa B
PKD:	Proteína Quinasa D
PKMζ:	Proteína Quinasa M tipo ζ
RYA:	Ryanodina
ROS:	Especies Reactivas de Oxígeno
TEA:	Trietanolamina

RESUMEN

La actividad de las neuronas produce un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y también en la concentración de calcio intracelular, así como una mayor actividad en el factor transcripcional Factor Nuclear derivado de Linfocito B (NFκB). Se ha demostrado que los ROS, moléculas habitualmente asociadas a daño celular, ejercen un rol importante en la transducción de señales a concentraciones bajas, mientras que un desbalance en el equilibrio de los mecanismos prooxidativos y antioxidantes es el responsable de sus efectos tóxicos. La participación del calcio en la actividad neuronal ha sido ampliamente documentada, siendo clave en los mecanismos involucrados en plasticidad sináptica.

La relación entre calcio y ROS ha sido estudiada en varios modelos celulares. Numerosos resultados experimentales sugieren que la generación de ROS está regulada por los niveles de calcio, ya sea de forma positiva o negativa. Similarmente, los niveles de calcio intracelular dependen de las condiciones oxido reductoras de las proteínas participantes en esa regulación. Por otro lado, el funcionamiento de muchas moléculas depende de su regulación por calcio y por ROS.

El factor transcripcional NFκB, compuesto de varias subunidades como p65 y p50, cumple amplias funciones en distintos tipos celulares, especial relevancia cobra en células del sistema inmune, principalmente en el fenómeno de la respuesta inflamatoria y antimicrobiana. En neuronas, se ha observado una mayor actividad de p65, la cual participa en los mecanismos de plasticidad sináptica relacionados con aprendizaje y memoria.

El objetivo principal de esta memoria fue investigar la relación cruzada entre especies reactivas de oxígeno y el calcio intracelular en la activación de NFκB en neuronas hipocampales activadas por despolarización con estímulo eléctrico de campo. Para demostrarlo se determinó la generación de ROS con el plasmidio HyperCyto, el cual fluoresce ante la presencia de H₂O₂. Para asociar dichos cambios con variaciones en los niveles de calcio se usó la sonda fluorescente FuraRed AM. A su vez se analizaron cambios en la distribución celular (citosol - núcleo) de la proteína de fusión eGFP-p65.

En este trabajo se mostró que la estimulación eléctrica de campo, a frecuencias de 10 y 50 Hz, produce generación de ROS asociado a un aumento en la concentración de calcio intracelular, fenómenos asociados a la traslocación al núcleo de la subunidad p65 de NFκB. También se observó que el aumento de ROS no fue afectado en forma sustancial cuando las células fueron estimuladas en medio de reposo sin calcio o en presencia del quelante intracelular de calcio BAPTA sugiriendo que el calcio proveniente del medio extracelular no tiene un rol relevante en la generación de ROS mediada por el estímulo eléctrico. En contraste, se observó una disminución total en la generación de ROS en presencia de ryanodina, en concentraciones inhibitorias del canal de calcio receptor de ryanodina. El aumento de calcio intracelular no fue afectado en células estimuladas eléctricamente previamente incubadas con DPI, un inhibidor general de flavoproteínas como las NADPH oxidasa, una enzima generadora de ROS.

Además se demostró que la traslocación de p65, provocada por la estimulación eléctrica de campo, era atenuada totalmente en células que habían sido incubadas antes, durante y después del estímulo con ryanodina, en concentraciones inhibitorias de la activación del canal de calcio receptor de ryanodina, y con N-acetil-cisteína, una molécula con alta actividad antioxidante. También se observó que estos fenómenos tienden a repetirse al estimular a las neuronas con un menor número de pulsos o a una menor frecuencia.

Estos resultados, sumados a nuevos experimentos con DPI, muestran que la regulación entre calcio y especies reactivas de oxígeno también se da en este modelo experimental. Debemos agregar que esta conversación cruzada está involucrada en la migración al núcleo de NFκB, particularmente tras el estímulo despolarizante de las neuronas. Los experimentos aquí mostrados permiten postular que la principal fuente de calcio participante parece ser el retículo a través de su canal de calcio receptor de ryanodina, además la metodología empleada, mediante el uso de una sonda específica, permiten individualizar la presencia de H₂O₂ en los procesos descritos en este trabajo.

SUMMARY

NFκB regulation by reactive oxygen species and calcium in activated hippocampal neurons.

Physiological activity in neurons shows an increase in reactive oxygen species (ROS) generation, intracellular calcium concentration and the transcriptional factor NFκB among other parameters. It has been demonstrated that ROS, which is usually associated to cellular damage, has an important role at low concentration in signal transduction cascades, while an equilibrium imbalance between the prooxidants and antioxidants mechanism is the responsible for their toxicity at higher concentration. The calcium participation in neuronal activity is well documented; calcium has key functions in the mechanisms involved in synaptic plasticity.

The correlation between calcium and ROS has been deeply studied in several models, they point to ROS generation as being up or down-regulated by the intracellular calcium level. On the other hand, the intracellular calcium level depends on calcium regulating oxidative state of proteins. Besides, the function of various molecules requires the presence of calcium and ROS.

NFκB has been assigned several functions in different cellular types, such as its role in the immune system, mainly in the inflammatory and antimicrobial response. In neurons, it has been described its role in synaptic plasticity, learning and memory.

The main goal of this work was to investigate the crosstalk between ROS and calcium over NFκB activation in cultured neurons by electrical field stimulation. ROS generation was monitored by the HyperCyto plasmid, which recognizes H₂O₂, the calcium level was observed with FuraRed loaded as the AM species and for NFκB cell location, eGFP-p65 was used.

This work shows that by field electrical stimulation in neurons, there is an increase in both, ROS production and intracellular calcium concentration as well as a p65 translocation to the nucleus from the cytoplasm. It was also observed that ROS increase was not affected by the presence of BAPTA loaded as the AM species or by the absence

of extracellular calcium. ROS production was lowered by preincubation with ryanodine at inhibitory concentrations of calcium release. While the calcium concentration increase, was not affected by DPI incubation, which is a ROS generating enzyme inhibitor.

Also it was shown that p65 translocation due to field electric stimulation, was prevented by ryanodine incubation, and by N-acetylcysteine (NAC) preincubation, NAC is an antioxidant molecule. These phenomena were also seen in stimulated neurons at lower pulses amplitudes or frequency.

Together, these results show that there is crosstalk between calcium and ROS in our experimental model. This crosstalk is also involved in NF κ B activation, specifically with depolarizing stimuli on neurons. They also lead to postulate the function of the reticulum through its ryanodine receptor calcium channel as the main calcium source for this process, as well as pointing out that H₂O₂ is a relevant ROS involved in the mechanism studied in this work.

1. INTRODUCCIÓN

La activación fisiológica de las neuronas induce un aumento en la concentración de calcio citoplasmático [1] y generación de especies reactivas de oxígeno [2]. Estas señales celulares ejercen roles en distintos procesos y también se observa interacción entre ellas. Esta conversación cruzada resulta en regulación de los niveles de calcio y ROS [3]. NFκB es un factor transcripcional ubicuo al que se le ha asignado participación en distintas funciones neuronales como la plasticidad sináptica [4]. La activación de NFκB se ha relacionado, en otros tipos celulares, con el nivel de calcio intracelular [5] y la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) [6], lo que permite proponer que la actividad en neuronas de NFκB puede funcionar como un sensor de los niveles de calcio y ROS.

1.1 Especies reactivas de oxígeno

Los ROS son definidos como moléculas que se originan de la ruptura, excitación o reducción parcial del oxígeno molecular (O_2) y que son químicamente mucho más reactivas que su molécula de origen por la presencia en su último orbital de un electrón no apareado, denominado también radical libre. Esta hiperreactividad les permite interactuar rápidamente con cualquier molécula con electrones disponibles. En el marco del ambiente celular los ROS potencialmente pueden reaccionar con la gran mayoría de los elementos existentes en el interior de la célula, con la consiguiente alteración estructural y subsiguiente modificación funcional [7].

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($OH\cdot$) y óxido nítrico ($NO\cdot$) son ejemplos de especies reactivas producidas en condiciones fisiológicas, y que además pueden ser sustrato para la generación de otras especies. Así, tenemos por ejemplo a O_2^- , el que es producido principalmente por actividad de la enzima NADPH oxidasa (NOX) y la mitocondria [7]. Este anión puede ser convertido a H_2O_2 , a través de catálisis mediada por alguna de las isoformas de las superóxido dismutasas existentes en la célula [8]. De igual forma, desde el peróxido se producen otras moléculas con poder oxidante de alta relevancia en la transducción de señales (Figura 1).

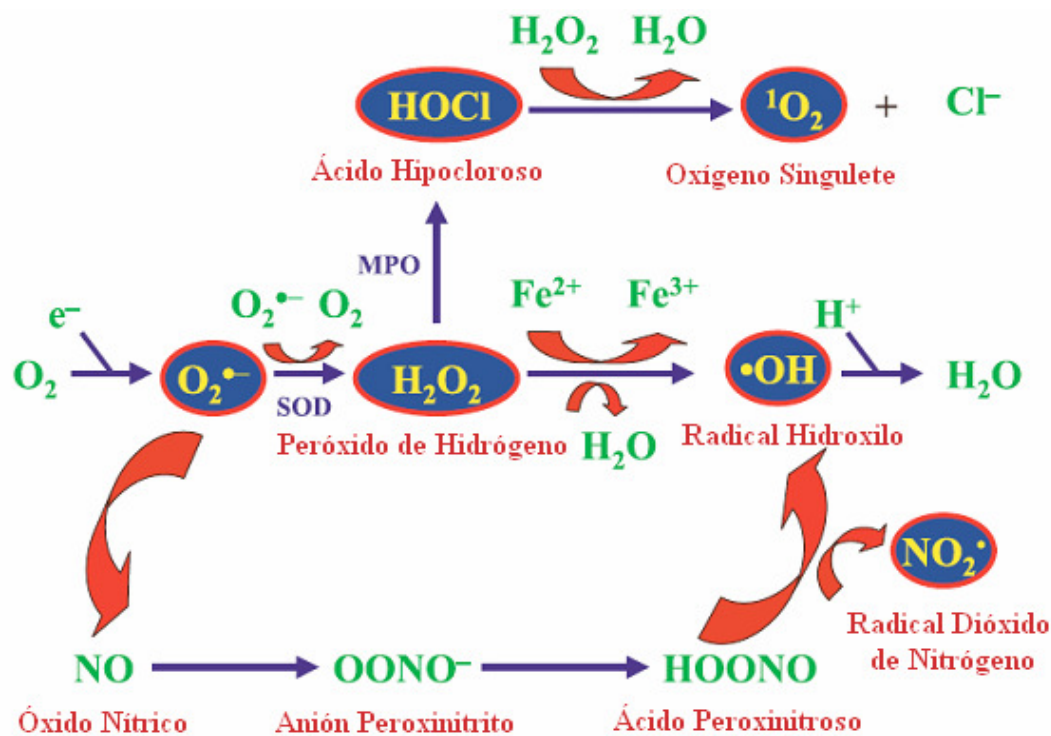


Figura 1. Especies reactivas de oxígeno

A partir de oxígeno molecular y tanto por reacciones enzimáticas como no enzimáticas se origina una cadena de producción de ROS como superóxido y peróxido de hidrógeno y las especies reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico (RNS). Tanto los ROS como RNS a bajas concentraciones ejercen roles fisiológicos, pero a altas concentraciones son tóxicos para la célula. Modificado de Haddad, 2004

Desde el comienzo de los estudios de las ROS, diversos y numerosos antecedentes los han involucrado con una amplia gama de complicaciones patológicas como procesos degenerativos, cáncer e incluso con el proceso de envejecimiento. Estas alteraciones se producen por los efectos perjudiciales de las ROS sobre el ADN, causando alteraciones en su síntesis y replicación. Además los ROS reaccionan con proteínas que alteran su función probablemente por modificación de aminoácidos claves en la estructura de la proteína [7].

Estudios recientes han mostrado que solo concentraciones elevadas de ROS mantenidas por un tiempo largo causarían este tipo de daño en cambio a concentraciones menores cumplen roles fisiológicos en un amplio abanico de tipos celulares (Figura 2). Dentro de los más conocidos destaca el papel del NO en la manutención del tono vascular, donde es un elemento clave para la vasodilatación [9]. También los ROS inhiben la agregación plaquetaria, eventos donde también se ha descrito la participación de superóxido y peroxido de hidrogeno [10]. Además, los ROS participan en los sistemas quimiosensores de oxígeno, en la regulación en la síntesis de eritropoyetina tanto a nivel renal como hepático, efecto mediado por HIF-1. También los ROS participan en los procesos de adhesión celular y los roles más conocidos a nivel del sistema inmune, tanto en regulación de su actividad, como en una acción directamente efectora [7]. Otros ejemplos son los descritos para el Factor de Crecimiento Endotelial (EGF) en células de carcinoma de epitelio humano [11], para el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) en neuronas [12], y en aquellas rutas donde se requiera fosforilación de tirosinas, proceso que parece necesitar la presencia de ROS [13]

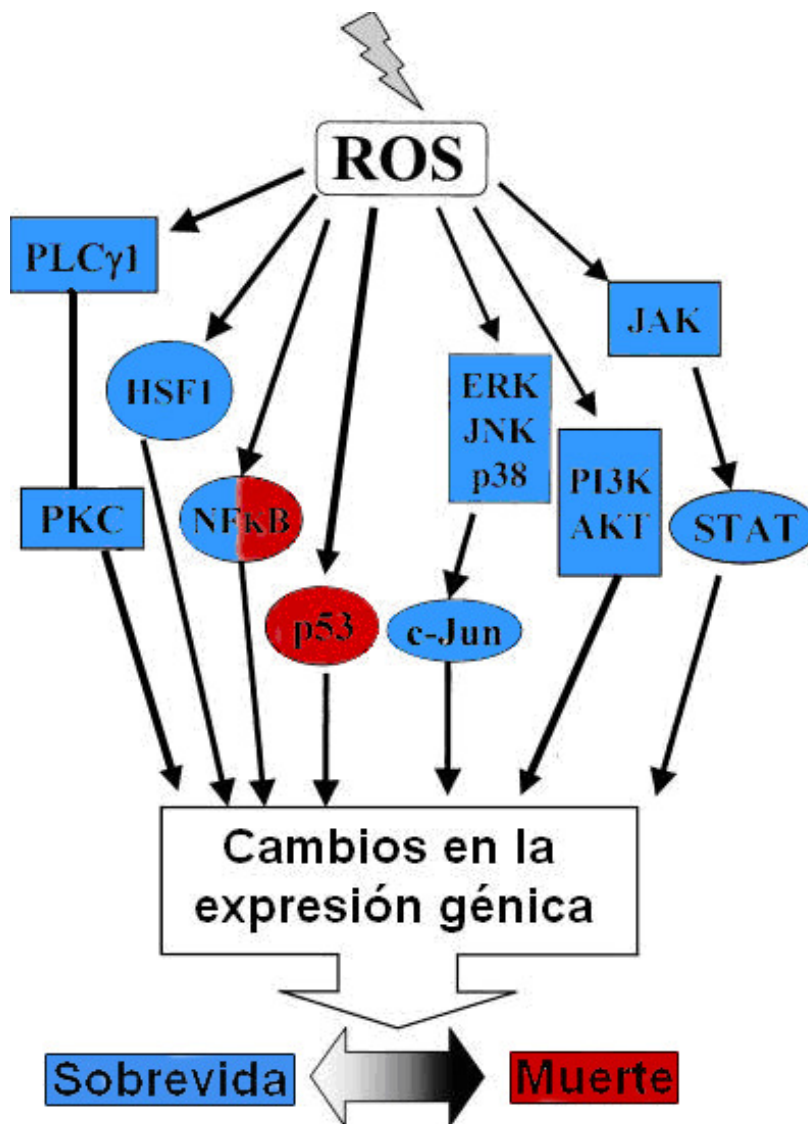


Figura 2. La actividad celular es modificada por los ROS a distintos niveles.

Los ROS son capaces de variar la actividad celular por modificaciones oxidativas de moléculas como factores transcripcionales (en óvalos) o enzimas (cuadrados), lo que redundará en cambios en la expresión génica que orientará el funcionamiento de la célula, apuntando a sobrevida y transducción de señales o hacia muerte celular dependiendo de la magnitud y duración de la señal producida por ROS. ERK: Quinasa regulada por señal extracelular. PI3K: Quinasa de 3-fosfoinositol. AKT o PKB: Proteína Quinasa B. STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción. HSF1: Factor de transcripción de estrés térmico 1. JAK: Quinasa de Janus. PLCγ1: Fosfolipasa Cγ. PKC: Proteína quinasa C. JNK: Quinasa N-terminal de c-Jun. Modificado de Martindale, 2002

1.2 ROS y Calcio neuronal

El calcio y los ROS juegan papeles relevantes en el funcionamiento neuronal. Acerca del rol del calcio, hay numerosos antecedentes que hablan de su papel en diversos procesos neuronales. Destacan las diferentes influencias que tiene el calcio intracelular el que puede ingresar a través de los canales acoplados al receptor de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) o por los canales de calcio sensibles a variación de potencial o por la liberación de calcio proveniente desde depósitos internos, como la mitocondria o el retículo endoplasmático. En neuronas, el calcio es clave en los procesos de actividad sináptica, como la transmisión y la excitabilidad neuronal, en modulación de la expresión génica y en la plasticidad neuronal [1], [14]. Es importante señalar que la actividad de los factores transcripcionales no depende exclusivamente de la presencia o ausencia de calcio sino que responderían de distinta manera de acuerdo a los niveles, duración temporal y a la amplitud de la señal de calcio en el microambiente de la proteína [15, 16].

A pesar de la controversia generada por las funciones de los ROS, se le reconoce un rol facilitador de mecanismos de actividad neuronal, como la plasticidad sináptica en general y en particular el aprendizaje y la memoria. En estos procesos la presencia de ROS es requerida, por ejemplo para la formación de LTP (potenciación de largo plazo) [17], [18]. En particular, la formación de especies reactivas de oxígeno en neuronas tiene dos vertientes principales. La primera vía se trata de la NADPH oxidasa, enzima generadora de superóxido desde el oxígeno molecular, ubicada en la membrana plasmática celular. Dada su ubicación se ha vinculado su actividad con cambios de permeabilidad en la membrana, como por ejemplo la asociada a la actividad del receptor de NMDA [19]. La segunda vía es mitocondrial, fundamentalmente asociada a la actividad de la cadena transportadora de electrones, ruta central en el funcionamiento mitocondrial y en la generación de ATP.

Dentro de la dependencia de calcio por ROS, se ha visto que la oxidación de proteínas de membrana mitocondrial está conectada con el aumento de la salida de calcio desde la mitocondria, hecho demostrado en hibridomas de células T y en células del timo [20]. En neuronas se ha visto que modificaciones de tipo oxidativa en canales de calcio como el receptor de ryanodina [21] y el receptor de IP3 [22], aumentan la permeabilidad a

este catión. De igual forma, la actividad de los receptores NMDA disminuye con el grado de oxidación y en congruencia aumenta en un ambiente eminentemente reductor [23]. También el transporte de calcio es regulado por ROS, como por ejemplo inactivando a los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [24], inhibiendo la actividad Ca^{2+} -ATPasas en el retículo y la de reguladores del calcio intracelular como calmodulina [25].

Por otro lado, los niveles de Ca^{2+} también regulan los niveles de ROS, trabajos han demostrado que la acción catalítica de enzimas productoras de ROS como la nNOS y la eNOS son reguladas por la concentración de calcio intracelular [26], situación que puede ser extendida a la NOX [27] y a otras enzimas como la mieloperoxidasa [28].

