

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y
NRF2 EN LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INDUCIDA POR
BDNF EN NEURONAS HIPOCAMPALES***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica
Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al
Título de Bioquímico por:

BÁRBARA ALEXANDRA BRUNA JARA

Directoras de Tesis: Dra. Andrea Paula-Lima
Dra. Tatiana Adasme

Santiago-CHILE

Marzo 2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

BÁRBARA ALEXANDRA BRUNA JARA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Directoras de Tesis:

Dra. Andrea Paula-Lima _____

Dra. Tatiana Adasme _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Maria Antonieta Valenzuela _____

Dra. Alejandra Alvarez _____

Dra. Jenny Fiedler _____

AGRADECIMIENTOS

A mi directoras de Tesis, Dra. Andrea Paula-Lima y Dra. Tatiana Adasme , por guiarme desde mi comienzo en el laboratorio, por su constante apoyo, orientación, oportunidades y confianza en el trabajo realizado.

A la Dra. Cecilia Hidalgo, por permitirme trabajar en su equipo y consejos para perfeccionarme como profesional.

A todos los integrantes del laboratorio de Transducción de Señales Medidas por Calcio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile entre ellos; José Galaz, Luis Montecinos, Dr. Genaro Barrientos, Dra. Paola Lanos, Dr. Jorge Hidalgo, Pablo Veloso, Daniela Ponce, Jamileth More, Dra. Carol San Martin. Por los buenos momentos, simpatía , ayuda y consejos brindados.

A la comisión revisora, Dra. Alejandra Alvarez, Dra. Jenny Fiedler y Dra. Maria Antonieta Valenzuela, por sus aportes y exigencias que me permitieron mejorar este trabajo de tesis.

A mis padres Jorge Bruna y Erica Jara y hermana Beatriz por brindarme su amor y constante apoyo durante todos estos años. Y por enseñarme a nunca rendirme en la vida.

A Pedro Lobos, mi novio, compañero y amigo por su amor, apoyo incondicional y cada momento vivido, único en mi vida.

A mis amigos; Carla Luengo, Constanza Alanis, Darlyng Pontigo, Verónica Torres, Macarena Díaz, Isidro Lagos, Felipe Muñoz. Por su buena y sincera amistad, los buenos momentos, charlas de la vida y constante apoyo durante todo este periodo.

ABREVIATURAS

4-CMC: 4-Cloro-metilcresol

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AKT: Proteína quinasa B

A β Os: Oligómeros de péptido β -amiloide

BAPTA-AM: Ácido 1,2-Bis(2-aminofenoxy) etano-N, N, N', N'-tetraacetico-acetoximetilester.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BSA: Albumina de suero bovino

Ca²⁺: Ión calcio

CaN: Calcineurina

CICR: Liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta AMPc

DIV: Días *in vitro*

EA: Enfermedad de Alzheimer

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

Gpsc: Gp-scrambled

GPXs: Glutathionperoxidasas

GSH: Glutathión

GST: Glutathion S- transferasa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HO-1: hemoxigenasa-1

IP₃R: Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato

LTD: Depresión a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

MAPK: Quinasas activadas por mitógenos

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NAC: N-acetil-cisteína

NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleotido-Fosfato

NFAT: Factor nuclear de células T activadas

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NMDAR: Receptor de N-metil-D-aspartato

NO: Óxido nítrico

NOX: NADPH-Oxidasa
NOS: Óxido nítrico sintasa
NQO1: NADPH quinona oxidoreductasa-1
Nfr2: Factor nuclear derivado eritroide 2
NT-3: Neurotrofina 3
NT4/5: Neurotrofina 4/5
 O_2^- : Anión superóxido
HO·: Radical hidroxilo
ONOO⁻: Peroxinitrito
P75 NTR: Receptor de neurotrofina p75
PBS: Amortiguador salino de fosfatos
PI3K: Quinasa del fosfatidilinositol 3
PKC: Proteína quinasa C
PLCγ: Fosfolipasa Cγ
PRXs: Peroxidasa
RE: Retículo endoplasmático
ROI: Región de interés
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
ROS: Especies reactivas de oxígeno
Rya: Ryanodina
RyR: Receptor de ryanodina
RyR (1, 2 o 3): Isoforma 1, 2 o 3 del Receptor de ryanodina
SH: Grupos tioles
SOD: Superóxidodismutasa
TrkB: Receptor de tropomiosina quinasa B
Trxs: Tioredoxinas
VDCC: Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
XO: Xantina oxidasa

INDICE

ABREVIATURAS	i
INDICE	iii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1. FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF)	6
2. SEÑALES DE CALCIO Y RECEPTOR DE RYANODINA.....	10
3. RECEPTOR DE RYANODINA Y PLASTICIDAD SINÁPTICA	12
4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO/NITRÓGENO.....	13
5. ROS/RNS Y SU ROL EN PLASTICIDAD SINÁPTICA.....	15
6. VÍA DE SEÑALIZACIÓN Nrf2-KEAP1.....	17
7. PARTICIPACIÓN DE Nrf2 EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	19
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
HIPOTESIS:	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	32
1. BDNF promueve la generación de ROS por un mecanismo dependiente de Ca ²⁺	32
2. La generación de ROS inducida por BDNF requiere de la actividad del Receptor de Ryanodina.....	33
3. La generación de H ₂ O ₂ inducida por BDNF requiere de las ROS provenientes de la NOS y NOX2.....	35
4. Las señales de calcio mediadas por RyR requieren de la actividad de NOS y NOX2.	38
5. Los incrementos en la expresión de RyR2 inducidos por BDNF son regulados por ROS.....	41
6. Los incrementos en el contenido de proteína RyR2 inducidos por BDNF requieren de la actividad de la NOS.....	42

7. El incremento en el contenido de proteína RyR2 inducido por BDNF requiere de la actividad de la NOX2.....	44
8. BDNF induce la translocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2.....	45
9. La translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF, requiere de las señales de calcio mediadas por RyR y de la generación de ROS.	49
10. BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo independiente de la vía ERK.	51
11. La vía de PI3K participa en la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF.	52
DISCUSIÓN.....	54
RESUMEN DE RESULTADOS.....	61
CONCLUSIONES.....	61
ESQUEMA FINAL.....	62
REFERENCIAS.....	63

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Vía de transducción de señales río abajo de BDNF/TrkB.....	8
Figura 2: Efecto de la modificación redox sobre los grupos tioles en la dependencia a calcio de los canales RyR.....	12
Figura 3: Dominios estructurales de Nrf2.....	18
Tabla 1: Secuencia de los partidores utilizados para detección de RyR2 y β -actina.....	28
Figura 4. El influjo de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA es requerido para la generación de H_2O_2 inducida por BDNF.....	33
Figura 5. La Liberación de calcio mediada por RyR es requerida para generación de H_2O_2 inducida por BDNF.....	34
Figura 6. La pre-incubación con L-NAME previene la producción de H_2O_2 inducida por BDNF.....	36
Figura 7. La NOX2 participa de la generación de H_2O_2 inducida por BDNF.....	37
Figura 8. Las señales de calcio mediadas por RyR requieren de la actividad de la NOS.....	39
Figura 9. La actividad de la NOX2 es requerida para la liberación de calcio mediada por RyR.....	40
Figura 10. NAC previene los incrementos en los niveles del transcrito y de la proteína de RyR2, inducidos por BDNF.....	42
Figura 11. Los incrementos en los niveles de transcrito y de la proteína RyR2 inducidos por BDNF, requieren de la actividad de la NOS.....	43
Figura 12. El incremento en el contenido de proteína RyR2 inducido por BDNF requiere de la actividad de la NOX2.....	45
Figura 13. BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo.....	47
Figura 14. BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo en células neuronales.....	48
Figura 15. BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo dependiente de la producción de ROS y la actividad de RyR.....	50

Figura 16. La vía de las ERK no participa en la señalización intracelular inducida por BDNF que promueve a translocación de Nrf2 al núcleo.....52

Figura 17. La PI3K participa en la señalización intracelular inducida por BDNF que promueve a translocación de Nrf2 al núcleo en neuronas hipocampales.....53

Figura 18: Conclusión participación de las ROS en la vía de señalización inducida por BDNF en neuronas hipocampales.....62

RESUMEN

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es clave para la plasticidad sináptica hipocampal y la memoria espacial. La unión de BDNF a su receptor TrkB activa cascadas de señalización intracelular que involucran la liberación de calcio desde reservorios intracelulares mediada por los receptores de IP3 (IP3R) y los receptores de Ryanodina (RyR). Los RyR cumplen un papel muy importante en la señalización mediada por BDNF, ya que su actividad es esencial para el remodelamiento de las espinas dendríticas e inducción de la expresión de la isoforma RyR2 inducida por BDNF. Recientemente hemos observado que BDNF induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), estas podrían promover la actividad de RyR y la activación de factores transcripcionales dependientes de ROS, que modularían los incrementos en el contenido de RyR2 inducido por BDNF. Nrf2 es un factor transcripcional que se activa principalmente por incrementos en las ROS, sin embargo, algunos estudios proponen que es posiblemente la conversación cruzada entre las señales de calcio y las ROS, la que permite la activación de Nrf2. De acuerdo a estos antecedentes, se propuso estudiar si las especies reactivas de oxígeno generadas tras la unión de BDNF a su receptor, inducen la translocación de Nrf2 al núcleo y el incremento en la expresión de RyR2 en cultivo primario de neuronas hipocampales.