La relación estrecha entre calcio y ROS queda de manifiesto en la mitocondria. Se ha determinado que la entrada de calcio a la mitocondria es un paso necesario para la producción interna de ROS [29], también se ha demostrado que la apoptosis mediada por ROS mitocondrial se ve significativamente atenuada por la presencia de quelantes de calcio o bloqueadores de canales de calcio de la membrana plasmática [30]. En neuronas la entrada de calcio a la mitocondria aumenta la generación de superóxido, lo que sería un paso clave y necesario para el funcionamiento de quinasas y, también, de factores transcripcionales en neuronas hipocámpales [2].

Otro punto de conexión existente es el aumento en la actividad antioxidante de la célula producido tras un incremento en la concentración de calcio intracelular. Se ha visto que el nivel y el correcto funcionamiento de algunos de los sistemas antioxidantes tienen dependencia no solo de la presencia sino que también de la cantidad de Ca^{2+} [31]. Se ha reportado que tratamientos con ionóforos de calcio en neuronas corticales de rata correlacionan con un aumento de la expresión de superóxido dismutasa, una enzima clave en la defensa contra el estrés oxidativo de la célula [32]. Además se ha visto que en líneas celulares de feocromocitoma (PC12, línea neuronal) el aumento de ROS intracelulares producido por la adición de H_2O_2 se ve atenuado tras la aplicación en conjunto a estímulos que aumenten la concentración de calcio intracelular, en este caso: despolarización con K^+ o incubación con histamina en presencia de H_2O_2 [33].

Estos últimos datos nos sugieren una potencial función dual del ion calcio, promoviendo por una parte la generación de ROS y por otra la síntesis de moléculas con actividad

antioxidante. Dado el alto potencial tóxico de los ROS se origina la necesidad de ajustar la respuesta y regular la actividad y cantidad de los mecanismos antioxidantes, permitiendo que el papel fisiológico no pase a un papel patológico.

La efectividad y existencia de la conversación cruzada ente Ca^{2+} y ROS queda explicitada al mostrarse como el aumento de los ROS, por el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones por acción del calcio, conduce a la apertura de poros en la membrana interna de la mitocondria que conlleva al aumento en la entrada de calcio [34].

La relación calcio – ROS va más allá de la interregulación de sus niveles intracelulares. También apunta a la regulación combinada de moléculas como la fosfatasa calcineurina [35] y factores transcripcionales como NFκB. Parte de esta relación ROS – calcio se encuentra resumida en la Figura 3.

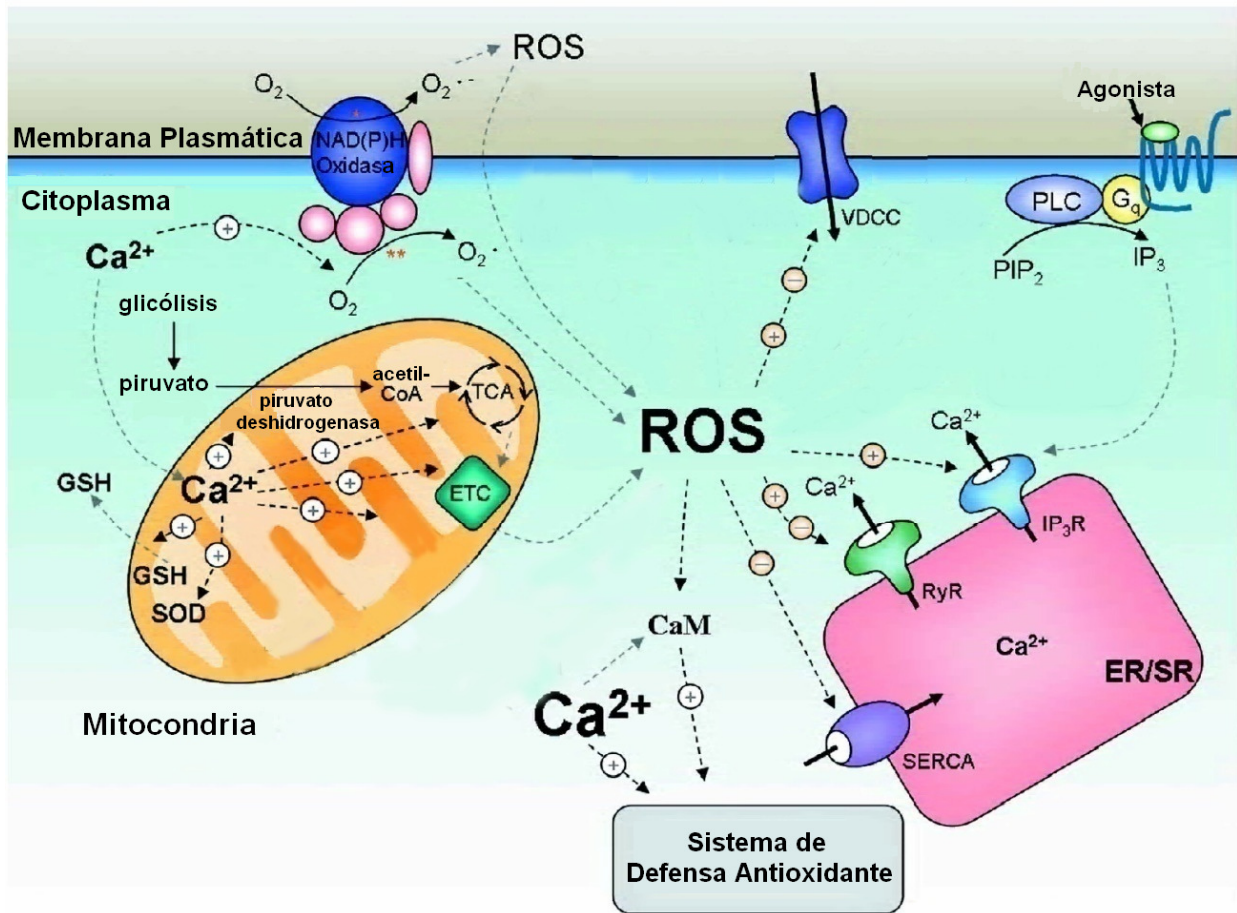


Figura 3. Múltiples puntos de comunicación entre ROS y la señalización por calcio en distintos tipos celulares.

Se muestran los distintos niveles de conversación cruzada presentes entre ROS y Ca^{2+} , puede observarse como ROS regula la entrada de calcio al citoplasma tanto positiva como negativamente, ya sea desde reservorios intracelulares como la mitocondria y el retículo endoplásmico. También se esquematiza la regulación de ROS por calcio, tanto a nivel de las enzimas productoras como de la activación del sistema antioxidante. Modificado de Yan Y, et al. 2006

1.3 El factor transcripcional NFκB

Estructuralmente NFκB está compuesto por dos proteínas provenientes de una familia con cinco componentes, pudiendo encontrarse estos pares como homodímeros o como heterodímeros, donde los más recurrentes son las proteínas p65, denominada RelA, y p50 [6]. En la denominada vía canónica de NFκB, el dímero se encuentra en el citoplasma en un estado basal inactivo debido a la unión con una tercera proteína, un inhibidor denominado IκB. Este inhibidor sufre fosforilación por quinasas particulares como IKK, la que se encuentra regulada negativamente por la proteína NEMO. La fosforilación de IκB sirve como señal para su degradación vía proteosomal. El dímero ahora libre, trasloca al núcleo y, en un ambiente reductor, se une al ADN para ejercer su actividad moduladora de la transcripción [36] (Figura 4).

NFκB es un factor de transcripción conocido por su participación en situaciones patológicas como en las reacciones inflamatorias, donde participa en la respuesta por citoquinas proinflamatorias como TNF-α [37]. También cumple un rol en la supervivencia celular, fundamentalmente en la apoptosis, por lo que ha sido muy estudiado en cáncer [38].

En forma más específica, se ha relacionado la actividad de NFκB con un aumento en la actividad de los canales de K⁺ dependientes de voltaje en las membranas plasmáticas de líneas celulares PC12. Un fenómeno similar es observado en neuronas hipocampales donde se correlaciona con un aumento en el número de canales de calcio tipo L [39]. En neuronas participa en procesos de plasticidad neuronal, específicamente en hipocampo se le ha asignado responsabilidad en el periodo tardío del LTP y en la inducción de la LTD (depresión de largo plazo) a la proteína p65 [40]. Se ha demostrado que la reducción en los niveles de NFκB correlaciona con déficit de memoria espacial mientras que su bloqueo impide la consolidación de la memoria específica, esto a nivel de amígdala [40].

No obstante estos antecedentes, el rol de NFκB en las células neuronales no ha sido definido con claridad. Postulándose roles potencialmente protectores, ya sea a través de la generación de resistencia al estrés oxidativo o por causar muerte apoptótica neuronal, aunque por esta última función se le ha asignado un rol neurodegenerativo [40], [41].

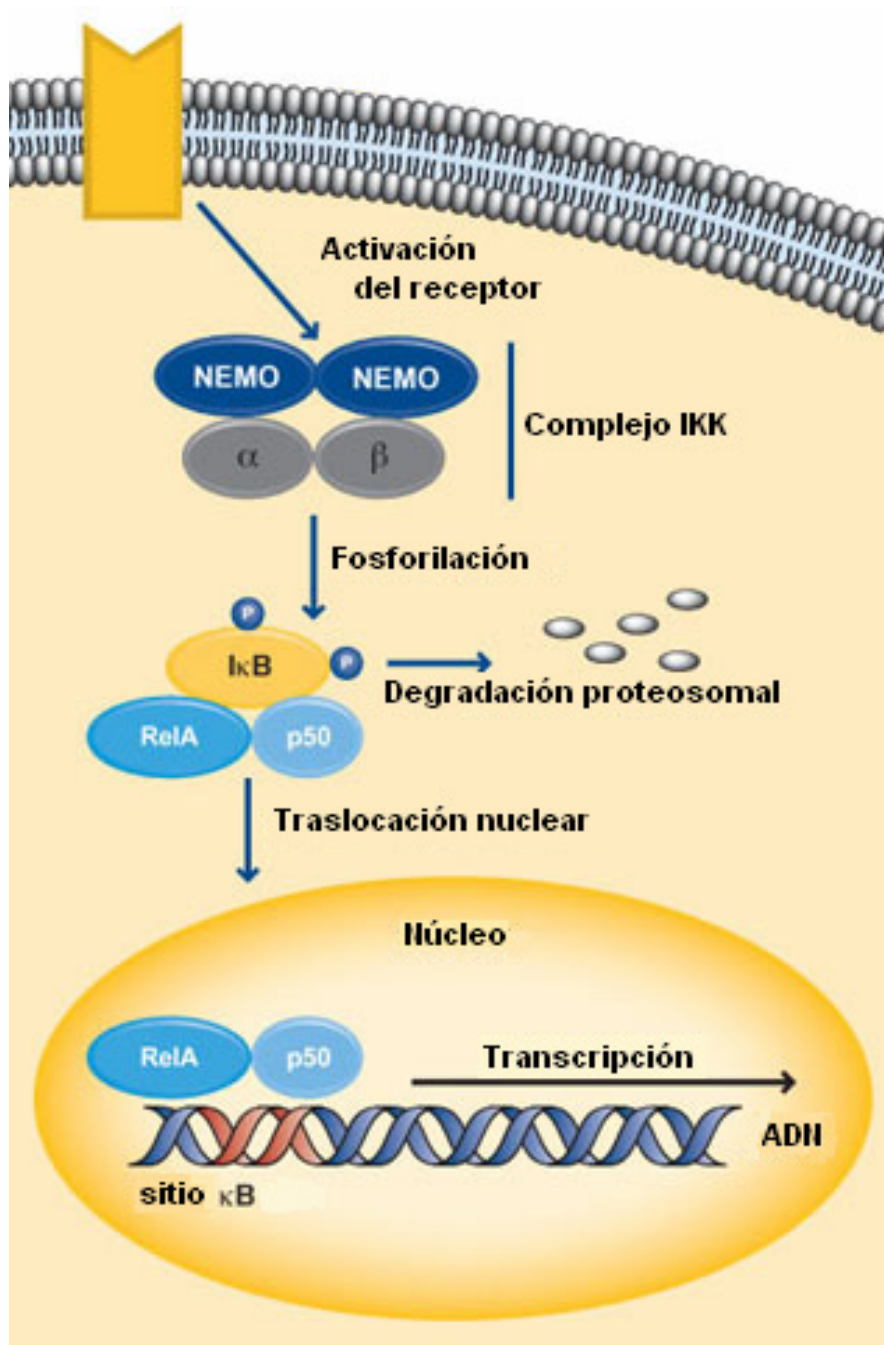


Figura 4. Activación de la vía canónica de NFκB.

Se muestra la regulación de la actividad de NFκB. Un estímulo externo induce la activación del complejo IKK, inhibido por NEMO. IKK fosforila en tirosinas a IκB, represor de NFκB, esta fosforilación es señal de degradación vía proteosoma para el represor, por lo que ahora las subunidades de NFκB como p65 y p50 son capaces de trasladarse al núcleo y modificar la actividad transcripcional de la célula.

1.4 NFκB, ROS y Calcio

Se ha descrito a NFκB como uno de los factores de transcripción regulados por los niveles de calcio citoplasmáticos y por ROS generado intracelularmente en distintos modelos celulares.

En neuronas granulares de cerebelo, la actividad óptima de la subunidad p65 requiere la presencia de calcio. Esto, tras determinar que un estímulo despolarizante a través de aumento de calcio intracelular activa a NFκB por medio de distintas vías como Ca^{2+} -Calmodulina, la proteína quinasa dependiente de calcio (PKC) y la vía p21/PI3K/PKB [5]. En forma general, se puede afirmar que la activación de NFκB depende del aumento de calcio intracelular mediado por el receptor de NMDA y el canal de calcio tipo L, o un aumento directo por la acción de ionóforos de calcio [42].

En cuanto a la relación existente entre NFκB y ROS, se ha reportado una directa relación entre la actividad transcripcional y la traslocación del complejo proteico con el estado oxidativo del medio que lo rodea. Así, un medio más oxidante es necesario para la actividad de NFκB en el citoplasma, mientras que para su funcionamiento en el núcleo es necesario un ambiente reductor [37].

En linfocitos T la actividad de NFκB estaría determinada por la regulación que ejerce H_2O_2 sobre la fosfatasa SHIP-1, la que se encargaría de inhibir a NEMO. De esta manera, IKK podría fosforilar a IκB, permitiendo la activación de NFκB [6]. Situación parecida es descrita en células epiteliales, donde el peróxido de hidrogeno nuevamente se encarga de activar una proteína, en este caso la PKD que fosforilaría a IκB, permitiendo el accionar de NFκB [43].

De todas maneras, la relación entre el factor transcripcional y los ROS ha sido materia de discusión, por la existencia de reportes que hablan en una dirección opuesta a la presentada. Se ha reportado que en epitelio pulmonar los ROS inhiben a NFκB [44]; También se postula que las especies reactivas no tienen relación con la activación de NFκB, justificándose en que la actividad inhibitoria sobre el funcionamiento de NFκB de N-acetil cisteína (NAC) y pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) no es debido a sus propiedades antioxidantes sino que a efectos en otros niveles de la vía de activación de

NFκB, aseverándose, además, un potencial efecto atenuante por parte de los ROS en células Jurkat [36].

La relación entre el factor de transcripción, ROS y calcio se ha estudiado en varios tipos celulares. En células β del páncreas la despolarización química y el concomitante aumento de los niveles de calcio intracelulares activa la degradación de IκB [45]. En el músculo esquelético se ha descrito que la despolarización del mismo tipo provoca un efecto similar, situación confirmada a través de la despolarización llevada a cabo con estimulación eléctrica de campo [46].

Resumiendo, en neuronas ROS y calcio juegan un rol clave en la transducción de señales y activación celular, no habiendo claridad en la regulación cruzada entre ambas moléculas. La subunidad p65 de NFκB es la de mayor relevancia en la actividad neuronal y se conoce que NFκB es regulado por ROS y calcio en numerosos modelos celulares.

2. HIPÓTESIS

De acuerdo a los antecedentes presentados, se propone la siguiente hipótesis:

“La traslocación de la subunidad p65 de NFκB es regulada por la conversación cruzada entre Ca^{2+} y ROS en células neuronales hipocampales estimuladas eléctricamente”

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de ROS y Ca^{2+} y de la conversación cruzada entre ellos, en la traslocación de p65 en células de cultivos neuronales despolarizadas por estimulación eléctrica de campo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Medir la producción de ROS en células despolarizadas por estimulación eléctrica de campo.
2. Analizar la liberación de Ca^{2+} en células despolarizadas por estimulación eléctrica de campo.
3. Analizar las señales de producción de ROS y de aumento de Ca^{2+} intracelular en células despolarizadas por estimulación eléctrica de campo, en presencia de inhibidores de la liberación de Ca^{2+} y de la producción de ROS.
 - a. En medio de reposo extracelular en ausencia de calcio.
 - b. En células incubadas con BAPTA-AM, quelante de calcio intracelular.
 - c. En células incubadas con ryanodina en concentraciones inhibitorias del canal de calcio receptor de ryanodina.
 - d. En presencia de DPI, inhibidor de flavoproteínas generadoras de ROS
4. Estudiar la traslocación de eGFP-p65 en células despolarizadas por estimulación eléctrica de campo en presencia o ausencia de un inhibidor general de la actividad de ROS y de un inhibidor de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos

Alexis:	Ryanodina
Calbiochem:	2-vinilpiridina (2-VP), 5,5'-Ditio-bis-2-acido nitrobenzoico (DTNB), Cloruro de Difenileneiodonio (DPI), Glutación Reductasa, NADPH tetrasódico.
DAKO North America:	Dako Medio de Montaje
Evrogen:	Plasmidio HyperCyto
Invitrogen:	B27, Glutamax, Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), Hoechst, Lipofectamine2000, Medio Neurobasal, Penicilina, Tripsina
JT Baker:	Sacarosa
Merck:	Dimetilsulfoxido (DMSO), Glucosa, H ₂ O ₂ , KCl, Na ₂ HCO ₃ , Na ₂ HPO ₄ , Paraformaldehido (PFA), Trietanolamina (TEA)
Molecular Probes:	BaptaAM, FuraRed AM, Fluo-4 AM
Sigma:	5-Fluoro-2'-deoxy-uridina, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Ácido etilenglicol -bis-(b-aminoetil éter)- N, N, N', N'-2-etanosulfónico (EGTA), Glutación, Poli-L-Lisina, Uridina
Winkler:	CaCl ₂ x 2H ₂ O, MgCl ₂ , NaCl, PBS 10x (NaCl 80g/L, KCl 2 g/L, Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O 7,2 g/L, KH ₂ PO ₄ 2,4 g/L, ajustado a pH 7.4 con HCl), diclorodihidrofluoroscéina diacetato (DCHF-DA)

4.1.2 Equipos

Osciloscopio LG, OS-5020

Estimulador construido en el laboratorio

Electrodo construido en el laboratorio

Microscopio Confocal Carl Zeiss Axiovert 200M–LSM Pascal 5

Espectrofotómetro Hewlett Packard

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo neuronal

Los cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata fueron preparados como se describe en [47], [48]. Brevemente, ratas Sprague-Dawley preñadas de 18 días fueron adormecidas con éter y sacrificadas por dislocación cervical para extraer los embriones los cuales fueron mantenidos en una solución salina balanceada Hanks pH 7,4 a 4°C (HBSS; NaCl 135 mM; KCl 5,4 mM ; NaH₂PO₄ 0,5 mM; Na₂HPO₄ 0,33 mM; y D-glucosa 5,5 mM). Los embriones fueron decapitados y se extrajeron los cerebros para proseguir con la disección de los hipocampos bajo lupa en la sala de precultivo en campana de flujo laminar. A cada cerebro se le retiraron las meninges y luego se disectaron los hipocampos, los cuales fueron mantenidos en HBSS a 4°C. Se realizaron dos lavados con HBSS por sedimentación del tejido en un tubo estéril. Después del segundo lavado, el tejido fue incubado en HBSS que contenía 0,25 % de tripsina en concentración final, por 8 min. a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Después de tres lavados con HBSS, el tejido fue mecánicamente dissociado en Medio de Adhesión (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; D-glucosa 19,4 mM; NaHCO₃ 26 mM; suplementado con 10% de suero de caballo; y 10 U/ml de penicilina; 10 µg/ml de estreptomycin). Se realizó disgregación mecánica con 10 pasadas suaves a través de pipetas Pasteur estériles. Los fragmentos de tejido no disgregados fueron sedimentados en el tubo con una centrifugación a 100 x g durante 10 segundos, las células en suspensión fueron transferidas a un nuevo tubo estéril. La disgregación del tejido se repitió dos veces más con pipetas Pasteur de diámetro de apertura menor y el sobrenadante fue recuperado en el mismo tubo. La viabilidad celular fue determinada usando azul de tripano 0,2% en una cámara de Neubauer y las células recuperadas fueron sembradas en cubreobjetos redondos de 22 mm (tratadas con poli-L-lisina) a una densidad de 200.000 células/cubreobjeto. Las células fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Tres horas después de haber plaqueado, el medio de cultivo fue cambiado por Neurobasal Completo (Neurobasal suplementado con B27, 20 U/ml de penicilina y 20 µg/ml de estreptomycin y 2mM de Glutamax) y las células

fueron mantenidas por 10 a 14 días antes del tratamiento. Para inhibir la proliferación de glías al segundo día de cultivo se adicionó 1.4 ng/ μ l de 5-Fluoro-2'-deoxy-uridina (FUdR) y 3.5 ng/ μ l de Uridina y retirado 24 hrs. más tarde, agregando medio Neurobasal Completo. Para el cultivo de células corticales se procedió con el mismo protocolo, salvo que la disección fue de la zona cortical de los cerebros.

Los cubreobjetos se incubaron la noche anterior con poli-L-lisina (50 μ g/ml) y el día del cultivo la poli-L-lisina fue recuperada. Luego las placas fueron lavadas tres veces por 30 minutos con agua tridestilada estéril y se secaron.

4.2.2. Estimulación eléctrica

La estimulación eléctrica de campo fue efectuada sobre las células en ACSF a un voltaje constante de 25 voltios, a 10 Hz y 50 Hz, según se detalla. Para ello se utilizó el estimulador, fabricado en nuestro laboratorio, y se reguló la intensidad, la duración y la frecuencia del impulso eléctrico a través de un osciloscopio. El estímulo eléctrico fue dado a las células con un electrodo de campo de 60 mm de diámetro, con alambres de platino separados por 5 mm cada uno.

4.2.3 Medición de Razón GSH/GSSG

Neuronas corticales de cultivo primario de 7- 9 días fueron estimuladas eléctricamente con 50 Hz 1000 pulsos, luego fueron lisadas con 100 μ L de HCl 30 mM. Se agregaron 7 μ L de ácido sulfosalicílico 1 g/ml. Se centrifugó a 16800 g a 4°C durante 10 minutos. Se tomó una alícuota para medición de proteínas. Para la medición primero se realizó una curva estándar a distintas concentraciones de GSH en presencia del medio de reacción y la enzima GSH reductasa.

El medio de reacción contiene 20,83 mL de buffer stock (NADPH (0,248 mg/mL), NaH_2PO_4 (143 mM), Na_2EDTA (6,3 mM), ajustar a pH 7,5 con NaOH). Enzima Glutación Reductasa a una concentración de 2,74 U/ml de solución final. Ácido Sulfosalicílico 5% en agua.

Para la medición de glutatión total en las muestras se tomaron 25 μL y se agregaron 950 μL de medio de reacción y 10 μL de enzima, midiéndose la absorbancia en espectrofotómetro a 412 nm de longitud de onda. El blanco correspondía al medio de reacción mas enzima y 25 μL de ácido sulfosalicílico al 5 %. Para la medición de GSSG se tomaron 60 μL de muestra y se agregó 1.2 μL de 2 – vinilpiridina (2-VP) más 6 μL de Trietanolamina (TEA) (1:1 en agua). Se mantuvo 1 hora en oscuridad. Se tomaron 25 μL de esta mezcla y se agregaron 950 μL de medio de reacción y 10 μL de enzima diluida. El blanco era igual al blanco anterior, manteniendo el volumen final (985 μL) tras agregar 1.2 μL de 2-VP y 6 μL de TEA. Se midió absorbancia a la longitud de onda de 412 nm.

La concentración de GSH reducido se obtuvo de la resta del GSSG del glutatión total. La razón se expresó como GSH reducido respecto al total normalizado por la concentración de proteínas correspondiente.

4.2.4 Medición de Proteínas

La medición de proteínas se realizó por el método de Hartree [49]

4.2.5 Transfección.

Las neuronas fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La transfección se llevó a cabo con 0,6 μg de ADN más 2 μl de Lipofectamina por cada 1 ml de medio Neurobasal. Se realizó el día 9-11 de DIV de las neuronas, un día antes de la estimulación eléctrica.

4.2.6 Medición de Calcio

La medición se efectuó al día 10-12 DIV de las células hipocámpales. Las neuronas fueron cargadas durante 40 minutos a 37°C con 5,72 μM de FuraRed-AM (preparado en una solución stock de 1,43 mM en DMSO) o por 20 minutos con 5,23 μM de Fluo-4 AM (preparado en solución stock de 1,31 mM en DMSO) en solución salina ACSF (en mM: NaCl, 124; KCl, 1; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1,3, glucosa, 10; NaHCO₃, 25; NaH₂PO₄, 1,22, pH 7,4), lavadas en la misma solución para permitir des-esterificación de la sonda

y transferidas a la cámara de observación. Las mediciones fueron realizadas usando un microscopio confocal, excitando con un laser de argón a una longitud de onda de 488 nm y recogiendo la emisión con un filtro de 545 nm de longitud de onda para Fluo-4 AM y de 650 nm de longitud de onda para FuraRed AM.

4.2.7 Medición de H₂O₂

Las neuronas fueron transfectadas en el día 9 de cultivo con el plasmidio Hyper-Cyto (Evrogen). Este plasmidio transcribe para una proteína híbrida que consiste en la proteína fluorescente amarilla circular permutada (cpYFP) insertada en el dominio de regulación de la proteína procariótica sensora de H₂O₂, OxyR. (Figura 5). Esto permite monitorear la producción de peróxido de hidrogeno. Las células fueron lavadas en ACSF y los experimentos llevados a cabo en la misma solución. Las células fueron excitadas a una longitud de 488 nm y la emisión fue recogida con un filtro a la longitud de onda de 545 nm en microscopio confocal.

4.2.8 Localización de p65 fusionada a Proteína Fluorescente Verde aumentada (eGFP-p65)

Las neuronas fueron transfectadas al día 9 de cultivo con el plasmidio eGFP-p65, para ser estimuladas al día 10 en solución ACSF. Dos horas y media después de la estimulación las neuronas fueron fijadas con una solución de PBS con paraformaldehído (PFA) al 4% y sacarosa al 4% toda la noche a 4°C. Se lavaron durante 15 minutos 3 veces con PBS y los núcleos fueron teñidos con el marcador nuclear Hoechst por 15 minutos, previo al montaje realizado con medio de montaje VectaShield o Dako, en portaobjetos y almacenados a -20° C hasta toma de imágenes.

4.2.9 Análisis de imágenes y microscopía.

Mediciones y experimentos fueron hechos en un microscopio de escaneo laser confocal invertido Zeiss. Las imágenes obtenidas en los experimentos de medición de ROS y calcio fueron tomadas y analizadas con el programa computacional LSM Image, fueron registradas en promedio 1 y 5 células por experimento, respectivamente.

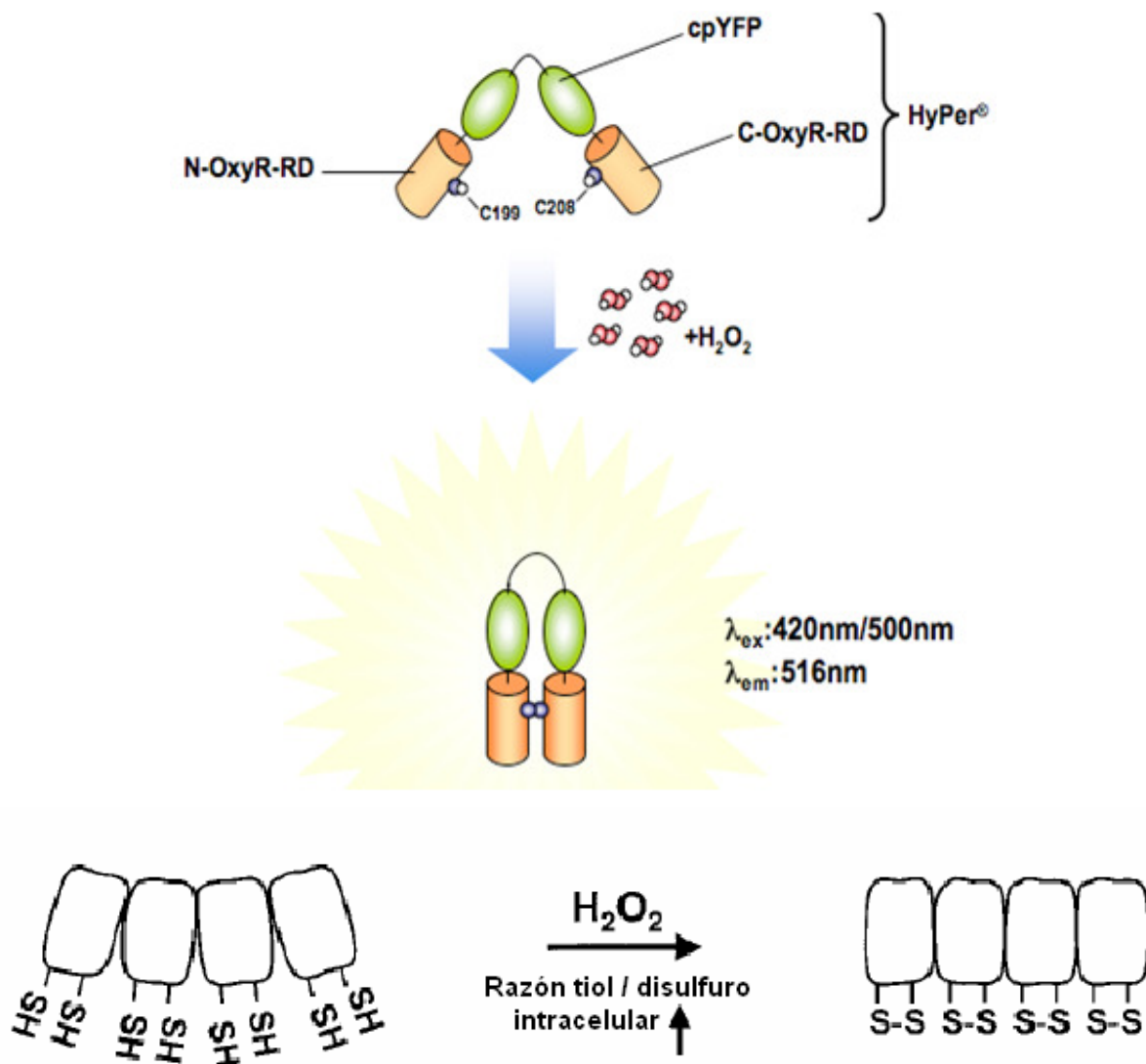


Figura 5. Esquema de plasmidio HyperCyto.

HyperCyto (Evrogen) contiene una proteína de fusión compuesta por un dominio OxyR, el cual reacciona específicamente con el H_2O_2 el que oxida sus grupos -SH, con la consiguiente formación de puentes disulfuros que cambian la conformación estructural de la molécula. El otro dominio fusionado corresponde a una proteína fluorescente amarilla circular la cual tras el cambio conformacional al ser excitada a 488 nm es capaz de emitir a una longitud de onda de 516 nm. a) Estructura y funcionamiento del plasmidio. Contribución de Elías Leiva b) Mecanismo de activación del dominio OxyR. Modificado de Drogö, 2002

Para las imágenes obtenidas de p65-eGFP se usó un corte confocal de 1 μm de tamaño de la zona ecuatorial de la célula, esta zona fue determinada luego de fijar el tamaño de cada célula. Las imágenes de neuronas de hipocampo positivas para p65-eGFP sometidas a análisis cuantitativo fueron tratadas con el programa computacional de imágenes, ImageJ. Las imágenes adquiridas de neuronas de hipocampo positivas para eGFP-p65 fueron deconvolucionadas utilizando el programa Huygens Scripting (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Holanda). Las rutinas de procesamiento de imágenes han sido desarrolladas en el laboratorio del Dr. Steffen Härtel (Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) sobre la base del programa IDL (Interactive Data Language, ITT, CO, EE.UU.). La segmentación de las diferentes regiones de interés (ROIs) se realizó utilizando el siguiente protocolo: las imágenes fueron estratificadas según intensidad de los canales correspondientes a la señal verde (p65-eGFP) y a la señal azul Hoechst (núcleo) y utilizando diferentes filtros para demarcar la extensión de las células a cuantificar. Se determinó la intensidad de fluorescencia tanto en la región citosólica como nuclear y ambas intensidades fueron normalizadas por su respectiva área.

El análisis semi cuantitativo se llevó a cabo observando la distribución de la marca verde, correspondiente a eGFP-p65, en la célula. El tamaño y ubicación del núcleo fue determinado por la presencia de Hoechst. Los resultados se expresaron en porcentaje de marca en determinada ubicación celular con respecto al total de células positivas para transfección.

4.2.10 Análisis y Gráficos

El análisis de los datos y la construcción de los gráficos fueron realizados con los programas LSM Reader y GraphPad Prism 4.0. El análisis estadístico en la cuantificación de fluorescencia de eGFP-p65 se llevó a cabo con el método de ANOVA (de una vía) seguido del post test de Bonferroni. Los ejes de los gráficos de medición de H_2O_2 y calcio corresponden para el eje X a tiempo, expresado en segundos, y para el eje Y a la diferencia de la fluorescencia captada (F) menos la fluorescencia basal (F_0), dividida por la fluorescencia basal en el caso del peróxido. Para la medición de calcio corresponde a la diferencia entre fluorescencia basal y fluorescencia captada (F_0-F) dividida por la fluorescencia basal.

5. RESULTADOS

Primero se estandarizó el método de estimulación, de acuerdo al trabajo previo en el laboratorio y a la literatura disponible, estableciéndose en 25 V la intensidad del estímulo generado para el campo, voltaje suficiente para generar una respuesta de las células, sin causar muerte apreciable de las mismas, hecho demostrado previamente en el laboratorio por medición de viabilidad con azul de tripano. Trabajos previos del laboratorio realizados con neuronas hipocampales en cultivo primario con el mismo número de días in vitro han mostrado que presentan el receptor de ryanodina funcional. Las neuronas responden a H₂O₂ activando ERKs y CREB a través de liberación de calcio mediada por el canal de calcio receptor de ryanodina [50].

5.1 Medición de Especies Reactivas de Oxígeno y de Calcio

Neuronas hipocampales fueron sometidas a estimulación eléctrica de campo a una frecuencia de 50 Hz y con una intensidad de 25 volts. El estímulo consistió en 1000 pulsos eléctricos, con una duración de 1 ms cada uno.

La producción de especies reactivas de oxígeno se midió, inicialmente, con la sonda dihidro-diclorofluoresceína, molécula que emite luz fluorescente tras reaccionar con radicales libres oxidantes como los ROS, sin embargo la sonda demostró, en experimentos llevados a cabo en microscopía de fluorescencia, ser también fotosensible. Por lo que, tras una serie de experimentos (no mostrados) se decidió ocupar una herramienta más eficaz.

Esta herramienta consistió en una proteína híbrida sensible a la producción de peróxido de hidrogeno, la cual se encuentra fusionada con un dominio de proteína fluorescente amarilla, lo que le permite emitir señal fluorescente tras un cambio conformacional producido por una reacción entre el dominio Oxy-R (sensible a peróxido) y el peróxido de hidrogeno. La observación de esta nueva modalidad experimental se realizó a través de microscopía confocal.

Para lograr esta medición las células eran sometidas a un protocolo de transfección cuyo vehículo es el reactivo Lipofectamine2000, un día antes de la estimulación y

correspondiente medición. Para comenzar, se debió demostrar que nuestro sistema de medición, efectivamente es capaz de sensar la presencia de peróxido de hidrogeno en las células. Para ello se agregó al medio de cultivo peróxido de hidrogeno en concentración final de 200 μ M, generándose un aumento en la emisión fluorescente de las células transfectadas. (Figura 6). Para la cuantificación se consideró la fluorescencia emitida por la célula completa. Comprobado el funcionamiento del plasmidio, en los experimentos en adelante realizados se procedió a estimular eléctricamente a las neuronas.

Utilizando la metodología previamente explicada, se observó que la estimulación eléctrica de campo generó efectivamente, un aumento en la producción de peróxido de hidrogeno (Figura 6), generado por un aumento del anión superóxido.

Para la medición del calcio intracelular se utilizaron dos sondas, Fluo-4, sonda que aumenta su emisión en el mismo rango que el plasmidio Hyper-Cito, por lo que las mediciones simultáneas de generación de ROS y aumento de calcio se realizaron con la sonda FuraRed, la cual es excitada con un láser que emite a la longitud de onda de 488 nm, la misma que el plasmidio Hyper-Cito, pero la sonda responde emitiendo en el rango de luz roja, a diferencia de los anteriores que lo hacen en el rango de la luz verde. Tanto la observación con Fluo-4, como con FuraRed se llevó a cabo en un microscopio confocal.

En la Figura 7 se grafican mediciones simultáneas de ROS y calcio en la situación control. Se puede observar inmediatamente tras el estímulo eléctrico un aumento transitorio en la fluorescencia en respuesta a calcio, seguido de un segundo aumento de la señal. Con respecto a la señal de peróxido de hidrogeno, se observa un aumento tardío respecto al estímulo y que parece coincidir con el segundo aumento de calcio. La señal de peroxido tiende a ser permanente durante el tiempo restante del experimento.

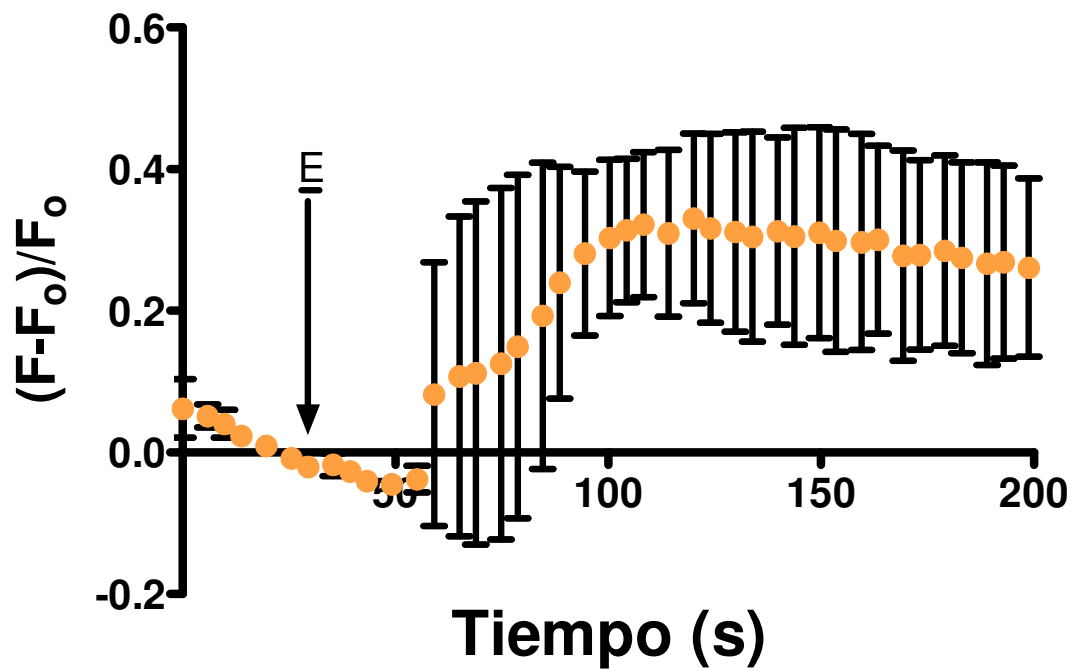


Figura 6. Respuesta del plasmidio HyperCyto a H₂O₂ exógeno.