Los resultados sugieren que la adición de BDNF (50 ng/ml) aumenta la producción de H₂O₂ citoplasmático, que es dependiente de la entrada de Ca²⁺ a través de los receptores N-metil D-aspartato (NMDA) y la amplificación de las señales de Ca²⁺ mediadas por RyR, como también de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) y de la NADPH oxidasa 2 (NOX2). La producción de ROS es necesaria para los incrementos en la expresión de RyR2 inducidos por BDNF, ya que es prevenida por el pretratamiento con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) y los inhibidores de la NOX y NOS. Además, la incubación con BDNF induce la translocación al núcleo de Nrf2 luego de 6 horas de exposición y esta translocación depende de la producción de ROS y de la liberación de calcio mediada por RyR. Se evaluó también la participación de proteínas quinasas pertenecientes a la cascada de

señalización río abajo de BDNF, en la translocación de Nrf2 al núcleo. Para ello se bloqueó la activación de las ERK y PI3K, utilizando U0126 y LY294002, respectivamente. De acuerdo a esto, se comprobó la participación de la PI3K, pero no de las ERKs en la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF.

Nuestro trabajo propone que la incubación de los cultivos hipocampales con BDNF, genera señales de Ca^{2+} que dependen de la actividad NMDAR y RyR, que activan las enzimas NOS y NOX2, las cuales inducen incrementos en los niveles citoplasmáticos de ROS. Éstas, por su vez, participan en la señalización inducida por BDNF, modulando la expresión de RyR2 e induciendo la translocación al núcleo de Nrf2. Además, la actividad del RyR modula la generación de ROS y la translocación de Nrf2 al núcleo inducidos por BDNF. En conjunto, nuestros datos sugieren que las ROS, además de las señales de calcio, son importantes en la plasticidad sináptica inducida por BDNF.

ABSTRACT

PARTICIPATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND NRF2 IN INTRACELLULAR SIGNALLING INDUCED BY BDNF IN HIPPOCAMPAL NEURONS

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is key to hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. The binding of BDNF to its TrkB receptor activates intracellular signaling cascades that involve the release of calcium from intracellular reservoirs mediated by the IP3 receptors (IP3R) and Ryanodine receptors (RyR). RyR plays a very important role in BDNF-mediated signaling, since its activity is essential for both the remodeling of dendritic spines and the increases in the expression of RyR2 induced by BDNF. We have recently observed that BDNF induces reactive oxygen species (ROS) generation, which could activate RyR activity and ROS-dependent transcriptional factors, and thus might modulate the increments in the RyR2 content induced by BDNF. Nrf2 is a transcriptional factor that is mainly activated by increases in ROS, however some studies suggest that actually is the cross-talk between the Ca^{2+} and ROS signals that allow its activation. According to these antecedents, we studied whether the ROS generated in response to the binding of BDNF to its receptor, induce nuclear translocation of Nrf2 and increase RyR2 expression in primary cultures of hippocampal neurons.

Our results suggest that the incubation with BDNF (50 ng/ml) increases neuronal cytoplasmic H_2O_2 production, which is dependent on the entry of Ca^{2+} through NMDA receptors and the amplification of Ca^{2+} signals mediated by RyR, as well as of NOS and NOX2 activity. ROS production was also necessary for the increases in RyR2 expression induced by BDNF, as this was prevented by pre-treatment with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) and specific NOX and NOS inhibitors. In addition, the incubation with BDNF induced Nrf2 translocation to the nucleus after 6 horas, and this translocation was dependent of ROS production and of RyR-mediated Ca^{2+} release. We also evaluated the participation of protein kinases, which might be involved in the translocation of Nrf2 to the nucleus downstream of BDNF signaling. For this, we used the inhibitors U0126 and

LY294002 for ERK and PI3K, respectively. In accord, results indicated that ERK's pathway does not participate, whereas the PI3K pathway does participate in the translocation of Nrf2 to the nucleus induced by BDNF.

Our work proposes that the incubation of hippocampal cultures with BDNF generates Ca^{2+} signals that depend on the NMDAR and RyR activity, which activate the NOS and NOX2 enzymes, which induces increases in the cytoplasmic ROS levels. ROS thus participate in the signaling pathway induced by BDNF, by modulating RyR2 expression and inducing Nrf2 translocation to the nucleus. In addition, we observed that the activity of RyR modulates ROS generation and Nrf2 translocation induced by BDNF. Overall, our data suggest that ROS, in addition to calcium signals, are important in BDNF-induced synaptic plasticity.

INTRODUCCIÓN

Una de las características más sorprendentes del cerebro de mamíferos es su capacidad de adaptarse y cambiar en base a nuevas experiencias vividas. Las modificaciones de la actividad neuronal y el remodelamiento de los circuitos neuronales son eventos clave en la **plasticidad sináptica**, que da lugar a importantes procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Kolb et al., 2003). Se ha determinado que los mecanismos a través de los cuales la actividad neuronal puede modular el comportamiento de los circuitos neuronales son los siguientes: i) modificación de las propiedades excitatorias de neuronas individuales, ii) formación de nuevas conexiones sinápticas o remodelamiento de las sinapsis existentes (*plasticidad estructural*) y iii) incrementos en la eficacia de la transmisión sináptica, (*plasticidad sináptica*) (Citri and Malenka, 2008). De acuerdo a ello, se ha descrito que la formación de memoria subyace a los cambios en la eficacia de la transmisión sináptica, siendo las **sinapsis** el lugar donde se almacena la memoria (Okano et al., 2000).

Los procesos que implican plasticidad sináptica como la formación de memoria luego de un aprendizaje inicial, son complejos y dinámicos, y tienen dos fases temporales diferentes, la plasticidad a corto plazo, que no implica la síntesis de proteínas, y la plasticidad a largo plazo, que es dependiente de la síntesis de ARN mensajero (mRNA) y proteínas (Müller, 2006). En este contexto, los mecanismos involucrados en la adquisición de experiencias nuevas involucran la participación de moléculas de señalización como las especies reactivas de oxígeno (ROS), las proteínas quinasas y fosfatasa y factores de crecimiento (Kolb et al., 2003), entre ellos el factor neurotrófico derivado del cerebro (**BDNF**), que ha sido descrito como esencial para los procesos de memoria y aprendizaje (Yamada and Nabeshima, 2003) así como el ión calcio (Ca^{2+}).

1.FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF)

Las neurotrofinas cumplen múltiples e importantes roles en el sistema nervioso, promueven la supervivencia, desarrollo y diferenciación neuronal, participan en la formación, mantención y estructura de las conexiones sinápticas, cumplen un papel esencial en la liberación de neurotransmisores y en la plasticidad sináptica (Park and Poo, 2013). Las neurotrofinas incluyen a NGF (nerve growth factor), BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin- 3) y NT4/5 (neurotrophin-4/5) (Fritsch et al., 2004).

Entre estas, el BDNF es la que se expresa más amplia y abundantemente en el sistema nervioso central de mamíferos, encontrándose altos niveles de RNA y proteína en zonas como: la neocorteza, hipocampo, amígdala y cerebelo (Webster et al., 2002). BDNF cumple un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso, regulando procesos como neurogenesis, diferenciación, supervivencia y maduración neuronal (Binder and Scharfman, 2004), mientras que en cerebro adulto, este factor se requiere para la mantención de la integridad neuronal, la liberación de neurotransmisores, la plasticidad sináptica y procesos que subyacen a esta (Waterhouse and Xu, 2009).

El gen de BDNF posee una estructura y regulación compleja, posee en total 9 promotores y 9 exones, los cuales generan un total de 24 variantes del transcrito que producen una proteína dimerica idéntica (Cunha et al., 2010). Curiosamente, los sitios de inicio de la transcripción, pueden ser activados diferencialmente por actividad neuronal o metilación del ADN. La despolarización neuronal aumenta la transcripción de los exones I, IV, V, VII, VIII y IX, mientras que los exones I, IV, V, VIII, y IX son incrementados por desmetilación del DNA (Aid et al., 2007). El BDNF es sintetizado en forma de un precursor de 247 aminoácidos, llamado pre-pro BDNF, el cual es escindido proteolíticamente dando como producto el pro-BDNF de 32 KDa. Este es proteolizado intracelularmente por pro-convertasas, secretándose la forma madura de BDNF de aproximadamente 14 KDa (Benarroch and Ca, 2015).