Se muestra el aumento de fluorescencia del plasmidio frente a la adición de H₂O₂ en concentración final de 200 μM. En E se señala el momento en que se agregó el peróxido (30 s), hay que destacar que rápidamente aumenta la señal tras el estímulo. El leve retraso en este aumento corresponde con el tiempo estimado de difusión hasta la célula observada del H₂O₂. n= 2

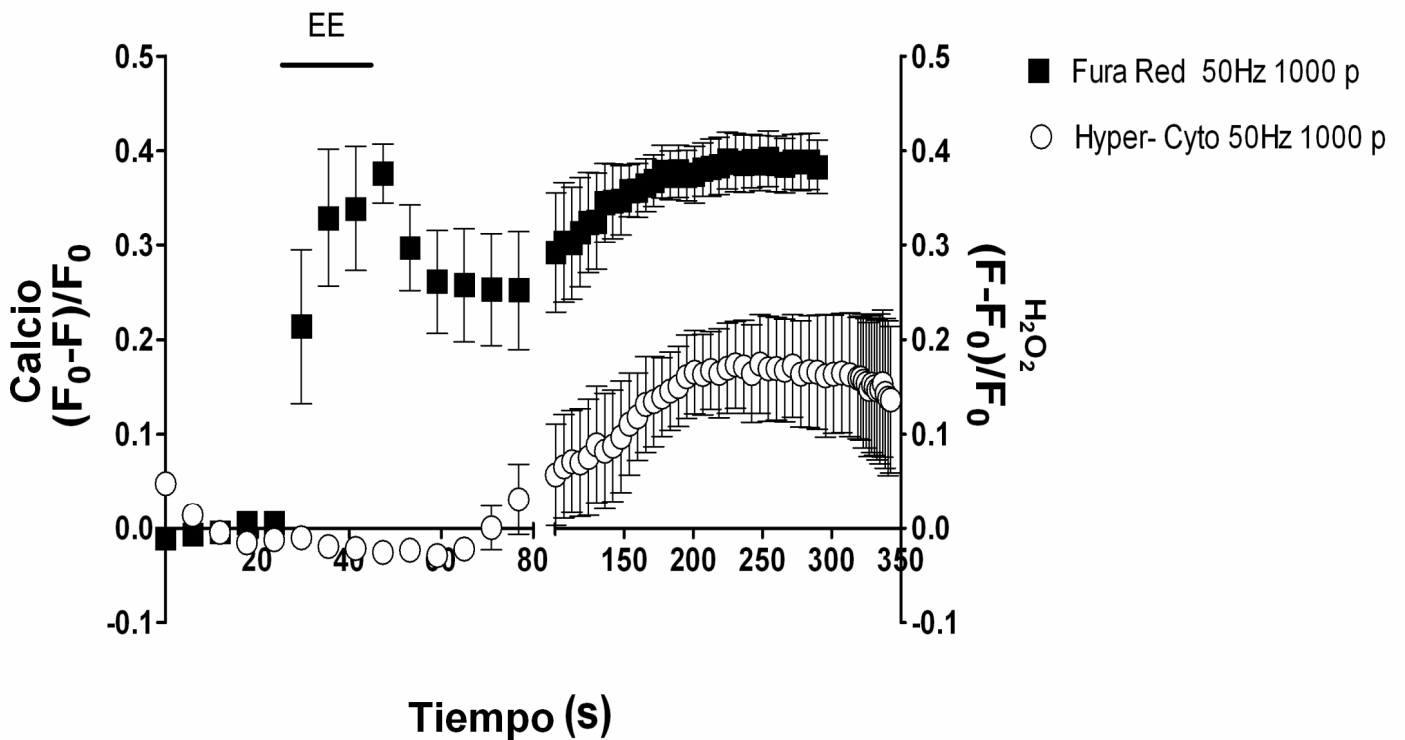


Figura 7. Medición de especies reactivas de oxígeno y calcio en neuronas estimuladas eléctricamente.

Se grafica la señal de fluorescencia calcio (FuraRed AM) y de ROS (HyperCyto) tras estímulo eléctrico de 50 Hz 1000 pulsos. En adelante mencionado como condición control (n= 4 para ambas condiciones). Se observa la respuesta inmediata de la señal de calcio en un aumento transitorio de la misma, seguido de un segundo aumento, más lento pero más duradero. La respuesta de H_2O_2 en cambio es más lenta en su aparición y coincide en términos temporales con el segundo aumento de la señal de calcio.

5.2 Producción de ROS y aumento de calcio intracelular atenuada por inhibición del aumento de calcio citoplasmático.

En el marco del aumento de ROS producido por la estimulación eléctrica y, como es explicado en los antecedentes, la interrelación existente entre calcio y las especies reactivas de oxígeno, se estudió observando como la producción de ROS es afectada por variaciones en el calcio citoplasmático.

Para ello, se utilizaron distintas estrategias que regulan la presencia de calcio en el interior de la célula. Primero se utilizó un medio de reposo en ausencia de calcio y con EDTA quelante del ion metálico. Además, se utilizó BAPTA, quelante intracelular de calcio y por último, ryanodina, en concentraciones inhibitorias para el canal de calcio receptor de ryanodina.

Primero se analizará como varían las curvas de liberación de calcio intracelular con las estrategias recientemente planteadas, para luego ver como estas variaciones afectan la producción de peróxido de hidrógeno.

La liberación de calcio observada en los experimentos controles fue alterada según cada uno de los reguladores de la presencia del ion. Para el caso de la estimulación eléctrica de células en un medio extracelular sin calcio externo, se observa una ausencia del transitorio inicial presente en los controles, aunque si se observa un posterior aumento de la señal (Figura 8). En la estimulación de células preincubadas con BAPTA-AM a la concentración de 10 μM , se observa un comportamiento similar al visto en ausencia de calcio intracelular, es decir, una desaparición de la señal inicial, pero la presencia de un aumento en la misma, posterior al estímulo (Figura 9). Por último, la incubación previa durante 1 hora con una concentración de 50 μM de ryanodina muestra un comportamiento similar al observado en los anteriores sistemas de inhibición, una ausencia del transitorio inicial y un aumento, posterior a esta inhibición, y que es similar al nivel constante de fluorescencia presente en las células estimuladas en condiciones basales (Figura 10).

Respecto a las especies reactivas de oxígeno, los resultados muestran que la producción de ROS se ve afectada en ausencia de calcio extracelular, pues como se observa en el

grafico, hay una disminución en la fluorescencia emitida por el plasmidio en comparación con el control, tras la estimulación eléctrica. (Figura 11). Para el caso de incubaciones de 30 minutos con BAPTA-AM, a una concentración de 10 μM , según lo reportado en literatura, las respuestas detectadas hablan de una atenuación en la generación de ROS (Figura 12). En tanto incubación previa por 1 hora con ryanodina 50 μM , muestra una clara disminución de la señal, lo que representaría una participación, a lo menos parcial, del calcio proveniente de reservorios reticulares y liberado por el canal de calcio afectado por esta toxina vegetal (Figura 13).

También se estudió como inhibidores de ROS influían en el aumento de calcio citoplasmático, pero los resultados obtenidos no son concluyentes respecto de si existe un efecto regulatorio en este sentido. Para ejemplificar este aspecto se muestra como la incubación con un inhibidor de la generación de ROS como DPI (Figura 14), inhibidor específico de flavoproteínas, no muestra variación en la fluorescencia en respuesta a la liberación de calcio (Figura 15). Sin embargo, nuevos experimentos no mostrados, realizados en células con mayor número de días, apuntan a que DPI podría estar afectando la cinética del aumento de calcio intracelular.

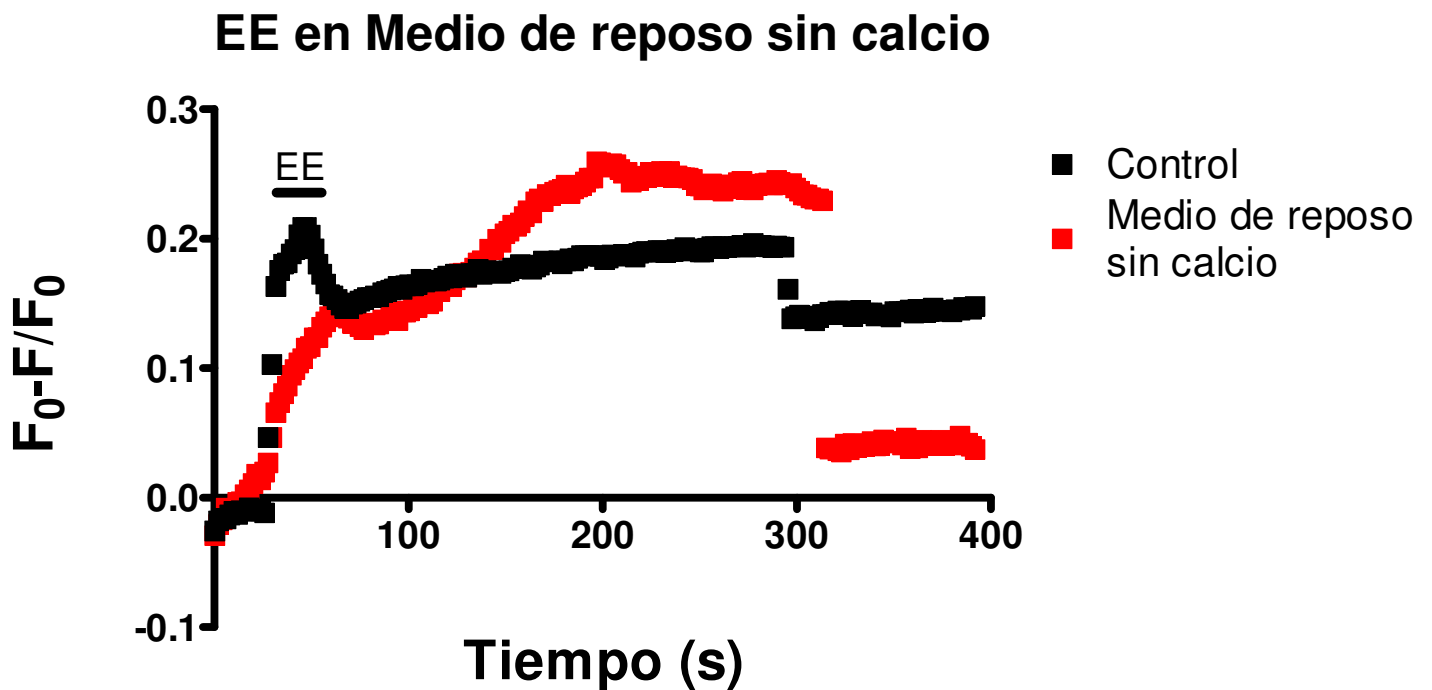


Figura 8. Medición del aumento de calcio intracelular en neuronas estimuladas eléctricamente, en medio de reposo sin calcio.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF) sin calcio. Se grafica la tendencia de la señal de Ca^{2+} (FuraRed AM) antes, durante y después del estímulo. Se muestra ausencia del peak inicial y pequeñas variaciones en el comportamiento posterior de la señal respecto a la curva control. (Control n=10, en medio de reposo sin calcio n= 3)

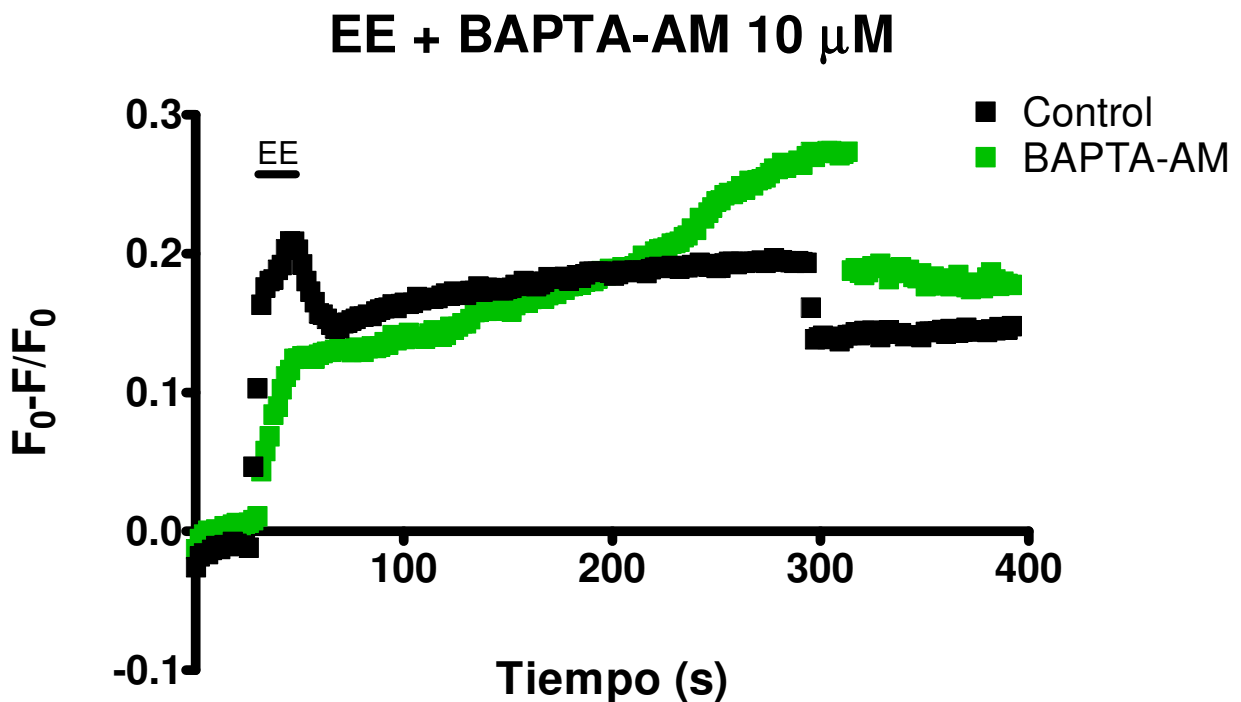


Figura 9. Medición del aumento de calcio intracelular en neuronas estimuladas eléctricamente, en presencia de BAPTA-AM.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF). Las neuronas fueron incubadas 30 minutos previo al estímulo con BAPTA-AM 10 μ M. Se grafica la tendencia de la señal de Ca^{2+} (FuraRed AM) antes, durante y después del estímulo. Se muestra una desaparición del aumento agudo inicial, aunque se revela un persistente aumento tras la estimulación que decae rápidamente. (Control n=10, con BAPTA-AM n= 3)

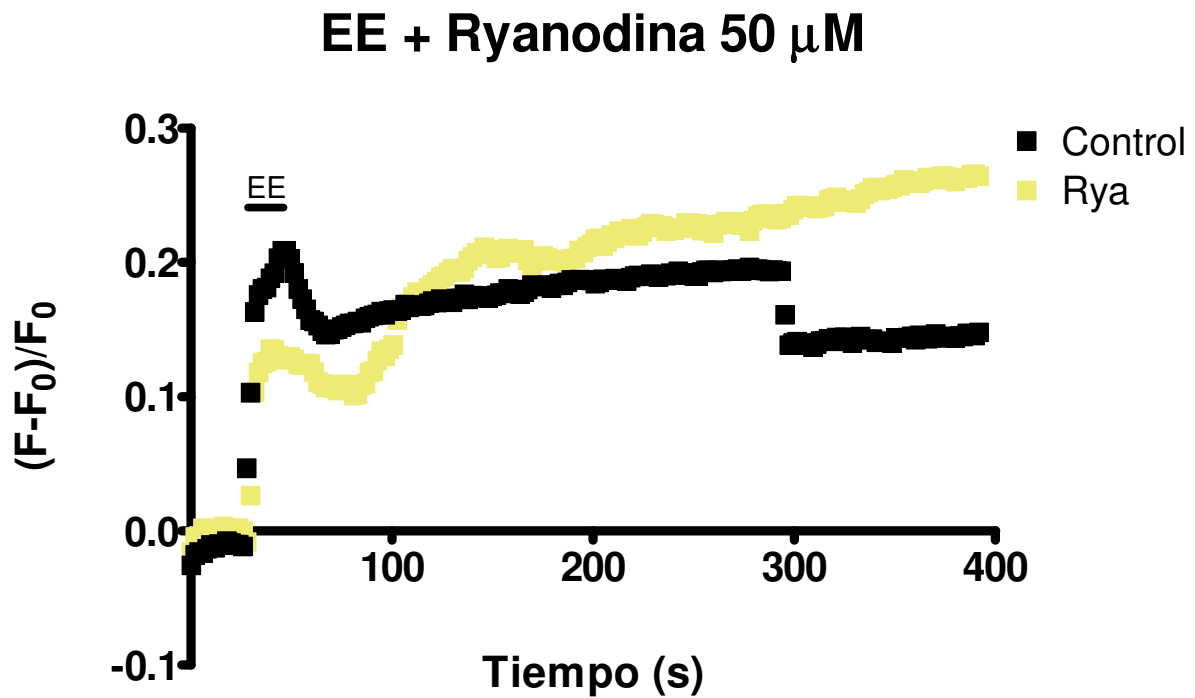


Figura 10. Medición del aumento de calcio intracelular en neuronas estimuladas eléctricamente, en presencia de ryanodina.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF). Las neuronas fueron incubadas 1 hora previo al estímulo con Ryanodina 50 μ M. Se grafica la tendencia de la señal de Ca^{2+} (FuraRed AM) antes, durante y después del estímulo

Se muestra una desaparición del peak inicial y un aumento posterior sostenido. (Control n=10, con ryanodina n= 4)

EE en medio de reposo sin calcio

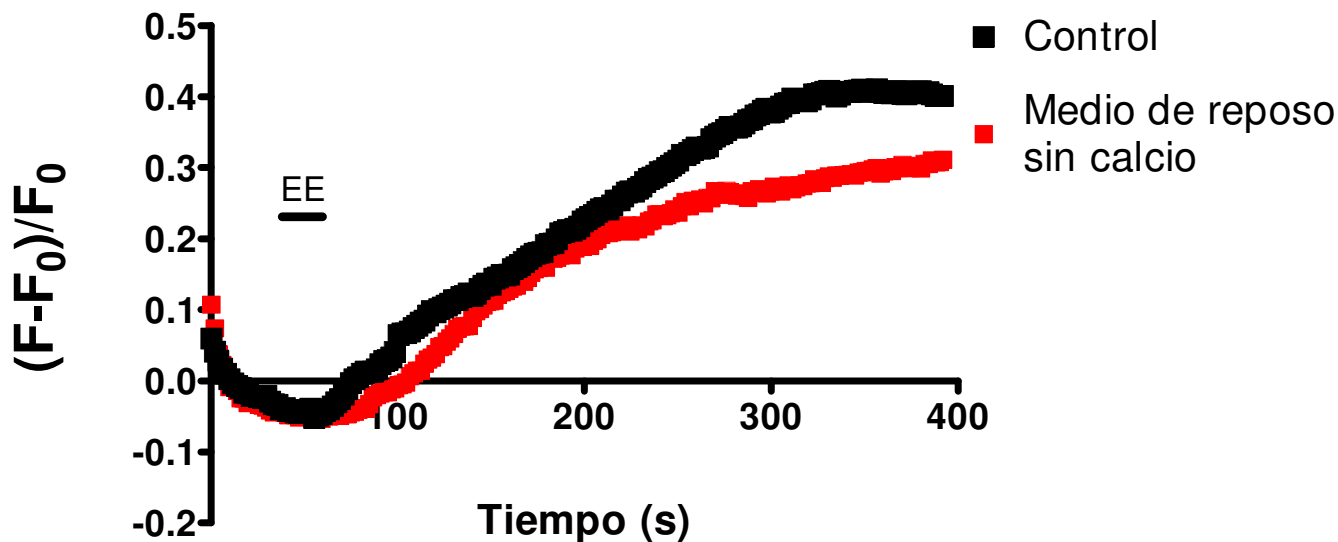


Figura 11. Medición de producción de ROS en medio de reposo sin calcio en neuronas estimuladas eléctricamente.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF) sin calcio. Se grafica la tendencia de la señal de H₂O₂ (HyperCyto) antes, durante y después del estímulo. Si bien los comportamientos de las curvas son similares en ambas situaciones, se observa una variación en la producción de peróxido en la parte final de la misma. (Control n=10, en medio de reposo sin calcio n= 4)