BDNF ejerce su acción a través de la interacción con receptores transmembrana del tipo tirosina quinasa, existiendo uno de alta afinidad, TrkB (**tropomyosin-related kinase**) y el receptor pan neurotrofina (P75 NTR) de baja afinidad (Cunha C. et al, 2007). BDNF y su receptor TrkB, se expresan abundantemente en el cerebro de mamíferos (Yan et al., 1997) y cumplen una función primordial en la supervivencia neuronal y la mantención de diversos sistemas neuronales (Bibel and Barde, 2000). La unión del dímero de BDNF a TrkB provoca la dimerización de las unidades de TrkB, promoviendo la autofosforilación de los residuos de tirosina (Y785) presentes en el dominio intracelular de TrkB, lo que induce el reclutamiento y la activación de las proteínas adaptadoras involucradas en una serie de vías de señalización intracelular (Blum and Konnerth, 2005). Entre las vías de señalización activadas por BDNF se encuentran las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la quinasa del fosfatidilinositol 3 (PI3K) y la fosfolipasa C γ (PLC γ) (Huang and Reichardt, 2003). Particularmente, la PLC γ ha adquirido un papel más central, pues al procesar los fosfoinosítidos de la membrana, produce inositol 1, 4,5 trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol, un activador transitorio de la proteína quinasa C (PKC). El IP $_3$ incrementa los niveles de Ca $^{2+}$ intracelular a través de una interacción con los receptores de IP $_3$ (IP $_3$ R) que residen en el retículo endoplasmático (RE), permitiendo la liberación de Ca $^{2+}$ desde este reservorio, al citoplasma (Bramham and Messaoudi, 2005) **Figura 1**.

Además, se ha descrito que BDNF incrementa la concentración intracelular de Ca $^{2+}$, promoviendo también la entrada de Ca $^{2+}$ al citoplasma a través de la activación de canales de Ca $^{2+}$ dependientes de potencial (Kafitz et al., 1999; Kovalchuk et al., 2002), canales catiónicos no selectivos como los TRPC3 (Li et al., 1999) y receptores NMDA (Sakai et al., 1997), así como también la liberación de Ca $^{2+}$ desde el RE mediada por los IP $_3$ R (He et al., 2005). En este contexto, nuestro laboratorio ha demostrado que la liberación de Ca $^{2+}$ desde el RE inducida por BDNF, vía IP $_3$ R, activa la liberación de Ca $^{2+}$ mediada por los receptores de Ryanodina (RyR), canales intracelulares de Ca $^{2+}$ residentes en el retículo endoplasmático (RE) que participan del mecanismo de liberación de Calcio

inducida por calcio (CICR, de su sigla en inglés), gatillando la activación de vías de señalización que generan incrementos en la expresión de genes, entre ellos la isoforma 2 y 3 de RyR inducida por BDNF (Adasme et al., 2011).

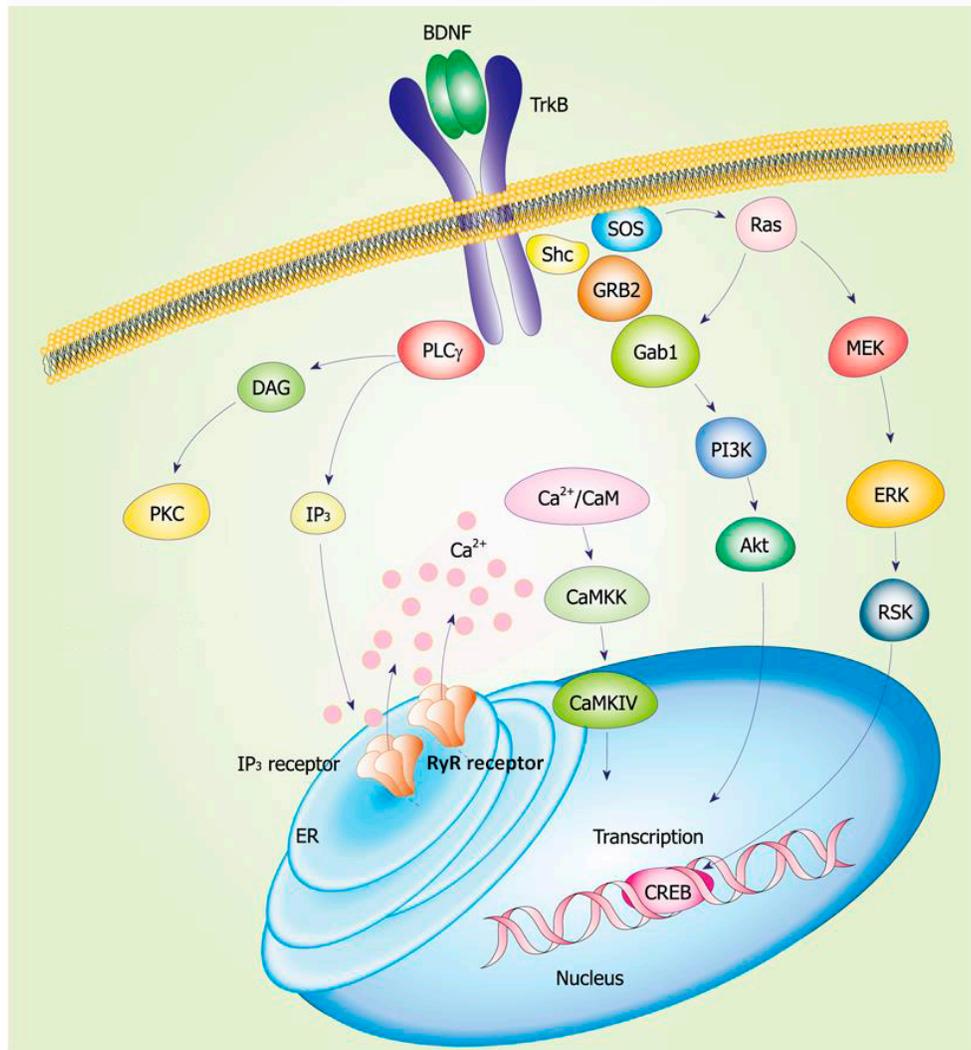


Figura 1. Vía de transducción de señales río abajo de BDNF/TrkB.

Tras la unión de BDNF a TrkB, se desencadena la activación de tres vías de señalización: (1) proteínas quinasas activadas por mitógenos/quinasas reguladas por señales extracelulares (MAPK/ERK); (2) quinasa del fosfatidilinositol 3 (PI3K); y (3) fosfolipasa Cγ (PLCγ). La activación de las diferentes vías media en su conjunto los efectos de BDNF, como supervivencia neuronal, diferenciación y el establecimiento de plasticidad sináptica. Modificado de (Numakawa et al., 2010b).

Un creciente cuerpo de evidencias ha mostrado la importante participación de BDNF en la modulación de la función sináptica, aprendizaje y memoria. De acuerdo a ello se ha descrito que BDNF modula agudamente la eficacia de la transmisión sináptica basal en las sinapsis excitatorias centrales en cultivos de hipocampo y corteza (Lin et al., 1998; Narisawa-Saito et al., 2002), en rebanadas (Tyler and Pozzo-Miller, 2003; Adasme et al., 2011) e *in vivo* (Alonso et al., 2005). Pre-sinápticamente induce la liberación de glutamato y atenúa la fatiga sináptica en respuesta a estimulaciones de alta frecuencia (HFS) (Gottschalk et al., 1998; Jovanovic et al., 2000). Post-sinápticamente, mejora la transmisión glutamatergica incrementando la fosforilación de la subunidad NR2B del receptor NMDA en el hipocampo (Lin et al., 1998), además de incrementar la transmisión excitatoria por un aumento en la translocación de receptores AMPA a la superficie neuronal (Narisawa-Saito et al., 2002). BDNF participa en las fases temprana y tardía de la potenciación a largo plazo (LTP), la que requiere horas, y la activación de mecanismos celulares mediados por AMPc, proteína quinasa A (PKA) (Frey et al., 1996; Nguyen and Kandel, 1997), proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como las ERKs y por la activación de factores transcripcionales para la síntesis de mRNA y proteínas como “cyclic AMP response element binding protein” (CREB) (Finkbeiner et al., 1997).

BDNF tiene un papel central en plasticidad estructural, ya que induce la formación de nuevas espinas y la elongación de las ya existentes, incrementando de esta manera la densidad de espinas dendríticas (Narisawa-Saito et al., 2002; Tyler and Pozzo-Miller, 2003; Alonso et al., 2005). En cuanto a la señalización involucrada en este proceso se ha encontrado que la liberación local de glutamato induce elongación de las espinas dendríticas, que es dependiente de la secreción de BDNF (Ellis-Davies GC, 2008). Periodos cortos de incubación con BDNF inducen grandes, rápidos y persistentes cambios estructurales en las espinas dendríticas, que son críticamente dependientes de la fosforilación de las ERKs (Alonso et al., 2005), y del mecanismo de liberación de calcio-inducida por calcio (CICR) mediado por RyR (Adasme et al., 2011).

2. SEÑALES DE CALCIO Y RECEPTOR DE RYANODINA.

El ión Ca^{2+} es el segundo mensajero más importante en todos los tipos celulares. En neuronas las elevaciones citoplasmáticas de la concentración de Ca^{2+} cumplen un papel central en la regulación de funciones neuronales como excitabilidad, transmisión sináptica, plasticidad sináptica y expresión génica (Hidalgo et al., 2004). El calcio que utiliza la neurona tiene dos fuentes de origen, una extracelular, donde el Ca^{2+} ingresa a través de canales iónicos sensibles a potencial y activados por ligando (Berridge, 1998), y la otra intracelular, proveniente de reservorios de Ca^{2+} tal como es el RE, donde se encuentran dos tipos de canales de Ca^{2+} : el receptor inositol trifosfato (IP3R) y el Receptor de Ryanodina (RyR) (Berridge et al., 2003).

Los receptores de Ryanodina (RyRs) son canales de Ca^{2+} localizados en la membrana del RE, recibieron este nombre debido a que poseen unión de alta afinidad con la Ryanodina, un compuesto alcaloide proveniente de la planta sudamericana *Ryania speciosa* (Carroll et al., 1991). Son 4 homotetrámeros que poseen una masa total de 2 MDa, en donde cada subunidad posee un peso molecular de 550 kDa (Lanner et al., 2010). La Ryanodina se ha utilizado ampliamente para la investigación, ya que tiene diferentes efectos según la concentración en la que se usa, a concentraciones micromolares ($> 10 \mu\text{M}$) bloquea la actividad del canal, mientras que a concentraciones nanomolares lo activa (Lanner et al., 2010). RyR ha sido secuenciado y clonado en varias especies, y se han identificado tres isoformas en mamíferos, RyR1, RyR2 y RyR3, encontrándose RyR1 principalmente en músculo esquelético, RyR2 en músculo cardiaco y en cerebro se expresan las tres isoformas del canal, siendo la más abundante RyR2 (Mori et al., 2000). El gen de RyR, en humanos se encuentra localizado en distintos cromosomas, es así como RyR1 está localizado en el cromosoma 19, RyR2 en el cromosoma 1 y RyR3 está en el cromosoma 15 (Mattei et al., 1994). Los RyRs incrementan su actividad en respuesta a un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, resultando en una liberación rápida y masiva de Ca^{2+} desde el retículo, generando un proceso conocido como

CICR, un poderoso mecanismo de amplificación y propagación de las señales de Ca^{2+} , iniciadas por el ingreso de este ión a la célula, en donde RyR cumple un rol esencial (Zalk et al., 2015).

La actividad de RyR puede ser modulada por diversas moléculas como: ATP, Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ , proteínas quinasas y fosfatasas, como también por especies oxidantes o reductoras, afectando de esta manera la liberación de Ca^{2+} mediada por este receptor (Fill et al., 2002). Los RyR contienen por subunidad aproximadamente entre 80 a 100 residuos de cisteína, de los cuales 20 son altamente susceptibles a modificaciones como: oxidación, nitrosilación, alquilación, entre otras. Estas modificaciones pueden cambiar la dependencia de Ca^{2+} que posee el canal (Dulhunty et al., 2000). Es así que se determinó que los RyR provenientes de cerebro de rata incorporados en una bicapa lipídica poseen 3 tipos de respuesta en función del estado oxidativo (**Figura 2**): **1**) una típica respuesta en forma de campana, con una probabilidad de apertura (P_o) < 0.1 que corresponde al canal en estado nativo; **2**) la reducción del canal genera, una respuesta de campana mucho más achatada en donde disminuye la P_o , en este caso el canal se hace menos sensible a las concentraciones de Ca^{2+} de reposo; **3**) la oxidación del canal provoca una respuesta de tipo sigmoide en donde aumenta la P_o del canal, haciéndolo más sensible a Ca^{2+} en condiciones de reposo. Estas modificaciones redox que sufre RyR cambian la modulación que poseen otras moléculas sobre el canal y también regulan procesos fisiológicos como el LTP, pero, también pueden estar involucradas en patologías desregulando la homeostasis del Ca^{2+} provocando apoptosis y excitotoxicidad neuronal (Hidalgo et al., 2004).

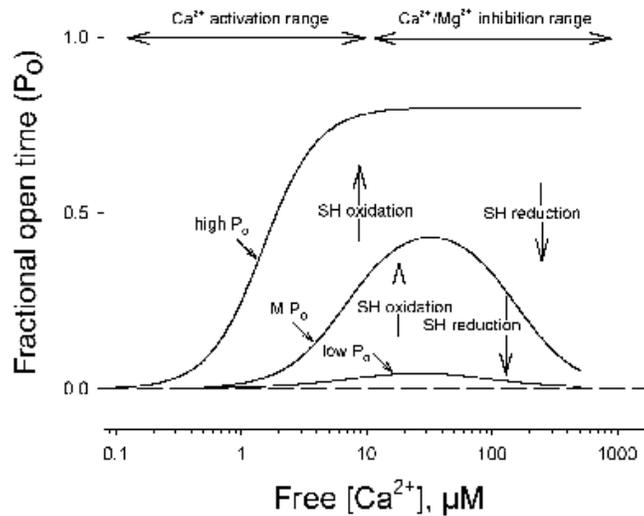


Figura 2: Efecto de la modificación redox sobre los grupos tioles en la dependencia a calcio de los canales RyR. Los RyR altamente reducidos responden menos a la activación por Ca^{2+} , mientras que el aumento del estado de oxidación del canal aumenta la respuesta del canal a Ca^{2+} y disminuye el efecto inhibitorio de altas concentraciones de Ca^{2+} (Hidalgo et al., 2004).

3. RECEPTOR DE RYANODINA Y PLASTICIDAD SINÁPTICA

A pesar de la importancia emergente de la liberación de Ca^{2+} a través de los RyR en la función cerebral, poco se sabe acerca de la contribución de las diferentes isoformas en la generación y/o regulación de las señales de Ca^{2+} que comandan las funciones neuronales, necesarias para procesos de plasticidad sináptica y memoria. Se ha observado en rebanadas de hipocampo, que la inducción de LTP requiere de la liberación postsináptica de Ca^{2+} mediada por RyR (Paula-Lima et al., 2014). La liberación de Ca^{2+} mediada por RyR participa en formas específicas de plasticidad sináptica en neuronas de hipocampo y cerebelo (Rose and Konnerth, 2001). Se ha observado en cultivo primario de hipocampo que la inhibición de liberación de calcio mediada por RyR, previene el crecimiento de espinas dendríticas inducido por BDNF (Adasme et al., 2011).

Algunos estudios de comportamiento con roedores han mostrado incrementos en la expresión del transcrito y de la proteína de RyR2 12 horas después del

entrenamiento, lo que sugiere que la señalización de Ca^{2+} mediada por RyR2 puede estar involucrada en el procesamiento de la memoria (Cavallaro et al., 1997; Zhao et al., 2000). En nuestro laboratorio, utilizando el mismo test conductual, hemos observado que la actividad amplificadora de la señal de Ca^{2+} ejercida por RyR, participa en la etapa de formación de la memoria y que la consolidación de la memoria hipocampal va acompañada de incrementos sustanciales en la expresión génica de RyR3 y de una elevada expresión de RyR2. Por otro lado, se determinó que la inyección de BDNF en la región CA1 del hipocampo de rata, genera incrementos significativos de los niveles proteicos de RyR2, RyR3, IP3R y BDNF, transcurridas 6 horas post inyección (Adasme et al., 2011). Asimismo, estudios conductuales en los que se inhibió la función (Edwards and Rickard, 2006) y la expresión de las distintas isoformas de RyR (Galeotti et al., 2008) mostraron que estos canales intracelulares de Ca^{2+} actúan como moduladores críticos del procesamiento de la memoria.

4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO/NITRÓGENO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un grupo de moléculas en las que se incluye el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), y son generadas debido a la reducción incompleta que sufre el oxígeno (Dröge, 2002). Sin embargo, no solo del oxígeno se obtienen moléculas altamente reactivas, también encontramos otro tipo de moléculas provenientes del nitrógeno, denominadas especies reactivas del nitrógeno (RNS) en las que encontramos al NO^{\cdot} , peroxinitrito (ONOO^-) (Martínez and Andriantsitohaina, 2009). Las ROS/RNS se han asociado principalmente con daño al DNA, proteínas, lípidos, apoptosis, etc. No obstante, algunos trabajos realizados en las últimas décadas han mostrado que estas moléculas no sólo son agentes dañinos para las células, sino también son necesarias para la función celular normal como entre estas, la función inmune, proliferación, señalización, plasticidad sináptica entre otros (Dröge, 2002). Se ha documentado que las ROS pueden mediar estos efectos fisiológicos, a través de la modulación de la actividad de MAPK, PI3K,

fosfatasas (Ray et al., 2012), factores de transcripción (Thannickal and Fanburg, 2000) y canales iónicos como RyR (Hidalgo et al., 2005).