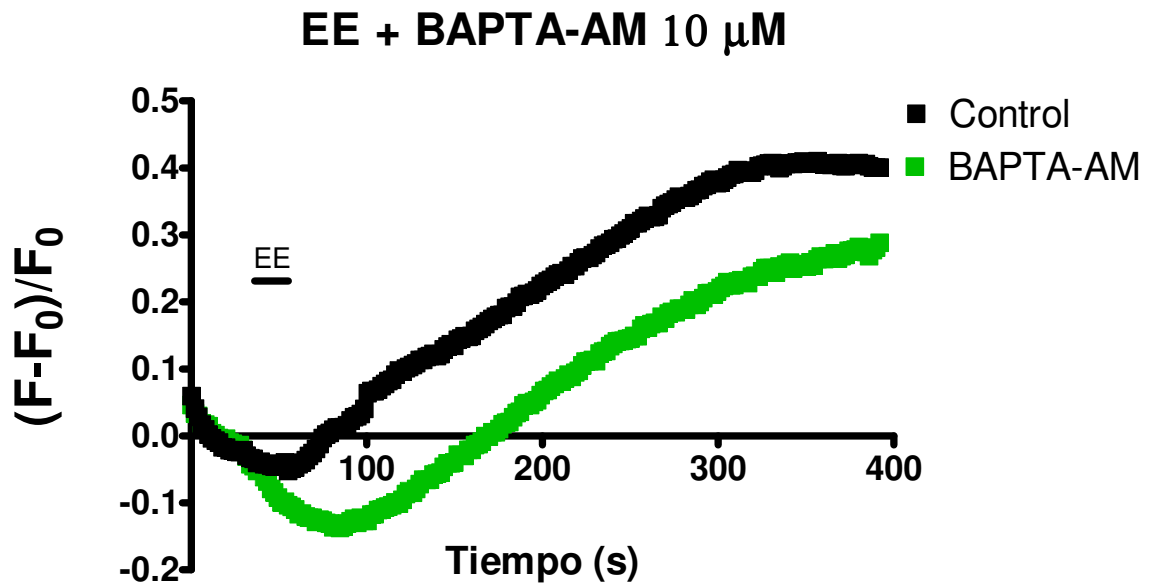


Figura 12. Medición de producción de ROS en presencia de BAPTA-AM en neuronas estimuladas eléctricamente.

Neuronas hipocámpicas fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF) sin calcio. Las neuronas fueron incubadas antes del estímulo con BAPTA-AM 10 μ M. Se grafica la tendencia de la señal de H₂O₂ (HyperCyto) antes, durante y después del estímulo. Las curvas presentan un comportamiento cinético similar en ambas condiciones aunque se observa un retardo y una disminución en la producción de peróxido de hidrógeno en las incubadas con el quelante. (Control n=10, con BAPTA-AM n= 5)

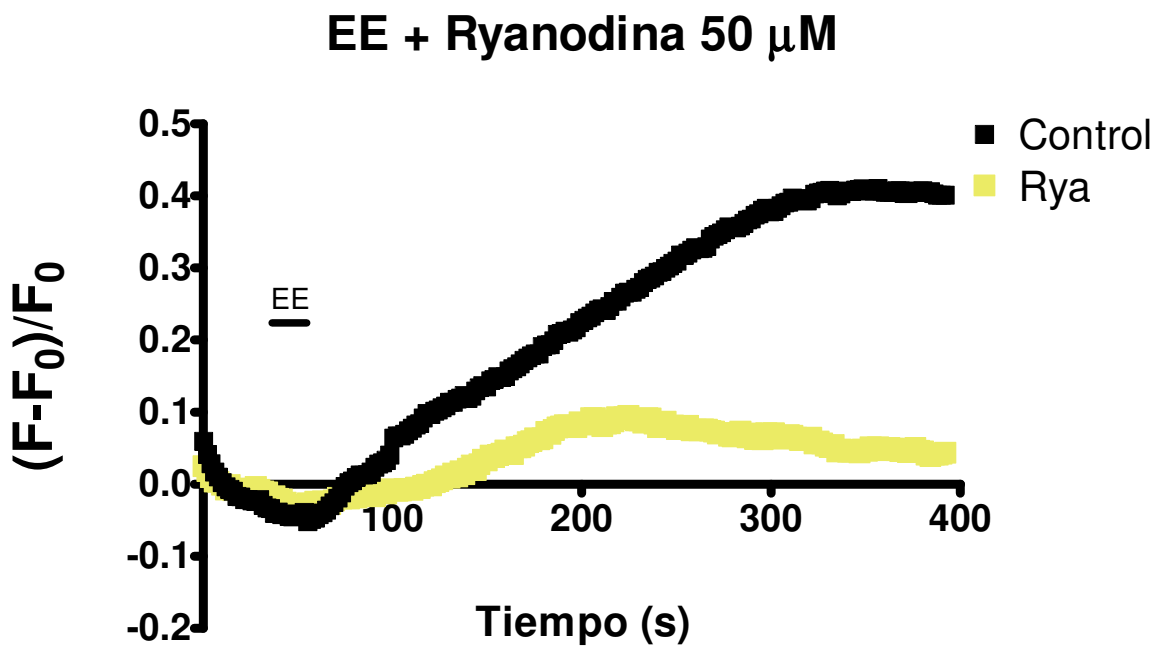


Figura 13. Medición de producción de ROS en presencia de ryanodina en neuronas estimuladas eléctricamente.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF) sin calcio. Las neuronas fueron incubadas antes del estímulo con ryanodina 50 μ M. Se grafica la tendencia de la señal de H₂O₂ (HyperCyto) antes, durante y después del estímulo. Se muestra una inhibición prácticamente total en la producción de peróxido de hidrógeno en las células incubadas con ryanodina, demostrándose lo clave que es el calcio proveniente desde el retículo por el receptor de ryanodina en la generación de peróxido de hidrógeno. (Control n=10, con ryanodina n= 4)

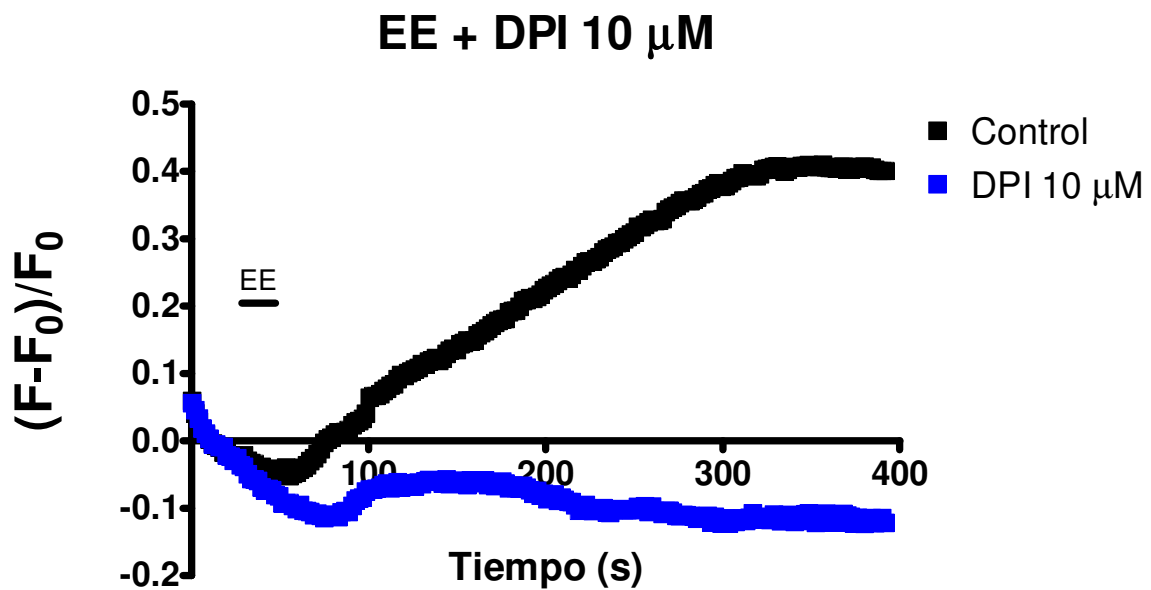


Figura 14. Medición de producción de ROS en presencia de DPI, en neuronas estimuladas eléctricamente.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF) sin calcio. Las neuronas fueron incubadas antes del estímulo con DPI 10 μ M. Se grafica la tendencia de la señal de H_2O_2 (HyperCyto) antes, durante y después del estímulo. Se observa una total inhibición en la producción de peróxido de hidrógeno, confirmando la actividad inhibitoria general de DPI en la producción de ROS (Control n=10, con DPI n= 3)

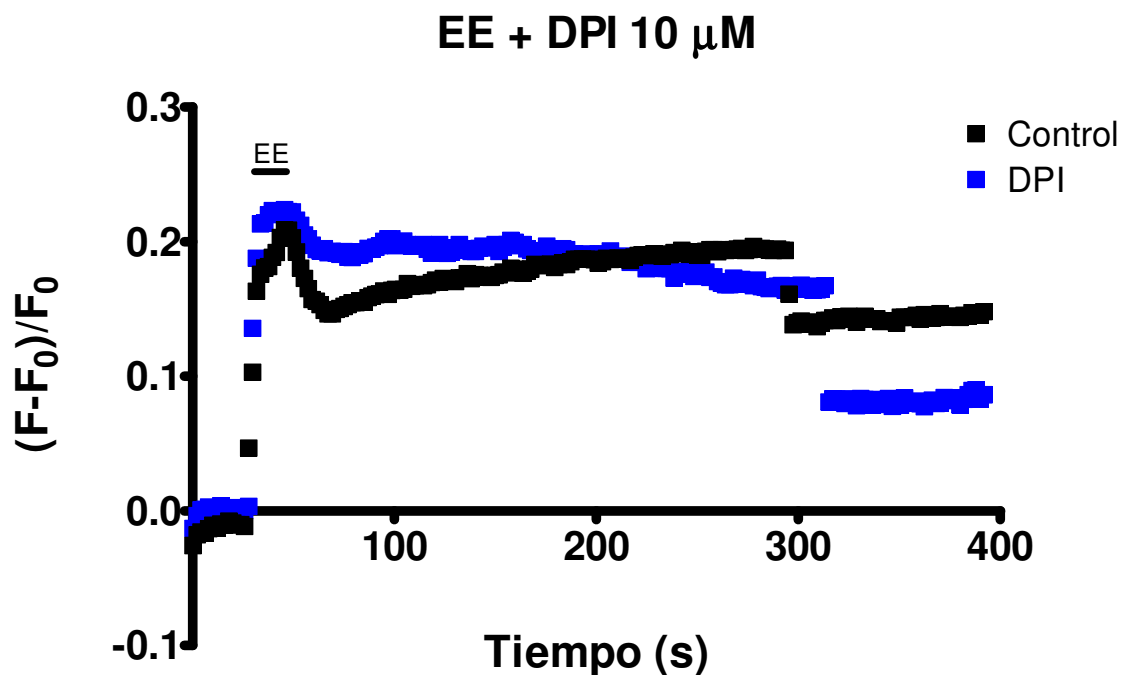


Figura 15. Medición del aumento de calcio intracelular en neuronas estimuladas eléctricamente, en presencia de DPI.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF). Las neuronas fueron incubadas 1 hora previo al estímulo con DPI 10 μ M. Se grafica la tendencia de la señal de Ca^{2+} (FuraRed AM) antes, durante y después del estímulo. A esta concentración de DPI no se aprecian cambios en el comportamiento del calcio en las células incubadas con el inhibidor de flavoproteínas respecto a la condición control. (Control n=10, con DPI n= 3)

5.3 Traslocación de eGFP-p65 en células neuronales, ante estímulos eléctricos en presencia o ausencia de inhibidores de la generación de ROS y de la liberación de Ca^{2+} .

5.3.1 Traslocación de p65 endógeno ante estímulo eléctrico.

Neuronas hipocampales de 9-12 DIV fueron estimuladas eléctricamente, fijadas dos horas y media después, e incubadas con un anticuerpo anti-p65 durante toda la noche a 4°C. Luego fueron incubadas con anticuerpo secundario fluorescente anti-ratón, que emite fluorescencia tras ser excitado a 488 nm. Sin embargo en este trabajo, después de varios intentos, no mostró una señal adecuada de reconocimiento por parte del anticuerpo primario anti-p65, por ello se procedió a ocupar una estrategia experimental distinta, que consistía en el uso de p65 acoplado a una proteína fluorescente verde aumentada (eGFP-p65), mecanismo que permitió observar la ubicación de la proteína de manera clara y adecuada al instrumental disponible.

5.3.2 Traslocación de eGFP-p65 ante estímulo eléctrico.

Células hipocampales de 9-12 días fueron sometidas a estímulo eléctrico, según descripción previa observándose que tras la aplicación de 1000 pulsos a 50 Hz, hay un aumento de la presencia de la proteína de fusión eGFP-p65 en el núcleo de la célula. (Figura 16).

Otros experimentos realizados, pero que no fueron sometidos al análisis cuantitativo de los experimentos anteriores, sino que a un análisis cualitativo descrito en Métodos, muestran la misma tendencia. Se observa que frente a la estimulación de 4000 pulsos hay un aumento en la traslocación de eGFP-p65 respecto a los controles sin estimular, pero no se observan diferencias respecto a las células estimuladas sólo con 1000 pulsos (Figura 17). También pendientes de ser cuantificados, se encuentran los experimentos llevados a cabo a una frecuencia menor, 10 Hz, pero con la misma cantidad de pulsos. No obstante, el análisis señala que el estímulo efectivamente aumenta la traslocación de eGFP-p65 al núcleo, aunque aparentemente habría una disminución de esa traslocación respecto a las células estimuladas con más alta frecuencia (Figura 17).

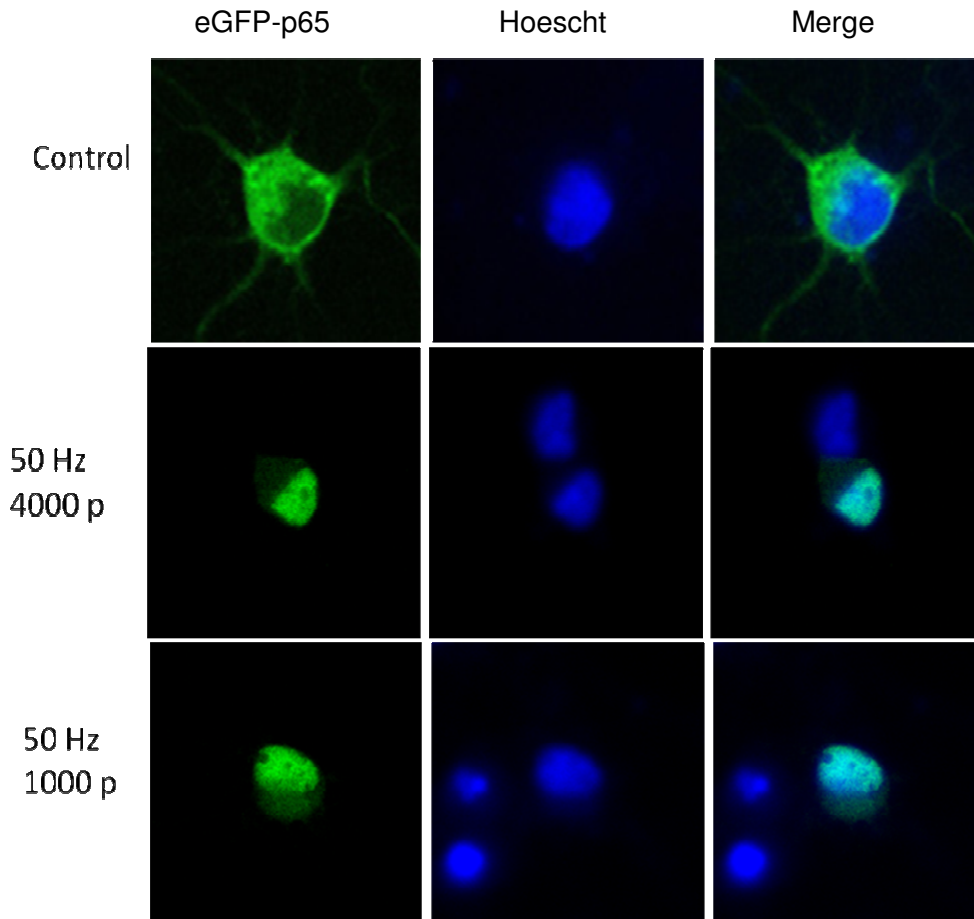


Figura 16. Traslocación de eGFP-p65 en neuronas hipocampales estimuladas con 50 Hz 4000p y 50 Hz 1000p.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos y 4000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF). Se aprecia en verde eGFP-p65 y en azul, el marcador nuclear Hoechst. En la columna marcada como Merge se encuentran fusionadas las columnas anteriores. Se observa la ausencia de marca nuclear de eGFP-p65 en las células controles, marca que si es observada en los núcleos de las células estimuladas, con p65 coincidiendo con el marcador nuclear. ($n \geq 3$ en todas las condiciones). Células fijadas 2.5 - 3 horas después del estímulo en PFA 4 %.