Las ROS pueden ser generados de manera exógena a través de metales pesados, humo de cigarro y de la incorporación de xenobióticos, que al metabolizarse pueden dar lugar a compuestos radicales y altamente reactivos (Pham-Huy et al., 2008). A nivel endógeno la principal fuente de producción de ROS es la mitocondria, generando O_2^- como subproducto principalmente por los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones (Turrens, 2003). Otra fuente principal, que genera ROS es la enzima **NADPH oxidasa (NOX)**, un complejo multiproteico ubicado en la membrana plasmática, que cataliza la oxidación de NADPH en $NADP^+$, más la liberación de un electrón en el proceso, el que genera la reducción del O_2 a O_2^- (Hernandes and Britto, 2012). Se han identificado 6 homólogos de esta enzima: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, y DUOX2, junto con la NOX fagocítica conocida como NOX2/gp91^{phox}. La NOX está conformada por una subunidad catalítica gp91^{phox} y subunidades regulatorias p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox} (Lambeth, 2004). gp91^{phox} y p22^{phox} son subunidades transmembrana, mientras que p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox} son subunidades citoplasmáticas, que tras un estímulo translocan a la membrana, anclándose a las subunidades albergadas allí, activando el complejo enzimático (Bedard and Krause, 2007). A nivel citoplasmático conviven varias otras enzimas que pueden generar ROS, tales como, la Xantina oxidasa (XO), citocromo p450, ciclooxigenasa, entre otras (Kishida and Klann, 2007).

Las RNS son generadas principalmente por la **óxido nítrico sintasa (NOS)**, enzima que cataliza la oxidación de L-arginina resultando en la formación de L-citrulina y NO; este último cumple un rol esencial como molécula mensajera difusible (Förstermann and Sessa, 2012). La NOS posee 3 isoformas genéticamente diferentes: la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), el óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), esta última es la que se expresa mayoritariamente a nivel neuronal y se encuentra localizada principalmente a nivel citoplasmático (Zhou and Zhu, 2009). Por último, la actividad de la nNOS es regulada por Ca^{2+} mediante la unión de calmodulina, lo

cual induce aumento en la producción de H_2O_2 en conjunto con NO en el cerebro (Heinzel et al., 1992).

5. ROS/RNS Y SU ROL EN PLASTICIDAD SINÁPTICA

A nivel neuronal existe una alta demanda de consumo de oxígeno y por consiguiente una gran producción de especies reactivas. La participación de las ROS en la fisiología neuronal es amplia, al respecto se ha descrito que para el establecimiento de la LTP dependiente de NMDA, la generación de ROS/RNS es un paso clave en la activación de las ERKs en la región CA1 del hipocampo (Kishida et al., 2005). Trabajos previos, en donde utilizaron ratones transgénicos que sobreexpresan la SOD-1, que fueron sometidos a la prueba conductual del laberinto acuático de Morris (MWM), mostraron que estos animales presentan una disminución en el tiempo de latencia, en comparación con los animales *wild type* (Gahtan et al., 1998). En este contexto, otro estudio mostró que el uso de un atrapador de superóxido, inhibe la etapa de inducción de LTP, provocado por estimulación de alta frecuencia (HFS), indicando que el anión superóxido tiene gran relevancia en los procesos de aprendizaje y plasticidad sináptica (Klann et al., 1998). La fuente generadora de anión superóxido fue identificada utilizando ratones *knockout* para las subunidades gp91^{phox} y p47^{phox} de la NOX. Así, por medio de experimentos en que realizaron HFS para generar LTP con hipocampos provenientes de estos animales, se determinó que al inducir un protocolo de HFS, no ocurre la inducción de la LTP, demostrando de esta manera que se requiere la actividad de la NOX para el establecimiento del LTP en el hipocampo (Kishida et al., 2005). La participación del H_2O_2 también ha sido estudiada en procesos de plasticidad, al respecto se han realizado estudios de los efectos que tienen diferentes concentraciones de H_2O_2 en la LTP, en el estudio se observó que altas concentraciones de H_2O_2 (20 μ M), relacionadas más bien con efectos tóxicos de este, bloquean la inducción de nuevas LTP generadas por HFS. Por el contrario, bajas concentraciones de H_2O_2 (1 μ M) mejoran la LTP, a través de un mecanismo dependiente de la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) y de la calcineurina (CaN) (Kamsler and Segal, 2003). Otros grupos de investigación han estudiado la participación del NO, mostrando que al inhibir la

actividad de la NOS, ocurre una inhibición total de la LTP, proceso que se revierte mediante la adición de sustrato para la NOS, o mediante la administración exógena de NO a bajas concentraciones (Bon and Garthwaite, 2003).

Con respecto a las ROS y BDNF, pocos estudios existen al respecto. En neuronas corticales incubadas con BDNF por un tiempo prologando (48 horas), se evidenciaron incrementos en los niveles de expresión de la subunidad p47phox de la NADPH oxidasa, siendo esta la única evidencia que relaciona a esta neurotrofina con las ROS (Kim et al., 2002). Hemos estudiado en el laboratorio la participación de las ROS en la señalización inducida por BDNF, al respecto se observó que BDNF aumenta la generación de ROS, siendo estas requeridas para, la remodelación de espinas dendríticas inducidas por BDNF (manuscrito en preparación). **Sin embargo, la participación de las señales de Ca²⁺ y las fuentes de generación de ROS, que podrían estar participando en los incrementos de la expresión de RyR2 inducidos por BDNF son aún desconocidas.**

Bajo condiciones fisiológicas, la producción celular de ROS/RNS se encuentra estrictamente regulada mediante una amplia batería de enzimas antioxidantes, que contrarrestan el efecto de estas moléculas. Las principales enzimas clasificadas en este grupo son: la superóxido dismutasa (SOD), una clase de metaloenzimas que generan la dismutación del anión superóxido a H₂O₂ y O₂, enzimas como la catalasa, peroxidasa, glutatión peroxidasa, que descomponen el H₂O₂ en agua y oxígeno. Existen otros tipos de moléculas como el glutatión, tioredoxinas y peroxiredoxinas, que actúan como donares de electrones. (Zhang and Martin, 2014). Una de las principales vías de señalización que responde a las ROS y que regula la batería de genes citoprotectores y antioxidantes, es **Nrf2-Keap1-ARE**. Esta vía de señalización está conformada por un sistema sensible al estado redox, regulando una importante cantidad de genes antioxidantes.

6. VÍA DE SEÑALIZACIÓN Nrf2-KEAP1

El factor de transcripción Nrf2, conocido como el regulador maestro de la respuesta antioxidante, se encuentra codificado por el gen NFE2L2, perteneciente a la subfamilia Cap N' Collar (CNC), factores de transcripción con un cierre de leucina básico (basic leucine zipper, bZIP), que les permite unirse al DNA (Sandberg et al., 2014). Nrf2 en humanos posee 605 aminoácidos y contiene 6 dominios altamente conservados, nombrados como dominios de homología ECH-Nrf2 (Neh) (Sihvola and Levonen, 2016). El dominio Neh1 posee el motivo bZIP responsable de la heterodimerización de Nrf2 con las proteínas Maf pequeñas, además posee motivos de importe y exporte nuclear. Neh2 corresponde al extremo N-terminal de Nrf2 y contiene los motivos DLG y ETGE, los cuales les permiten unirse a su represor citoplasmático Keap1 (Itoh et al., 1999). El motivo ETGE tiene alta afinidad por Keap1 mientras que DLG posee una menor afinidad por este, generando que la unión de Nrf2 a Keap1 posea un sistema similar al de una bisagra y cerrojo (Tong et al., 2006). El dominio Neh3 correspondiente al extremo C-terminal de la proteína, junto a Neh4-Neh5, median la transactivación de Nrf2 a través de la unión a varios componentes del aparato transcripcional, como por ejemplo histonas acetiltransferasas (Nioi et al., 2005). Neh6 es un dominio conservado y rico en serinas, que regula negativamente a Nrf2, pero a través de un mecanismo independiente de su represor citoplasmático (Magesh et al., 2012) **Figura 3.**

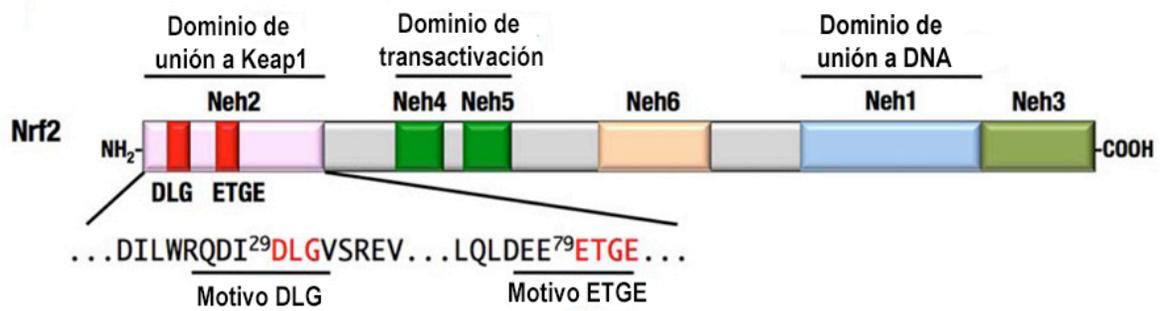


Figura 3: Dominios estructurales de Nrf2. El dominio N-terminal es denominado dominio Neh2, el cual contiene los motivos DLG y ETGE, responsables de la interacción con Keap1. Los dominios Neh4, Neh5 y Neh3 son importantes para la transactivación de Nrf2. El dominio Neh1 posee el motivo de unión a DNA y de dimerización con las Maf pequeñas modificadas (Mitsuishi et al., 2012).

Se ha descrito que bajo condiciones normales Nrf2 se encuentra unido a Keap1, en esta conformación, Nrf2 se encuentra en constante degradación vía proteosoma-ubiquitina (Kobayashi et al., 2006). Sin embargo, su unión a la proteína Keap1 no sólo existe para su degradación, sino que es esencial para la regulación de la actividad de Nrf2, ya que funciona como un regulador negativo de este (Itoh et al., 2010). La proteína Keap1 posee 3 dominios funcionales, el dominio BTB (broad complex/tramtrack/bric-a-brac), que se une a Cullin 3, una proteína adaptadora al complejo E3 ubiquitina ligasa, que permite la degradación constante de Nrf2, pero además le permite homodimerizar. Posee otros dominios como el dominio Kelch, también conocido como dominio de doble repetición de glicina (Kelch/DGR), que facilita la unión de Keap1 a Nrf2, el dominio IVR, que une los dominios BTB y Kelch y posee varios residuos de cisteína que regulan la actividad de esta proteína (Lu et al., 2016). Entonces, en presencia de electrófilos o ROS, los residuos de cisteína de Keap1 se oxidan, provocando que Nrf2 se disocie de Keap1. Tras esto, Nrf2 transloca al núcleo, en donde heterodimeriza con proteínas Maf pequeñas, uniéndose a sitios en el ADN, conocidos como elementos de respuesta antioxidante (ERA) o elementos de respuesta a electrófilos (ERE), regulando así una gran variedad de genes citoprotectores (Itoh et al., 2004; Yang et al., 2015). Los genes citoprotectores que se han descrito como blancos de Nrf2 son enzimas de metabolización de fase II y antioxidantes

como la hemoxygenasa-1 (HO-1), la NADPH quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), tioredoxinas (Trxs), glutatión S-transferasas (GST), entre otras (Yang Y. et al 2015). Otro tipo de regulación de Nrf2 es a través de fosforilaciones, las que pueden ser mediadas por varias quinasas como PKC, PI3K, ERK, que también puede influir en su exporte nuclear, gatillando su activación (Sandberg et al., 2014; Yang et al., 2015). Experimentos con células de hepatocitos fetales humanos (L02) inmortalizados, mostraron que, el tratamiento de estas células con LY294002 y wortmanina (inhibidores PI3K), disminuye la acumulación nuclear de Nrf2 y la activación de los sitios ARE, lo que indica que la vía PI3K/Akt es crítica en la activación de Nrf2/ARE en este tipo celular (Nakaso et al., 2006; Zou et al., 2013). Además, estudios en la línea neuronal SH-SY5Y mostraron que la neuroprotección mediada por la activación de Nrf2 es dependiente de la vía de las MAPK, ya que el uso del inhibidor PD98059 (inhibidor MEK1/2) o el silenciamiento de esta proteína con un siRNA, previenen dicha neuroprotección (Meng et al., 2013). Por otro lado, la proteína quinasa C ha sido relacionada con la fosforilación del residuo Ser-40 en el dominio Neh2 de Nrf2, ya que esta fosforilación causa la interrupción de la asociación de Nrf2 con su represor, causando la translocación de Nrf2 al núcleo (Huang et al., 2002).

7. PARTICIPACIÓN DE Nrf2 EN EL SISTEMA NERVIOSO

Nrf2 es ampliamente expresado en el SNC, en corteza un estudio sugiere que Nrf2 se expresa más abundantemente en astrocitos que en neuronas (Shih et al., 2003), mientras que en otro trabajo en que se realizó isquemia y reperfusión, constataron su expresión tanto en microglia, como en astrocitos y neuronas (Dang et al., 2012). Luego del procedimiento de isquemia cerebral, se observó que en las regiones que no fueron afectadas por la isquemia, se incrementó la expresión de Nrf2, lo que no ocurrió en microglia, astrocitos, y tampoco en regiones del cerebro en donde la reoxigenación generó estrés oxidativo (Dang et al., 2012).

Para estudiar el papel de Nrf2 en la fisiología cerebral, se han realizado estudios en ratones *knockout* para Nrf2, que fueron sometidos a pruebas de nado forzado, en donde mostraron una mayor resistencia al estrés generado por la prueba,

además de niveles elevados de dopamina y serotonina (Muramatsu et al., 2013). Las propiedades citoprotectoras de Nrf2 han dirigido su estudio en enfermedades neurodegenerativas tal como la enfermedad de Alzheimer (EA) (de Vries et al., 2008). En muestras de cerebros de pacientes con EA, se observó una drástica disminución de la inmunoreactividad para Nrf2 en neuronas hipocampales respecto de cerebros sanos de la misma edad. Esto sugirió que existen fallas en la transcripción mediada por Nrf2 en neuronas de pacientes con EA, a pesar del estrés oxidativo propio de la enfermedad (Ramsey et al., 2007). Un estudio realizado con ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína precursora de amiloide (APP) y la presenilina 1 (PS1) mostró que en estos la vía Nrf2 se encuentra inactiva, y que la inducción de genes Nrf2-ARE protege de la neurotoxicidad inducida por el β -amiloide, a través de la activación de la expresión genes citoprotectores, que contrarrestan los efectos nocivos del β -amiloide, siendo este probablemente un mecanismo de defensa que podría prevenir o retrasar el deterioro generado en la patología de la enfermedad (Kanninen et al., 2008)(Kanninen et al., 2008). De acuerdo a lo anterior, otro estudio del mismo grupo mostró que la inyección bilateral en el hipocampo de los ratones transgénicos (APP/PS1), con un lentivirus que permite sobreexpresar el factor transcripcional Nrf2 humano, mejora su desempeño en el laberinto acuático de Morris, reduciendo de esta manera el déficit en la memoria espacial, que presentan en estos animales (Kanninen et al., 2009).

Además, otro estudio evidenció que Nrf2 cumple un papel clave en la prevención de la muerte neuronal mediada por Ca^{2+} , así cultivos primarios de neuronas corticales Nrf2 ^{+/+} y Nrf2 ^{-/-} fueron tratados con ionomicina (ionoforo de Ca^{2+}) y dtBHQ (inhibidor de la Ca^{2+} ATPasa del RE). Los resultados mostraron que los cultivos de neuronas Nrf2 ^{-/-}, fueron más susceptibles al incremento desregulado de Ca^{2+} , indicando un rol importante de Nrf2 en la mantención del homeostasis de Ca^{2+} celular (Lee et al., 2003). Para conocer los genes blancos de Nrf2, se realizó un microarreglo de genes regulados por Nrf2 en cultivos neuronales, identificándose genes citoprotectores clásicos, además de proteínas de

señalización, proteínas específicas de neuronas, factores de crecimiento como BDNF y de varias proteínas involucradas en la homeostasis del Ca^{2+} , entre ellas a RyR3 (Lee et al., 2003). Más aún, un análisis por microarreglo en neuronas hipocampales incubadas a diferentes tiempos con BDNF, muestra que este incrementa la expresión de la NADPH quinona oxidoreductasa, gen clásico regulado por Nrf2 (Ring et al., 2006).

Estos antecedentes en conjunto nos permitieron proponer que, si la incubación de neuronas hipocampales en cultivo con BDNF, genera señales de Ca^{2+} mediadas por RyR, podría también inducir la producción de ROS, las que a su vez, podrían ser requeridas para: 1) incrementar el contenido de RyR2 ; 2) la translocación de Nrf2 al núcleo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS:

El BDNF induce la generación de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno que se requieren para incrementar el contenido de la isoforma RyR2 y la translocación de Nrf2 al núcleo.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si las especies reactivas de oxígeno generadas por BDNF, inducen la translocación de Nrf2 al núcleo y el incremento en la expresión de RyR2.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar si la generación de ROS tras la unión de BDNF a su receptor, requiere de las señales de Calcio provenientes del medio extracelular y del retículo endoplasmático, mediadas por RyR.
2. Determinar la contribución de la NOS y NOX2 sobre: a) el aumento de los niveles citoplasmáticos de H_2O_2 y b) el incremento en el contenido de proteína RyR2 inducidos por BDNF.
3. Determinar si BDNF induce la translocación al núcleo de Nrf2 y si esta es dependiente de la liberación de calcio mediada por RyR y/o de las especies reactivas de oxígeno/nitrógeno generadas por BDNF.
4. Determinar si las proteínas quinasas (ERK y PI3K), que se activan en respuesta a BDNF, forman parte de la señalización que induce la translocación de Nrf2 al núcleo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: Los medios de cultivo Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM), Hank's, EDTA, EGTA, otros reactivos para la realización de los estudios bioquímicos y los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa, de ratón anti β -actina IgG y de ratón IgG anti β -tubulina III se adquirieron en Sigma Chemical Co (St Louis, USA). El medio Neurobasal, GlutamaxTM y la tripsina-EDTA se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, CA). El suero fetal bovino (FBS) y el suplemento neuronal B27 libre de suero se obtuvieron de GIBCOTM. Se adquirieron en Calbiochem- Novabiochem Corp. (La Jolla, USA) el cocktail de inhibidores de proteasas. Los reactivos para biología molecular se obtuvieron de Promega e Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Las placas de cultivo y tubos utilizados provinieron de Falcon (Reynosa, Tamaulipas, Mexico). Las membranas de PVDF fueron adquiridas en BioRad (Hercules, California, USA), y la sonda fluorescente Fluo4-acetometilester (Fluo4-AM) en Molecular Probes (Eugene, USA). En Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EEUU), se adquirió el anticuerpo monoclonal de conejo IgG anti Lamina B1. En MERCK MILLIPORE (Frankfurter, Darmstadt, Alemania), se adquirió el anticuerpo monoclonal de ratón IgG anti MAP2. En Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA), se adquirió el anticuerpo policlonal de conejo IgG Nrf2. En Chemicon Millipore (Frankfurter, Darmstadt, Alemania), se adquirió el péptido recombinante BDNF. De Affinity Bioreagents (Golden, CO), se adquirió el anticuerpo de ratón IgG anti RyR2. El reactivo de quimioluminiscencia (EZ-ECL) fue adquirido en Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en MERCK MILLIPORE (Darmstadt, Alemania). El medio de montaje para fluorescencia se obtuvo en DAKO Corporation (CA, EEUU). Los inhibidores UO126, LY290042 fueron adquiridos desde Calbiochem- Novabiochem Corp, L-NAME (Sigma Aldrich), gp91 ds-tat (Anaspec), MK801 (Sigma Aldrich), 4-CMC (Merck Millipore), BSA (Thermo Scientific), PBS 10X (Winkler).