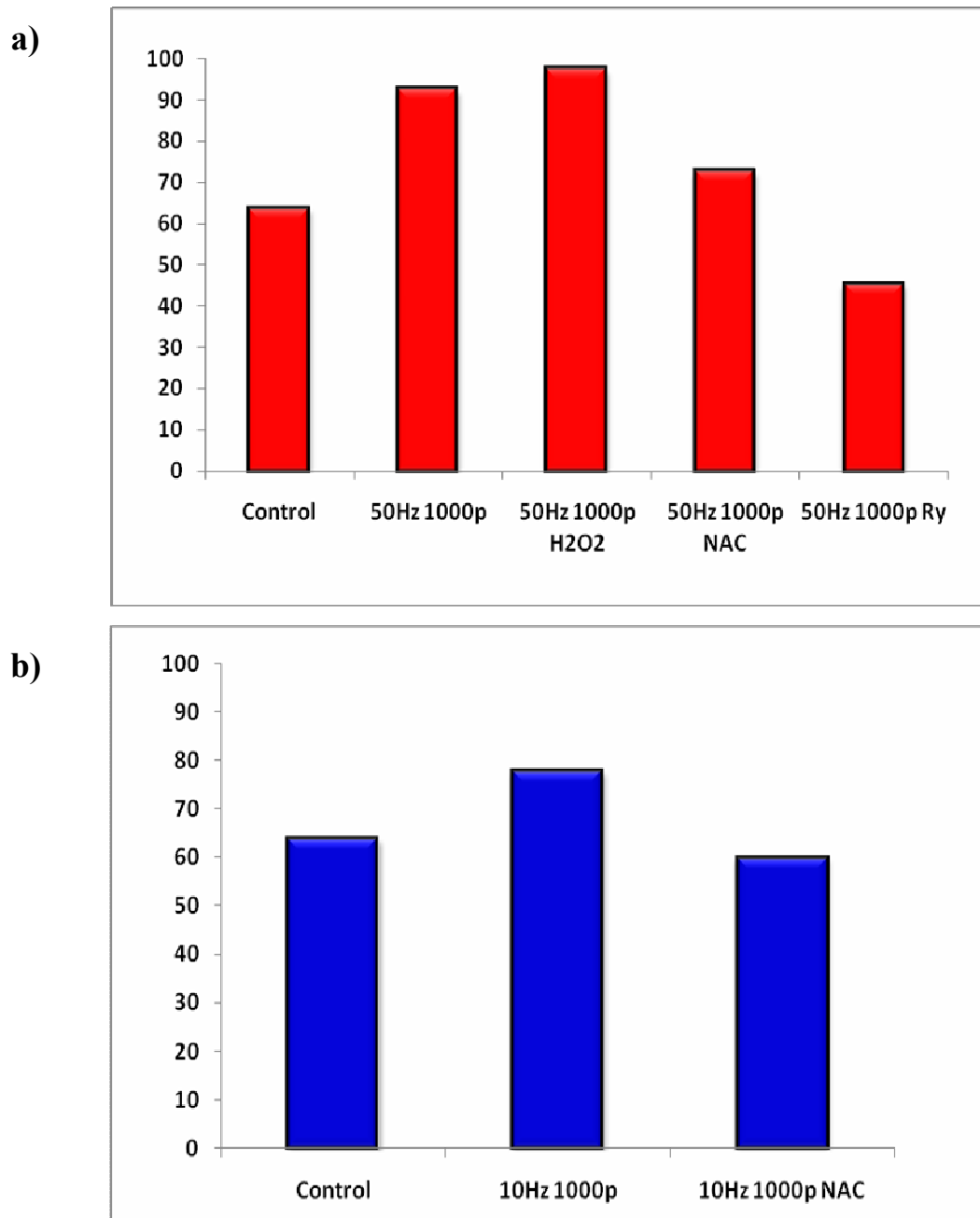


Figura 17. Análisis de la traslocación de eGFP-p65 al núcleo.

Se grafica el porcentaje de células que presentan eGFP-p65 con ubicación nuclear respecto al número total de células transfectadas. La zona nuclear corresponde a la determinada por la presencia del marcador nuclear Hoechst. **a)** Se muestran células estimuladas eléctricamente a alta frecuencia (50 Hz) a 1000 pulsos en diferentes condiciones de estimulación, se observa un aumento en la traslocación tras el estímulo eléctrico, efecto atenuado por NAC y Ryanodina (Ry) **b)** La traslocación por estímulo de baja frecuencia (10 Hz) también es atenuada por NAC. (NAC: 10 mM, H₂O₂: 200 μM, Ry: 50 μM) (n= ≥ 3 en todas las condiciones)

5.3.3 Traslocación de eGFP-p65 ante estímulo eléctrico regulada por la presencia de inhibidores de la generación de ROS y de la liberación de Ca²⁺.

Se investigó si este desplazamiento, desde el citoplasma hacia el núcleo, dependía del aumento de calcio intracelular y si había participación de las especies reactivas de oxígeno en el fenómeno. Para ello se llevaron a cabo experimentos en células incubadas con N-Acetil-Cisteína (NAC) y ryanodina. NAC es un antioxidante que puede actuar de dos maneras principales: de forma rápida, como atrapador de las especies reactivas, al reaccionar directamente con ellas; o de forma más lenta regulando los niveles de glutatión reducido presente en el citoplasma [51].

De acuerdo a este planteamiento, los resultados muestran que la traslocación observada tras el estímulo de 4000 pulsos a 50 Hz es disminuida en forma significativa por incubación previa durante 1 hora con ryanodina, teniendo al inhibidor de la apertura del canal de calcio receptor de ryanodina en concentración de 50 μ M (Figura 18). De similar forma, se muestra que la incubación previa con NAC produce una disminución significativa en la traslocación de eGFP-p65, ante el mismo estímulo (Figura 19). El análisis de estas imágenes se llevó a cabo según se explica en Métodos.

Respecto a las imágenes analizadas en forma gruesa, no se presentan diferencias entre neuronas estimuladas con 1000 pulsos a 50 Hz y las estimuladas e incubadas con H₂O₂, 200 μ M, concentración capaz de generar la activación de NF κ B (Figura 17 y 20). El análisis cualitativo muestra en neuronas estimuladas con 50 Hz y 1000 pulsos en presencia de NAC una disminución en la cantidad de células con traslocación de p65 al núcleo respecto a las neuronas tratadas (Figura 17 y 21). Además, de similar forma que a estímulos de alta frecuencia, la traslocación provocada por estimulación de baja frecuencia se ve atenuada por la incubación previa con NAC (Figura 17 y 22), lo que relacionaría, también, a este tipo de estimulación con la producción de ROS en la activación del factor transcripcional en estudio.

En el gráfico se muestra, además, un control positivo para despolarización, correspondiente a incubación con solución KCl (84 mM), los resultados muestran una tendencia similar al aumento de la observación de la presencia de eGFP-p65 en el núcleo en las células estimuladas respecto a los controles (Figura 17).

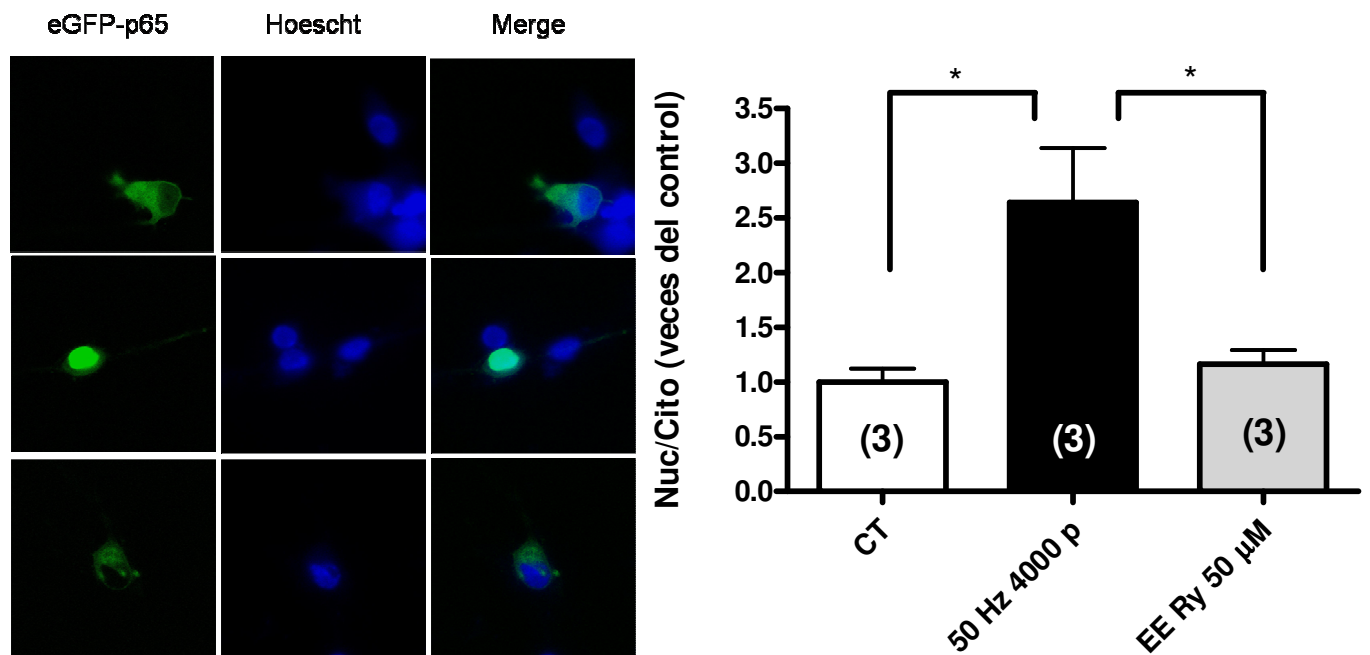


Figura 18. Traslocación de eGFP-p65 en neuronas hipocampales estimuladas con 50 Hz 4000p en presencia o ausencia de ryanodina.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 4000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF). Las neuronas fueron incubadas previamente y durante el estímulo con ryanodina 50 μM. Se aprecia en verde eGFP-p65 y en azul, el marcador nuclear Hoechst. En la columna marcada como Merge se encuentran fusionadas las columnas anteriores.

a) Se observa la presencia de eGFP-p65 en el núcleo en las células estimuladas eléctricamente, mientras que en la condición control y en las células incubadas antes, durante y después del estímulo con ryanodina, no se aprecia la marca fluorescente en el núcleo perteneciente a p65 sino que esta se ubica en el citoplasma de la neurona hipocampal.

b) Cuantificación. Se grafica la relación entre la fluorescencia correspondiente a eGFP-p65 en el núcleo respecto a la del citoplasma en cada condición, expresada en referencia a veces del control. Se observa una diferencia significativa entre las condiciones control (Ct) y estímulo eléctrico (EE) y entre la condición EE y estímulo eléctrico con incubación con ryanodina 50 μM (Ry EE), esta última no presenta diferencias con el control. Células fijadas 2.5 - 3 horas después del estímulo en PFA 4 %.*** p < 0.001 ** p < 0.01

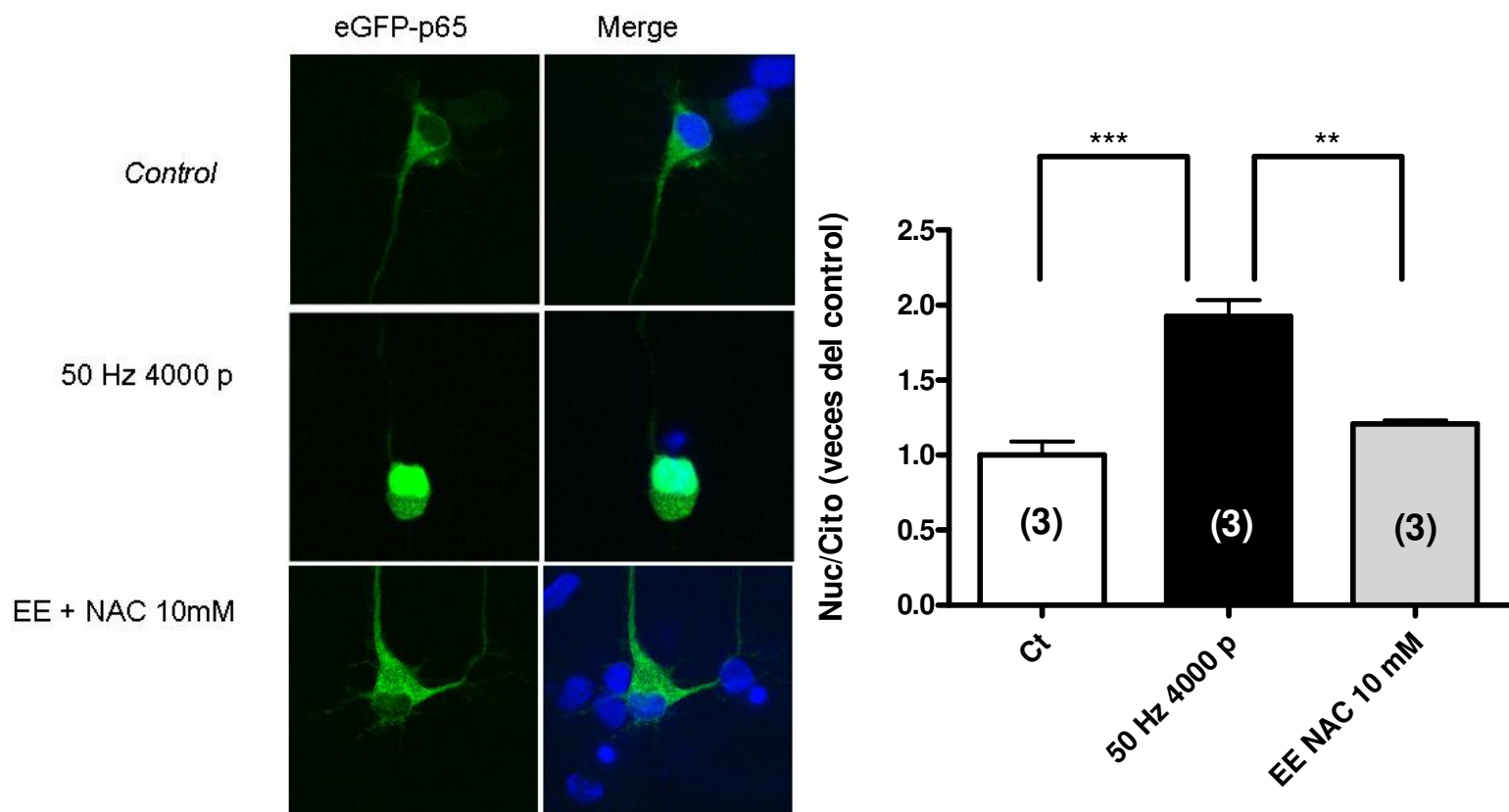


Figura 19. Traslocación de eGFP-p65 en neuronas hipocampales estimuladas con 50 Hz y 4000p en presencia o ausencia de NAC.

Neuronas hipocampales se estimularon eléctricamente con 4000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF). Las neuronas fueron incubadas previo y durante el estímulo con NAC 10 mM. **a)** Se aprecia en verde eGFP-p65 y en azul, el marcador nuclear Hoechst. En la columna marcada como Merge se encuentran fusionadas las columnas anteriores. Observase la presencia de eGFP-p65 en el núcleo en las células estimuladas eléctricamente, mientras que en la condición control y en las células incubadas antes, durante y después del estímulo con NAC, no se aprecia la marca fluorescente nuclear perteneciente a p65 sino que ésta se ubica en el citoplasma de la neurona hipocampal. **b) Cuantificación.** Se grafica la relación entre la fluorescencia correspondiente a eGFP-p65 nuclear respecto a la citoplasmática en cada condición, expresada en referencia al control. Se observa una diferencia significativa entre las condiciones control (Ct) y estímulo eléctrico (EE) y entre la condición EE y estímulo eléctrico con incubación con NAC 10 mM (NAC EE), la que no presenta diferencias con el control. Células fijadas 2.5 - 3 horas después del estímulo en PFA 4 %. *** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$

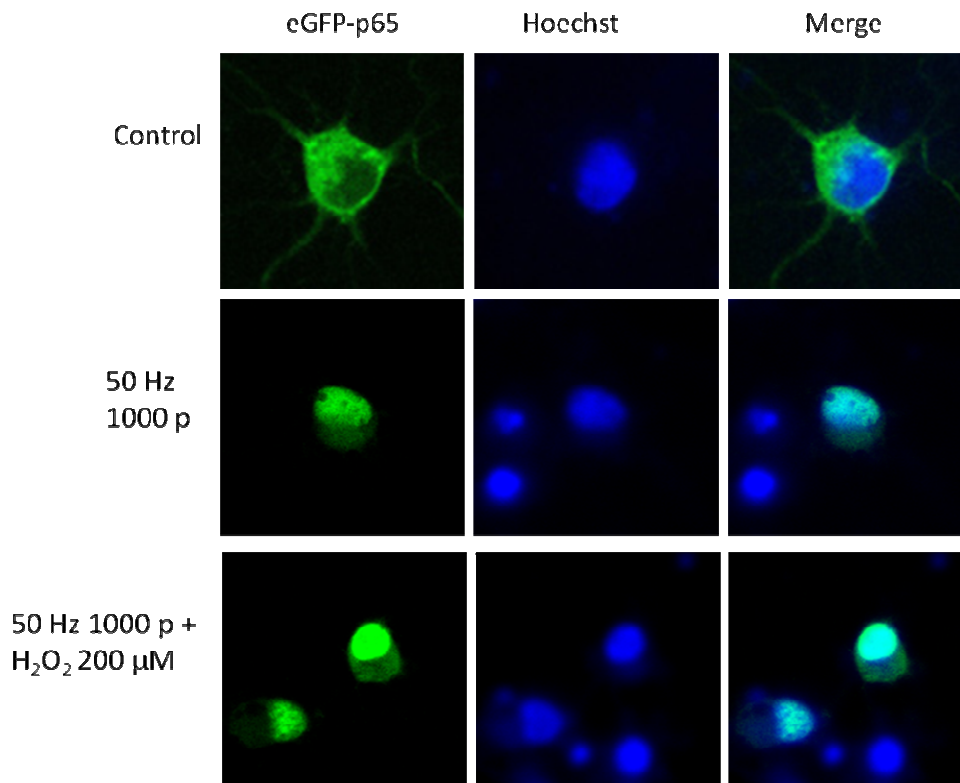


Figura 18. Traslocación de eGFP-p65 en neuronas hipocampales estimuladas con 50 Hz y 1000p en presencia o ausencia de H₂O₂.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF). Las neuronas fueron incubadas antes, durante y después del estímulo con H₂O₂ 200 μM. Se aprecia en verde eGFP-p65 y en azul, el marcador nuclear Hoechst. En la columna marcada como Merge se encuentran fusionadas las columnas anteriores. Se observa la presencia de eGFP-p65 en el núcleo en las células estimuladas eléctricamente y también en las células incubadas con peróxido, mientras que en la condición control no se aprecia la marca fluorescente en el núcleo perteneciente a p65 sino que esta se ubica en el citoplasma de la neurona hipocampal. Células fijadas 2.5 - 3 horas después del estímulo en PFA 4 %.

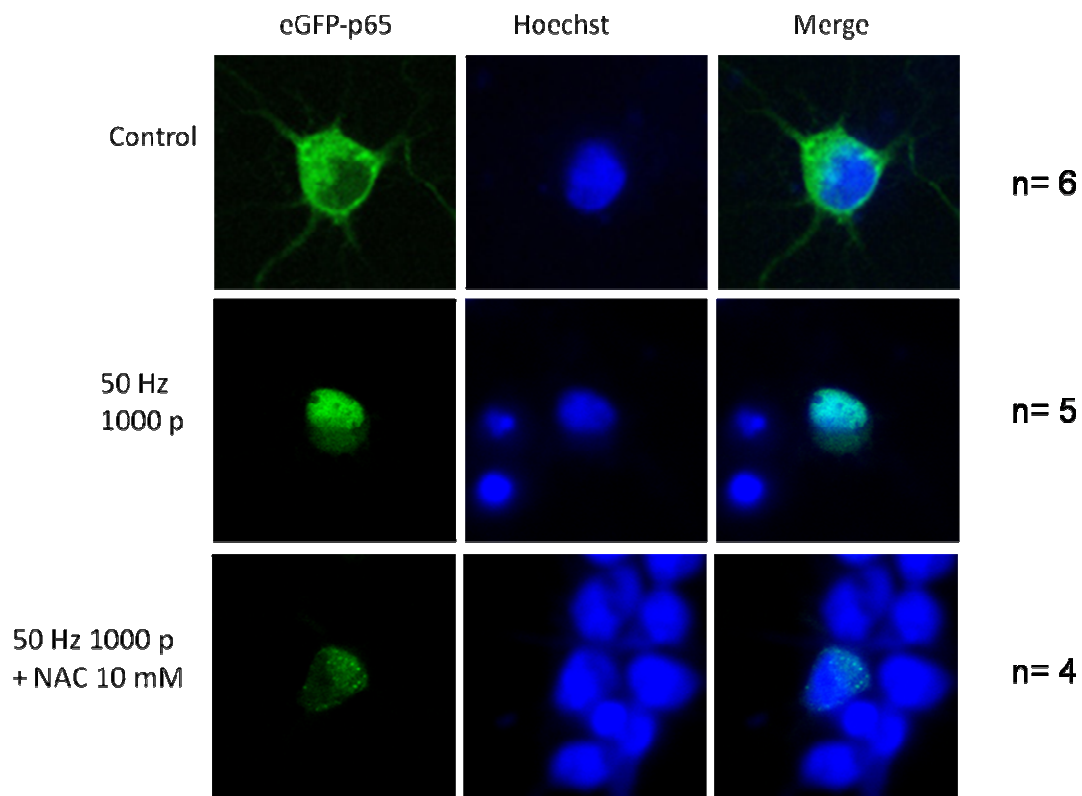


Figura 19. Traslocación de eGFP-p65 en neuronas hipocampales estimuladas con 50 Hz y 1000p en presencia o ausencia de NAC.

Neuronas hipocampales fueron estimuladas eléctricamente con 1000 pulsos a 50 Hz en medio de reposo (ACSF). Las neuronas fueron incubadas antes, durante y después del estímulo con NAC 10 mM. Se aprecia en verde eGFP-p65 y en azul, el marcador nuclear Hoechst. En la columna marcada como Merge se encuentran fusionadas las columnas anteriores. Se observa la presencia de eGFP-p65 en el núcleo en las células estimuladas eléctricamente, mientras que en la condición control y en las incubadas con NAC no se aprecia la marca fluorescente en el núcleo perteneciente a p65 sino que esta se ubica en el citoplasma de la neurona. El comportamiento es similar a la condición de estimulación con 4000 pulsos en presencia de NAC. Células fijadas 2.5 - 3 horas después del estímulo en PFA 4 %.

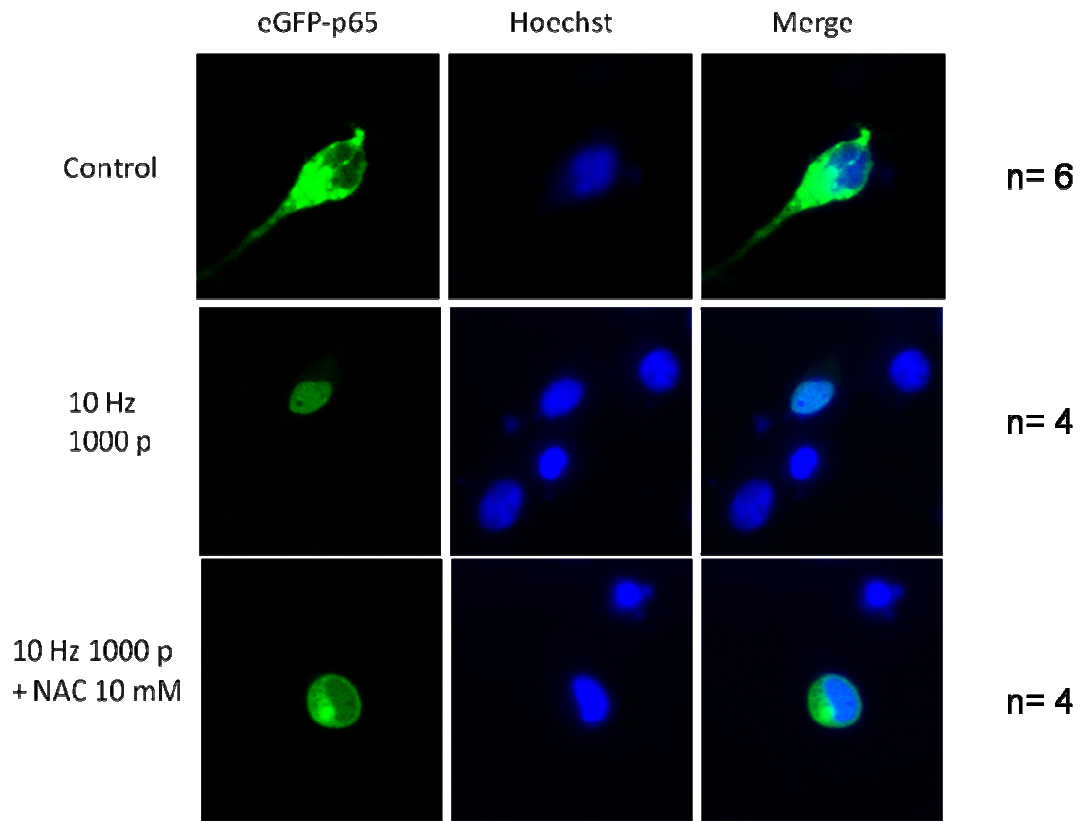


Figura 20. Traslocación de eGFP-p65 en neuronas hipocampales estimuladas con 10 Hz y 1000p en presencia o ausencia de NAC.

Neuronas hipocampales se estimularon eléctricamente con 1000 pulsos a 10 Hz en medio de reposo (ACSF). Las neuronas fueron incubadas antes, durante y después del estímulo con NAC 10 mM. Se aprecia en verde eGFP-p65 y en azul, el marcador nuclear Hoechst. En la columna marcada como Merge se encuentran fusionadas las columnas anteriores. Se observa la presencia de eGFP-p65 en el núcleo en las células estimuladas eléctricamente, mientras que en la condición control y en las incubadas con NAC no se aprecia la marca fluorescente en el núcleo perteneciente a p65 sino que esta se ubica en el citoplasma de la neurona. El comportamiento es parecido a la condición de estimulación con 1000 pulsos y 50 Hz en presencia de NAC. Células fijadas 2.5 - 3 horas después del estímulo en PFA 4 %.

6. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta memoria de título apuntan a demostrar la hipótesis de que un estímulo despolarizante induce la traslocación de p65, subunidad formadora del factor transcripcional NF κ B, efecto dependiente de calcio. De la misma forma, se confirma la participación de especies reactivas de oxígeno en el desplazamiento intracelular de p65. Primero se discutirá sobre los experimentos donde no fue posible obtener conclusiones, para luego abordar lo referido a la demostración de la hipótesis.

La medición de especies reactivas de oxígeno se realizó en un comienzo con la sonda DCHF-DA, pero esta sonda no solo es inespecífica para el reconocimiento de especies reactivas de oxígeno sino que además es fotosensible, por lo que los experimentos llevados a cabo en microscopía de epifluorescencia presentaban alteraciones en sus resultados, dado que la sonda presentaba un aumento no tan solo por la producción de ROS sino que también por la incidencia de la luz de emisión de la lámpara, lo que no permitía analizar los resultados de forma clara y obtener conclusiones al respecto.

De igual forma, la medición de calcio se comenzó realizando con la sonda Fluo-4 AM, pero se presentaron dos inconvenientes técnicos. Por un lado, dado que la medición se basa en un aumento en la fluorescencia emitida tras el estímulo, las células al ser observadas en el microscopio ya presentaban un aumento basal en la emisión, saturando la señal y perjudicando la medición. Por otro lado, no era posible una medición simultánea con el plasmidio HyperCyto, pues emiten fluorescencia a longitudes de onda muy cercanas. Se decidió, entonces, utilizar la sonda FuraRed AM la que emite a una longitud de onda distinta que el plasmidio y que además podía ser excitada a la misma longitud de onda, 488 nm. A esto hay que sumarle que FuraRed AM, disminuye su fluorescencia tras el aumento de calcio, por lo que no se presentaba el fenómeno de saturación de la señal.

Se postula dentro de los antecedentes la posibilidad de una conversación cruzada entre la liberación de calcio y la generación de ROS, este trabajo no permite aclarar en forma taxativa lo acontecido a este nivel, pero da indicios de la dependencia de calcio en la generación de ROS. Más experimentos son necesarios para comprobar que hay una respuesta de los mecanismos liberadores de calcio ante la variación en los niveles de

ROS en la célula. Respecto a esto último, nuevas mediciones, no mostradas, del aumento de calcio intracelular en presencia de DPI, un inhibidor general de las flavoproteínas generadoras de anión superóxido, pero en neuronas de mayor edad, 13 y 14 DIV, a las utilizadas en esta tesis, si muestran una disminución en el nivel de calcio, sobre todo no se aprecia el transitorio inicial y hay una completa alteración en relación al comportamiento control de la señal. Por ello, los resultados preliminares parecen apuntar a una regulación de los ROS sobre el aumento inicial de calcio en la célula.

La afirmación de la regulación de ROS por calcio se sustenta en los resultados que señalan la necesidad de tanto el ingreso de calcio desde el medio externo y, sobre todo, de la salida desde los reservorios reticulares, a través del canal de calcio receptor de ryanodina, para que haya generación de peróxido de hidrogeno. Estas conclusiones parten de la base temporal de los fenómenos observados en la Figura 2, la que nos muestra que la respuesta inicial de calcio no se corresponde con un aumento de ROS, un aumento posterior que si calza, al menos cronológicamente, con un segundo aumento de la señal de calcio. Aunque esta relación no logra ser explicada con los resultados experimentales obtenidos hasta el momento.

En particular, respecto a las curvas de liberación de calcio, la estimulación eléctrica empleada muestra un claro aumento transitorio de fluorescencia inmediato a la aplicación del estímulo, el origen del calcio generador de esta señal de respuesta rápida puede deducirse tras la observación del comportamiento de las células, tras el mismo estímulo, en presencia de un medio de reposo que no contiene calcio y al igual que con incubación con ryanodina, se observa como el aumento transitorio inicial desaparece. Esto habla de que la señal inicial se debe al fenómeno de la liberación de calcio inducida por calcio (CICR), que en estas dos situaciones experimentales se encuentra inhibida. Además estos experimentos dan lugar a un comportamiento particular de la señal de calcio, que incluye un aumento tardío de la fluorescencia, que también se observa tras preincubación con BAPTA-AM (10 μ M), por lo que llevó a pensar en un artificio del método más que en un aumento real, posterior y más lento, de la señal de calcio, no obstante, nuevos experimentos no permiten asegurar la inexistencia de esa respuesta tardía.

Las cinéticas correspondientes a cada curva de fluorescencia del plasmidio Hyper-Cito nos permiten comprender cuál sería el rol del calcio en la generación de ROS, hay que recalcar que, como se ve en la Figura 7, la respuesta del plasmidio es inmediata a la presencia del peróxido en el medio. En la situación de los estímulos en presencia de medio extracelular carente de calcio se ve una disminución tenue en la producción, menor a la esperada, pero que queda explicada tras la preincubación con ryanodina en concentraciones inhibitorias, donde la señal prácticamente desaparece en comparación al control. Esto habla de que el principal componente de la señal de calcio producida por el estímulo eléctrico que está involucrada en la generación de especies reactivas es el proveniente desde el retículo por el canal receptor de ryanodina. De acuerdo a esta afirmación se esperaría que la preincubación con BAPTA-AM también disminuyera la señal generada por la síntesis de ROS. Esta falta de efecto puede explicarse en términos de haber usado una concentración muy baja del quelante en relación al calcio liberado. Nuevos experimentos realizados (no mostrados) para aclarar este punto muestran la certeza de este raciocinio, pues la incubación de concentraciones de al menos 10 veces más que las usadas en este trabajo (10 μ M), sí logran una disminución en la señal de producción de ROS.

Respecto a la inmunocitoquímica llevada a cabo para el reconocimiento de p65 endógeno, la marca obtenida con el anticuerpo a disposición en el laboratorio no satisfacía una correcta toma de imágenes y generaba dificultades extras al análisis correspondiente, por su debilidad en la fluorescencia obtenida en el microscopio confocal, por ello se prefirió utilizar el plasmidio, previamente probado en el laboratorio, que otorgaba una marca fluorescente que facilitaba la toma de imágenes y el análisis subsiguiente.

En este trabajo se confirma que, al igual que en varios tipos celulares, en neuronas de cultivo hipocampales la actividad de NF κ B se encuentra regulada por los niveles de ROS y de calcio en el medio intracelular. Los experimentos anteriormente expuestos hablan, más específicamente, de cómo antioxidantes generales como N-acetilcisteína e inhibidores de la liberación de calcio, como ryanodina, atenúan la traslocación de p65 desde el citoplasma hacia el núcleo celular, lo que permite agregar una posible ruta de modulación de la actividad génica de las neuronas, que involucre a estos componentes. Los resultados, analizados tanto cualitativa como cuantitativamente, muestran una clara

tendencia a que la incubación con NAC, antes, durante y después del estímulo impiden que p65 viaje al núcleo.

Como se argumenta en los antecedentes, NFκB es regulado por las especies reactivas de oxígeno, si bien esta regulación puede ser tanto positiva como negativa, dependiendo del contexto y el tipo celular estudiado, por ello estos resultados hablan de una activación en neuronas hipocampales con un estímulo despolarizante de origen eléctrico. Lo mismo ocurre con la señalización por calcio, pues, como también se comentó en la introducción, este ion alcalino-térreo, también regula al factor transcripcional, en forma positiva. Interesante aspecto de estos resultados, es el hecho que demuestran esta conocida regulación en neuronas, donde si bien se conocía el rol de NFκB, su regulación en la actividad neuronal no había sido descrita en detalle.

Al reunir todos los resultados presentados en este trabajo es posible formular una línea de funcionamiento que involucre a cada uno de las moléculas estudiadas. De acuerdo a esto, tenemos que NFκB depende de calcio y ROS y que para la generación de ROS es necesario la liberación de calcio reticular, en mayor proporción que la entrada de calcio proveniente del medio externo. Esta información se puede graficar como se muestra en la Figura 20, donde se establece una línea directa entre el calcio proveniente del canal receptor de ryanodina, el aumento de ROS y la subsiguiente activación de NFκB. También se muestra la participación menor del calcio externo en la posterior activación de la vía, a través del CICR, ya que según señalan los resultados de estimulación en ausencia de calcio externo, la relevancia esperada en el aumento de la liberación de calcio reticular por ingreso de calcio externo, no es tal, ya que, en estas condiciones sólo hubo una pequeña disminución en la producción de ROS y tan solo la incubación con ryanodina inhibió de forma total.

De acuerdo a estos antecedentes surge entonces la duda sobre el mecanismo de activación del canal de calcio receptor de ryanodina tras el estímulo eléctrico. Este estímulo provoca la despolarización de la neurona tras la apertura de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, lo que permitiría la activación de canales de calcio tipo L que, según se ha reportado, se encuentran conectados de forma física con el canal de calcio receptor de ryanodina tipo 2, lo que permitiría su apertura tras el estímulo, con la consiguiente liberación de calcio y posterior aumento en la generación de ROS [52].

También es necesario aclarar cuáles son los protagonistas del resto de la vía transduccional que involucra a las dos moléculas mencionadas, para llegar a la fosforilación de I κ B ya sea si es exclusivamente por la vía clásica, también llamada canónica, que es mediada por IKK y que es la estudiada en este trabajo y en el laboratorio, o si también hay participación de la otra ruta de activación de NF κ B, la vía no canónica, la cual involucra a otras quinasas como NIK y a otras subunidades de NF κ B como p52. Trabajo adicional también debe ser destinado a ver cuáles son los blancos a nivel genómico de p65, y si efectivamente se les ha involucrado en los mecanismos de memoria y aprendizaje.

Dentro de los genes blancos reportados, se cuentan participantes de mecanismos antioxidantes como las superóxido dismutasas, moléculas relacionadas con la homeostasis del calcio como los receptores de NMDA, o el canal dependiente de voltaje o factores celulares como BDNF. Sería interesante profundizar si la activación de NF κ B por estímulo eléctrico conduce a un aumento en la transcripción de estos genes o si este tipo de estímulo genera una activación génica distinta a la reportada clásicamente para este factor transcripcional, para ello estudios de micro-arreglos y también de bioinformática podrían dar luces de nuevas vías activadas o de una activación diferencial de acuerdo al tipo de estímulo y a la concentración de calcio y ROS en el citoplasma.

Así, nuevos blancos potenciales relacionados, con el fenómeno de plasticidad neuronal, y para los cuales no ha sido reportado regulación directa por NF κ B son PKM ζ , una proteína altamente involucrada en plasticidad neuronal y que presenta sitios de unión en la zona promotora del gen para NF κ B, y DMT1, proteína con funciones transportadoras de metales divalentes, participante, también en funciones neuronales complejas. Una mayor profundización en el estudio de ésta u otras vías relacionadas con mecanismos de la actividad neuronal, claves en los procesos de memoria y aprendizaje, es el paso necesario para lograr un mayor entendimiento en las intrincadas rutas cerebrales.

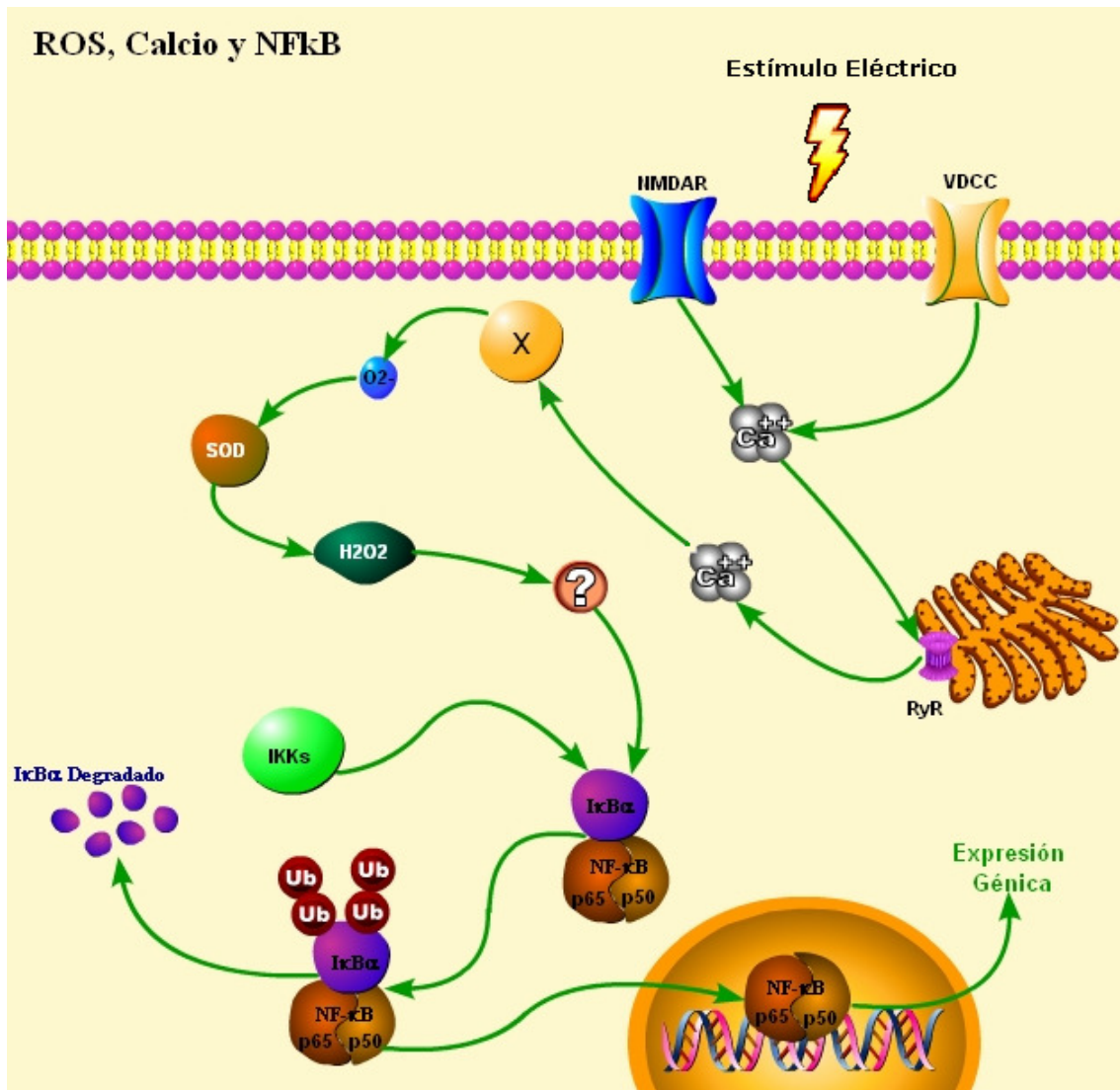


Figura 21. Mecanismo propuesto en la regulación de NFκB por ROS y calcio.