Material Biológico: Se utilizaron embriones de ratas Sprage-Dawley obtenidos de ratas preñadas de 18 días de gestación, provenientes del Bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Todos los estudios se realizaron de acuerdo a protocolos aprobados por el Comité de Bioética CBA 0719 FMUCH de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Cultivo primario de neuronas hipocampales: El cultivo fue preparado según metodología descrita en (Kemmerling et al., 2007). Brevemente, se diseccionaron los hipocampos de los embriones en medio Hanks libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , pH 7,4 a 4°C (HBSS). A continuación, se incubaron durante 5 minutos a 37°C con solución HBSS que contiene 0.25% de tripsina, y luego se resuspendieron en medio de adhesión (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; D-glucosa 19,4mM; NaHCO_3 26 mM, suplementado con 10% de suero de caballo, 10 U/ml de penicilina y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina). Se disgregó el tejido mecánicamente y se determinó la viabilidad celular con azul de tripán 0,2%. Las células recuperadas se sembraron en placa de Petri de 60 mm o en placas de 35 mm con cubreobjeto de vidrio, previamente tratadas con poli-L-lisina (0,1 mg/ml) y se mantuvieron en medio de adhesión durante 40 minutos a 37°C en atmósfera húmeda con 5% $\text{CO}_2/95\%$ aire. A continuación, se cambió el medio de adhesión por medio Neurobasal suplementado con B27 libre de suero, 20 U/ml de penicilina, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina y 2 mM Glutamax. Las células se mantuvieron en cultivo entre 10 y 14 días (DIV) antes de su utilización, suplementándose con medio de cultivo a lo largo de todo el periodo.

Incubación de cultivo primario de neuronas hipocampales con BDNF o inhibidores: Para los experimentos de cinética, se incubaron las neuronas en cultivo de 14 DIV con BDNF (50 ng/ml) fresco, diluido en medio Neurobasal sin B27 desde un stock concentrado, durante 1 a 24 horas. En todos los demás experimentos, se incubaron las neuronas durante 6 horas con BDNF (50 ng/ml) y en algunos casos, previo a la incubación con BDNF se incubó durante 30 minutos

con N-acetil-cisteína (NAC) 10 mM para reducir el ambiente celular, ryanodina (Rya) 50 μ M para inhibir la función de RyR, L-NAME 10 μ M para inhibir la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), gp91-dstat 1,5 μ M, péptido que inhibe el ensamblaje del complejo enzimático de la NADPH oxidasa, UO126 10 μ M, que inhibe la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), LY290042 10 μ M inhibidor de la quinasa del fosfatidilinositol 3 (PI3K) o MK-801 10 μ M, inhibidor de los receptores NMDA. Estos inhibidores se mantuvieron en el medio de incubación durante las 6 horas posteriores de incubación con BDNF.

Determinación de H₂O₂ citoplasmático: Se utilizaron cultivos de neuronas hipocampales de 13-14 DIV, sembrados en cubreobjetos de 25 mm. Las neuronas fueron transfectadas entre 12-13 DIV, con 1 μ g de DNA del plasmidio Hyper-cyto (max excitación: 420-500 nm; max emisión: 516 nm; cortesía Dr. Rizzuto (Belousov et al., 2006), con lipofectamina 2000®. Se utilizó una proporción de 1:2, relación plasmidio/lipofectamina, y se siguieron las indicaciones del fabricante. Al día siguiente de la transfección, las neuronas fueron tratadas durante 30 minutos con Rya (50 μ M) y los inhibidores gp91 ds-tat (1,5 μ M), L-NAME (10 μ M) o MK801 (10 μ M), según corresponda el experimento. Transcurrido el tiempo de incubación, los cubreobjetos fueron lavados 3 veces con medio extracelular Tyrode (NaCl 129 mM, KCl 5 mM, HEPES 25 mM pH 7,3, glucosa 30 mM CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM) y mantenidas en este medio durante todo el experimento. Las células fueron llevadas al microscopio confocal, donde se registró la fluorescencia basal de la sonda Hyper-cyto durante 200 segundos, para lograr una estabilización de la señal. Luego se registraron durante 2800 segundos, los cambios en la intensidad de fluorescencia tras la adición de BDNF (50 ng/ml). Las imágenes se registraron cada x segundos en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM Pascal 5, utilizando el objetivo 63X. Para monitorear la producción de H₂O₂ citoplasmático. Se registraron los cambios en la fluorescencia de hyper-cyto en el soma neuronal mediante la realización de 3-4 regiones de interés (ROIs).

Determinación de señales de Ca²⁺ intracelulares: Se utilizaron neuronas hipocampales de 14 DIV, sembradas en cubreobjetos de vidrio de 25 mm. Para la realización de los experimentos, las células previamente fueron incubadas durante 30 minutos con los inhibidores L-NAME o gp91-dstat, y a continuación se cargaron durante 20 minutos a 37°C con Fluo 4-AM, una sonda que al unirse a calcio fluoresce, preparada en medio extracelular Tyrode (NaCl 129 mM, KCl 5 mM, HEPES 25 mM pH 7.3, glucosa 30 mM CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM). Una vez terminado el tiempo de carga de las células, fueron lavadas 3 veces con medio extracelular Tyrode, para retirar el exceso de sonda. Se colocaron en cámaras con medio Tyrode y se registró una línea base de fluorescencia hasta observar una estabilización de la sonda. A continuación, se registraron los cambios en la intensidad de fluorescencia al estimular con BDNF (50 ng/ml) o al agregar 4-clorometil-cresol (4-CMC), un agonista específico de RyR. Las imágenes fueron adquiridas cada 5 segundos en un microscopio confocal invertido (Carl Zeiss, Axiovert 200, LSM 5 Pascal, Jena, Germany) utilizando el objetivo de 63 X de inmersión en aceite. Las señales se registraron en los cuerpos celulares, y se grafica la intensidad total de fluorescencia como F/F₀, donde F₀ corresponde a la fluorescencia basal. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Lisis celular para la detección de RyR: Luego de concluido el tiempo de incubación con BDNF y/o NAC, L-NAME o gp91-dstat, las células fueron mantenidas en hielo, y fueron lavadas 3 veces con PBS 1X- BAPTA 1 mM (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10,1 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4) frío y se lisaron con 50 µl con tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 5 mM, NaF 40 mM, Na₄P₂O₇ (NaPP) 10 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM, NP-40 1 %, Deoxicolato de Sodio 0,5 %, SDS 0,1%), además se agregó un mix de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free, Calbiochem). Las células se rasparon y el homogenizado obtenido fue lisado mecánicamente 10 veces con jeringa, para posteriormente sonificarlo 3 veces por 15 segundos en hielo. A

continuación, los lisados se centrifugaron a 1554 g durante 20 minutos a 4°C. La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó mediante el método del sulfosalicilico (Hartree, 1972), usando BSA como estándar. Las muestras fueron guardadas a -80°C.

Electroforesis de RyR: Los extractos de proteínas se denaturaron con un buffer reductor 4 x (SDS-PAGE: Glicerol 34,8 %, Tris Base 1 M, SDS 8 %, Azul de Bromofenol 0,04 %, EDTA 2 mM, ditioneitol (DTT) 0.1 M) y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% y un taco al 15% (de esta manera se favorece la separación de las distintas isoformas de RyR sin perder la proteína estándar β -actina), utilizando un sistema de tampones Tris-acetato, en una cámara Miniprotean (BioRad). A continuación, se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF (Polivinildifluoruro) de 0,2 μ m (BioRad) utilizando un sistema de transferencia rápida semihúmeda, Trans-Blot®-Turbo™ (Transfer System) (BioRad) (protocolo gel 1,5 mm 1,3A, 25V, 10 min). Las membranas fueron bloqueadas durante 2 horas a temperatura ambiente, con leche descremada al 5% en TBS-Tween-20 (0,2 % v/v) y luego se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpo anti RyR2 (dilución 1:2000) y beta actina (1:10000) en solución de bloqueo. Luego se lavaron 3 veces durante 5 minutos con TBS-T 0,2 % y se incubaron por 2 horas con los anticuerpos anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (dilución 1:5000) en la misma solución de bloqueo. Al término de la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces por 5 min con TBS-T 0,2% y se detectó la isoforma 2 de RyR y el control de carga β -actina por quimioluminiscencia, utilizando el kit ECL de Amersham Pharmacia Biotech de Amersham Pharmacia Biotech y el equipo Chemidoc XRS System (Biorad). Las intensidades de las bandas resultantes se cuantificaron por densitometría utilizando el software ImageLab (BioRad). Los resultados se expresaron como la abundancia de RyR2 respecto a la abundancia de β -actina y respecto al control sin estimular (veces el control).