El aumento de calcio intracelular ya sea por la entrada de calcio desde el medio extracelular o, principalmente, la salida de calcio desde el retículo, a través del canal de calcio receptor de ryanodina, genera la producción por parte de alguna de sus fuentes intracelulares de O₂⁻, el cual se convertirá a H₂O₂ mediante catálisis de la enzima Superóxido Dismutasa, lo que repercutirá en una activación y posterior traslocación de NFκB al núcleo neuronal. Con X se marca potenciales productores de superóxido sensibles a calcio como NADPH oxidasa o la mitocondria y con el signo de interrogación (?) se señala el desconocimiento existente en la forma en que el H₂O₂ ejerce su efecto sobre NFκB en este sistema, pudiendo ser una acción mediada por otros factores o por modificación directa.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo, las respuestas celulares descritas son generadas por estimulación eléctrica de campo a diferentes números de pulsos, 1000 y 4000 pulsos de 1 ms cada uno, tanto en estímulos de alta frecuencia (50 Hz) y de baja frecuencia (10 Hz). Las conclusiones son las siguientes:

El estímulo eléctrico de campo genera un aumento de la concentración de calcio citoplasmática dependiente de la entrada de calcio extracelular así como de la salida desde el retículo endoplasmático a través del canal de calcio-receptor de ryanodina.

El estímulo eléctrico de campo aumenta la producción de peróxido de hidrógeno intracelular, a través de un mecanismo dependiente del aumento de calcio citoplasmático desde el retículo endoplasmático mediado por el canal de calcio-receptor de ryanodina.

El estímulo eléctrico de campo aumenta la traslocación al núcleo de la subunidad p65 de NFκB fusionada a una eGFP, respuesta dependiente de especies reactivas de oxígeno y de la salida de calcio del retículo endoplasmático mediada por el receptor de ryanodina.

Como conclusión general, tanto el aumento de calcio como la generación de especies reactivas de oxígeno, inducidos por estimulación eléctrica fisiológica de neuronas de hipocampo, están involucrados en la activación de la traslocación de NFκB (p65), factor de transcripción que participa en diversos procesos neuronales.

ANEXO RESULTADOS

Medición de la razón GSH/GSSG

El par glutatión reducido y oxidado tienen una activa participación en la regulación de las condiciones oxido-reductoras presentes en la célula, como se observa en la Figura 24, dentro de sus roles está como cofactor en la degradación del peróxido de hidrógeno y está relacionada con la actividad de la NADPH oxidasa [7], por ello la proporción existente entre GSH y GSSG es un importante parámetro del estado oxidativo de la célula en general y de la neurona en particular.

Con la finalidad de conocer el estado oxidativo de las células tras el estímulo eléctrico se procedió a medir la razón de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) de las neuronas corticales estimuladas.

La técnica utilizada presentó problemas de sensibilidad para evaluar los niveles de GSSG. La Figura 25 representa los resultados de dos experimentos en duplicado aunque con una alta variación. Los resultados no sugieren variaciones del estado oxidativo de las neuronas estimuladas con respecto a las células control tanto a un tiempo fijo de lisis post-estímulo como ante el mismo estímulo. De este modo no se logra apreciar una diferencia entre células controles y estimuladas.

Respecto a diferencias temporales, la medición del par GSH/GSSG no permitió obtener conclusiones en este aspecto, ya que los resultados no presentaron reproducibilidad entre los distintos experimentos. Dentro de las razones que se pueden argüir para esta situación se cuenta que la medición de GSH es una medición indirecta, obtenida de la diferencia entre el glutatión total (GSH+ GSSG) y el glutatión oxidado, por lo que era necesario obtener estos dos parámetros para llegar a resultados válidos. En los distintos experimentos, la medición del primero no mostró mayores dificultades, ahora la medición del segundo es la responsable de las dificultades experimentadas, ya que en muchas ocasiones llegaba a niveles menores o muy cercanos a los detectables por el equipo espectrofotométrico utilizado, lo que provocaba disparidad en los datos obtenidos a este nivel, siendo necesaria una mayor sensibilidad instrumental. Las posibilidades para subsanar este problema, radicaban en aumentar la cantidad de

neuronas por experimento, pero a las nuevas concentraciones de células probadas (el doble que las iniciales) se siguió teniendo el mismo problema de sensibilidad, por lo que el costo-beneficio de solucionar el problema por esta vía era totalmente inviable. La otra posibilidad radicaba en el cambio a un equipo más sensible, dentro de las posibilidades descritas en la literatura, se presentaba el HPLC asociado a fluorímetros y espectroscopía [53]. No obstante, dado el carácter de complementación de estos experimentos se prefirió emplear el tiempo en los experimentos centrales para la resolución de esta tesis.

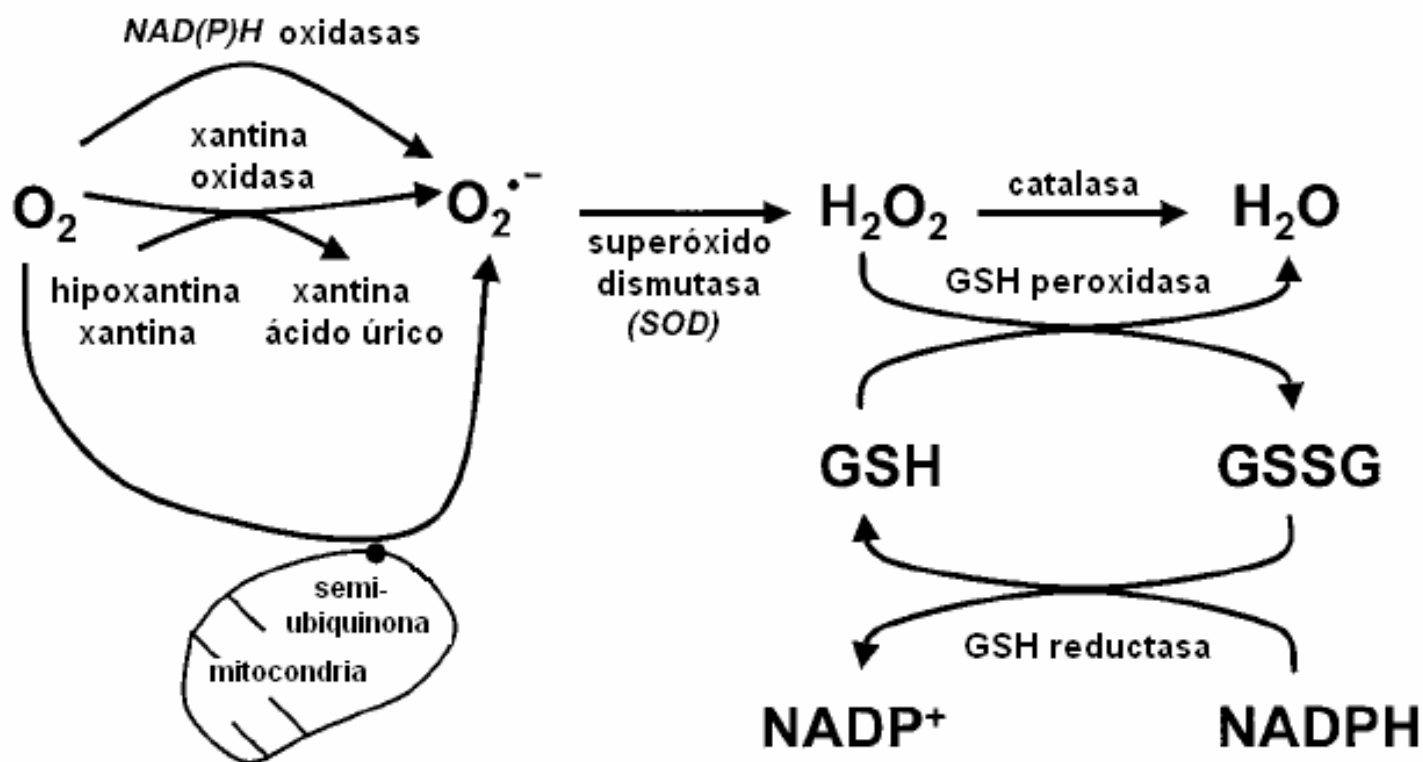


Figura 22. Participación del par GSH: GSSG en el control de los ROS. Se ilustra el rol clave en la homeostasis oxidativa de la célula del par GSH: GSSG en el control de ROS. El esquema muestra que el GSH actúa como cofactor de la enzima Glutatión peroxidasa en la degradación de H_2O_2 para originar H_2O , en la reacción el GSH se oxida a GSSG. La regeneración del poder reductor de GSH depende de la actividad de la enzima Glutatión Reductasa que utiliza como cofactor NADPH. Modificado de Drogë, 2002.

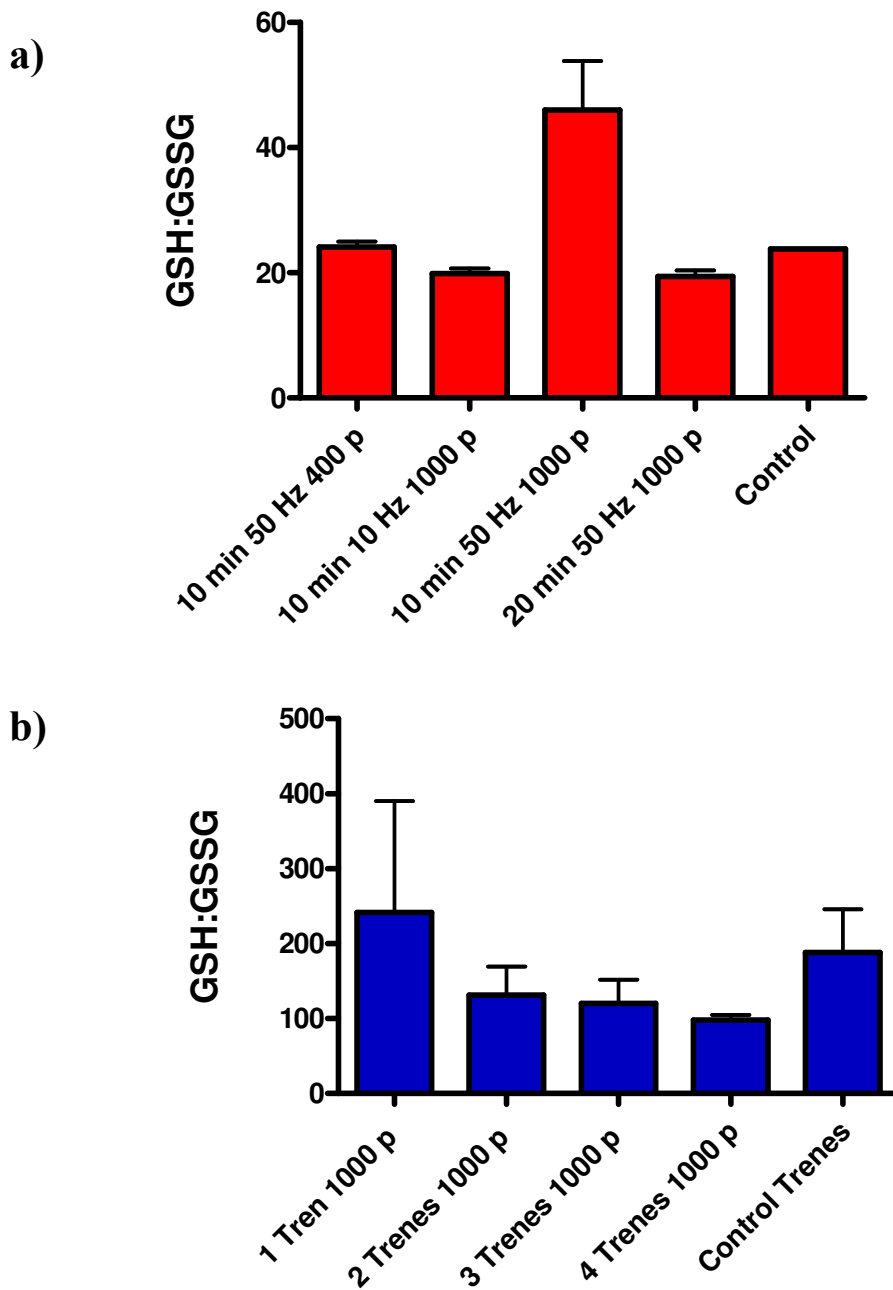


Figura 23. Medición de la razón GSH:GSSG.

Se muestra la razón glutatión reducido / oxidado en extractos de células corticales de 7-9 DIV estimuladas eléctricamente. La razón GSH:GSSG da cuenta del estado oxidativo de la célula. Las figuras representan el promedio de dos experimentos hechos en duplicado **a)** Medición en lisado de células corticales expuestas a distintos estímulos eléctricos a tiempos de lisis post estímulo eléctrico de 10 minutos para tres condiciones de estimulación (1000 pulsos (p) a 10 Hz y 400 p y 1000 p a 50 Hz) y de 20 minutos para 1000 pulsos a 50 Hz **b)** Razón GSH:GSSG en lisados 10 minutos post estímulo a distintas cantidad de trenes de 1000 pulsos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berridge, M.J., *Neuronal calcium signaling*. Neuron, 1998. **21**(1): p. 13-26.
2. Hongpaisan, J., C.A. Winters, and S.B. Andrews, *Strong calcium entry activates mitochondrial superoxide generation, upregulating kinase signaling in hippocampal neurons*. J Neurosci, 2004. **24**(48): p. 10878-87.
3. Yan, Y., et al., *Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling*. Acta Pharmacol Sin, 2006. **27**(7): p. 821-6.
4. Mattson, M.P. and S. Camandola, *NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders*. J Clin Invest, 2001. **107**(3): p. 247-54.
5. Lilienbaum, A. and A. Israel, *From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(8): p. 2680-98.
6. Gloire, G., S. Legrand-Poels, and J. Piette, *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1493-505.
7. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
8. Deby, C. and R. Goutier, *New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases*. Biochem Pharmacol, 1990. **39**(3): p. 399-405.
9. Murad, F., et al., *The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction pathway in vascular smooth muscle preparations and other tissues*. Jpn J Pharmacol, 1992. **58 Suppl 2**: p. 150P-157P.
10. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium*. Lancet, 1987. **2**(8567): p. 1057-8.
11. Bae, Y.S., et al., *Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 217-21.
12. Suzukawa, K., et al., *Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13175-8.
13. Denu, J.M. and K.G. Tanner, *Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation*. Biochemistry, 1998. **37**(16): p. 5633-42.
14. Iino, M., *Ca²⁺-dependent inositol 1,4,5-trisphosphate and nitric oxide signaling in cerebellar neurons*. J Pharmacol Sci, 2006. **100**(5): p. 538-44.
15. Dolmetsch, R.E., et al., *Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 855-8.
16. Dolmetsch, R.E., K. Xu, and R.S. Lewis, *Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression*. Nature, 1998. **392**(6679): p. 933-6.
17. Kamsler, A. and M. Segal, *Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity*. J Neurosci, 2003. **23**(1): p. 269-76.
18. Kishida, K.T. and E. Klann, *Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(2): p. 233-44.
19. Kishida, K.T., et al., *NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1*. J Neurochem, 2005. **94**(2): p. 299-306.

20. Chakraborti, T., et al., *Oxidant, mitochondria and calcium: an overview*. Cell Signal, 1999. **11**(2): p. 77-85.
21. Hidalgo, C., P. Donoso, and M.A. Carrasco, *The ryanodine receptors Ca²⁺ release channels: cellular redox sensors?* IUBMB Life, 2005. **57**(4-5): p. 315-22.
22. Bultynck, G., et al., *Calcineurin and intracellular Ca²⁺-release channels: regulation or association?* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **311**(4): p. 1181-93.
23. Aizenman, E., *Modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by hydroxyl radicals in rat cortical neurons in vitro*. Neurosci Lett, 1995. **189**(1): p. 57-9.
24. Kourie, J.I., *Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): p. C1-24.
25. Long, L.H., et al., *Differential Effects of Methionine and Cysteine Oxidation on [Ca(2+)] (i) in Cultured Hippocampal Neurons*. Cell Mol Neurobiol, 2008.
26. Finkel, T., *Oxygen radicals and signaling*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 248-53.
27. Kim-Park, W.K., et al., *Activation of the neutrophil respiratory burst requires both intracellular and extracellular calcium*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **832**: p. 394-404.
28. Shin, K., H. Hayasawa, and B. Lonnerdal, *Mutations affecting the calcium-binding site of myeloperoxidase and lactoperoxidase*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(4): p. 1024-9.
29. Tan, S., et al., *The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death*. J Cell Biol, 1998. **141**(6): p. 1423-32.
30. Keller, J.N., et al., *Increased sensitivity to mitochondrial toxin-induced apoptosis in neural cells expressing mutant presenilin-1 is linked to perturbed calcium homeostasis and enhanced oxyradical production*. J Neurosci, 1998. **18**(12): p. 4439-50.
31. Gordeeva, A.V., R.A. Zvyagilskaya, and Y.A. Labas, *Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells*. Biochemistry (Mosc), 2003. **68**(10): p. 1077-80.
32. Hatanaka, Y., et al., *A role of peroxides in Ca²⁺ ionophore-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **227**(2): p. 513-8.
33. Yermolaieva, O., et al., *Reactive oxygen species and nitric oxide mediate plasticity of neuronal calcium signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 448-53.
34. Vercesi, A.E., et al., *The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition*. Biosci Rep, 1997. **17**(1): p. 43-52.
35. Lee, J.E., et al., *Hydrogen peroxide triggers the proteolytic cleavage and the inactivation of calcineurin*. J Neurochem, 2007. **100**(6): p. 1703-12.
36. Hayakawa, M., et al., *Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation*. Embo J, 2003. **22**(13): p. 3356-66.
37. Anderson, M.T., et al., *Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11527-31.
38. Wu, J.T. and J.G. Kral, *The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy*. J Surg Res, 2005. **123**(1): p. 158-69.
39. Pannaccione, A., et al., *Nuclear factor-kappaB activation by reactive oxygen species mediates voltage-gated K⁺ current enhancement by neurotoxic beta-*

- amyloid peptides in nerve growth factor-differentiated PC-12 cells and hippocampal neurons.* J Neurochem, 2005. **94**(3): p. 572-86.
40. Memet, S., *NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease.* Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1180-95.
 41. Meffert, M.K. and D. Baltimore, *Physiological functions for brain NF-kappaB.* Trends Neurosci, 2005. **28**(1): p. 37-43.
 42. Kaltschmidt, B., D. Widera, and C. Kaltschmidt, *Signaling via NF-kappaB in the nervous system.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1745**(3): p. 287-99.
 43. Storz, P., H. Doppler, and A. Toker, *Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 2614-26.
 44. Moodie, F.M., et al., *Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells.* Faseb J, 2004. **18**(15): p. 1897-9.
 45. Bernal-Mizrachi, E., et al., *Activation of nuclear factor-kappaB by depolarization and Ca(2+) influx in MIN6 insulinoma cells.* Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S484-8.
 46. Valdes, J.A., et al., *NF-kappaB activation by depolarization of skeletal muscle cells depends on ryanodine and IP3 receptor-mediated calcium signals.* Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(5): p. C1960-70.
 47. Caceres, A., et al., *MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture.* Brain Res, 1984. **315**(2): p. 314-8.
 48. Alvarez, A.R., et al., *Activation of the neuronal c-Abl tyrosine kinase by amyloid-beta-peptide and reactive oxygen species.* Neurobiol Dis, 2004. **17**(2): p. 326-36.
 49. Hartree, E.F., *Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.* Anal Biochem, 1972. **48**(2): p. 422-7.
 50. Kemmerling, U., et al., *Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons.* Cell Calcium, 2007. **41**(5): p. 491-502.
 51. Zafarullah, M., et al., *Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions.* Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(1): p. 6-20.
 52. Kim, S., et al., *Functional interaction of neuronal Cav1.3 L-type calcium channel with ryanodine receptor type 2 in the rat hippocampus.* J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32877-89.
 53. Giustarini, D., et al., *An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood.* Free Radic Biol Med, 2003. **35**(11): p. 1365-72.