Extracción de RNA y RT-PCR: La extracción de mRNA total se realizó utilizando Trizol® (Invitrogen) según protocolo modificado; las células fueron lisadas con Trizol®, se agregó cloroformo y luego de centrifugar durante 15 minutos a 19064 g se obtuvieron dos fases una orgánica y otra acuosa, esta última se separó, para luego precipitar el DNA y RNA con isopropanol durante 2 horas a -20°C o durante toda la noche a -80°C. Luego las muestras fueron centrifugadas durante 30 minutos a 14000 g durante 4°C, descartando el sobrenadante y realizando 5 lavados con etanol frío al 70% para eliminar sales. A continuación, se realizó el tratamiento con DNAasa (Turbo DNA-free™ kit, Ambion, Austin, TX) durante 30 minutos a 37°C, para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico. La pureza del RNA extraído fue evaluada a partir del valor de la razón de la absorbancia medida a 260 y 280 nm. El cDNA se preparó con una concentración de 2 µg total de RNA usando la transcriptasa reversa Improm-IITM (Promega, Madison, WI), según protocolo estándar del fabricante. Para la reacción de qPCR, se utilizó 2 µg de cDNA para un volumen final de amplificación de 20 µl (Applied Biosystems Thermal cycler). La amplificación fue realizada utilizando partidores y condiciones de qPCR detalladas en la tabla 1. Los experimentos de PCR cuantitativo (real time PCR) se realizaron en el equipo MX3000P, Stratagene, La Jolla, CA., usando SyBR green como sonda fluorescente específica para DNA de doble hebra (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se determinó la abundancia de los transcritos RyR2 y β-actina y utilizamos el método de 2-ΔΔCT (Pfaffl, 2001) para la cuantificación; se realizaron curvas de disociación para verificar la pureza de los productos obtenidos. Se analizaron todas las muestras al menos en triplicado.

Tabla 1: Secuencia de los partidores utilizados para detección de RyR2 y β-actina.

Especies de mRNA	Partidor Sentido/ Partidor Antisentido	T° de Alineamiento (°C)	Longitud (bp)	Referencia
RyR2	5'-CTCTCTTCAGATCCAAGCCA-3' 5'-CTCTCTTCAGATCCAAGCCA-3'	60	157	(Zhao et al., 2000)
β-actina	5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3' 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'	60	139	Diseñados en el laboratorio

Preparación de fracciones citoplasmáticas y nucleares, para determinar la translocación de Nrf2: Luego de concluida la incubación en diferentes condiciones, las neuronas hipocampales fueron lavadas 3 veces con PBS 1x frío, y a continuación se lisaron con 30 μ l de tampón A para obtener las fracciones citoplasmáticas (HEPES 10 mM pH 7.8, KCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, EDTA 0.1 mM, PMSF 0.1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 10 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA Free, Calbiochem). Tras agregar el tampón A, se mantuvieron durante 10 minutos en hielo, se agregó 3 μ l de NP-40 10% y se lisaron mecánicamente con un *scraper*. El lisado obtenido fue transferido a tubos *ependorf*, y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Luego de la centrifugación, se reservó el sobrenadante obtenido, que corresponde a la fracción citoplasmática, mientras que el pellet se lavó 3 veces con 50 μ l de tampón A cada vez, centrifugando a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C cada vez. Posteriormente se resuspendió el pellet con 30 μ l de tampón B, para preparación de extractos de núcleo (HEPES 50 mM pH 7.8, KCl 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1mM, PMSF 0.1 mM, glicerol 10 %, 10 μ l/ml de cocktail de inhibidores de proteasas. Para ello, se incubaron los pellets con este Buffer con agitación fuerte y constante durante 30 minutos en hielo. Finalmente se centrifugó a 10000 x g por 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes, que corresponden a los extractos nucleares. A continuación, se separaron alícuotas para la determinación de proteínas, así para la cuantificación de proteínas de la fracción citoplasmática se utilizó el método turbidimétrico y para los extractos nucleares, el método de Bradford, en ambos casos se utilizó BSA como estándar, preparándose una curva en cada determinación, el resto de las muestras fueron almacenadas -80°C para ser utilizadas.

Electroforesis de Nrf2 : Las proteínas obtenidas de los extractos citoplasmáticos y nucleares se denaturaron con buffer reductor SDS-PAGE 4x (Glicerol 34,8 %, Tris Base 1 M, SDS 8 %, Azul de Bromofenol 0.04 %, EDTA 2 mM, DTT 0.1 M), se separaron en 2 geles distintos (citoplasma y núcleo) al 12% SDS-PAGE en una cámara Miniprotein (BioRad) y a continuación, se transfirieron a membranas de

PVDF (Polivinildifluoruro) de 0,2 μm (BioRad) utilizando un sistema de transferencia rápida semihúmeda, Trans-Blot®-Turbo™ (Transfer System) (BioRad) (protocolo gel 1,5 mm 1,3A, 25V, 10 minutos). Las membranas de PVDF se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con solución de bloqueo (leche descremada al 5% en TBS-Tween-20 (0,2% v/v) (TBS-T 0,2%) para Nrf2. Luego las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario para Nrf2 (dilución 1:2000, Santa Cruz), en solución de bloqueo. A continuación, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con TBS-T 0,2% y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con anticuerpo secundario anti IgG de conejo, conjugado a peroxidasa (dilución 1:5000) en la misma solución de bloqueo. Al término de la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos y se detectó Nrf2 en los extractos nucleares y citoplasmáticos utilizando el kit ECL y el equipo Chemidoc XRS System (Biorad). Para lograr la normalización de la fracción citoplasmática y nuclear, se utilizaron como controles de carga las proteínas β -actina y Lamin B1, para normalizar los extractos citoplasmáticos y nucleares respectivamente. Para aquello, las membranas fueron *stripeadas* con solución Re-blot Plus Strong (Merck Millipore) a temperatura ambiente durante 20 minutos en agitación constante, para remover el anticuerpo utilizado anteriormente. Culminado este tiempo las membranas fueron lavadas con TBS-T 0,2 durante 5 minutos y bloqueadas durante 2 horas con leche descremada al 5%(fracción citoplasmática) o BSA al 5% (fracción nuclear). A continuación, fueron incubadas durante toda la noche a 4°C, con los anticuerpos primarios anti β -actina (1:5000, Sigma) en leche descremada al 5% y anti Lamin B1 (1:2000, Cell Signaling. Luego las membranas fueron lavadas con TBS-T 0,2% e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti IgG de mouse (1:10000, para β -actina) y anti IgG de conejo (1:5000, para Lamin B1), ambos conjugados a peroxidasa y diluidos en las soluciones de bloqueo respectivas. Finalmente, las membranas se lavaron exhaustivamente y se detectaron mediante quimioluminiscencia β -actina y Lamin B1, utilizando el kit ECL y el equipo Chemidoc XRS System (Biorad). Los resultados se expresaron como la razón de la abundancia de Nrf2 en los extractos nucleares versus

citoplasmáticos y se comparó respecto al control.

Inmunofluorescencia: Luego de finalizado el tiempo del experimento las células fueron fijadas para esto, la mitad del medio de las neuronas fue reemplazado con paraformaldehído al 4% dejándose durante 5 minutos, seguido por incubación con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. A continuación, las células se bloquearon y permeabilizaron durante 2 horas con, 0,25 % (v/v) Tritón X-100, albúmina sérica de bovino (BSA) al 3% (p/v) en tampón fosfato salino (PBS). Para la inmunodetección, las células fueron incubadas toda la noche a 4°C en una cámara húmeda, con anticuerpos anti Nrf2, MAP2 o β -tubulina III. Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS 1x y se incubaron con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 anti-conejo o Alexa Fluor 635 anti-ratón durante 2 horas sin luz, luego fueron lavadas 3 veces con PBS 1x y se incubaron durante 10 minutos con Hoescht. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS 1x y se procedió al montaje de los covers en portaobjetos.

Las imágenes de fluorescencia se adquirieron por microscopía confocal (Carl Zeiss LSM Pascal 5, Zeiss, Jena, Germany) utilizando el software LSM (Zeiss, Jena, Germany). Luego de adquiridas, se procesaron las imágenes utilizando el programa del NIH WCIF Image J.

Análisis estadístico: Se expresaron los resultados como el promedio \pm error estándar del promedio ($M \pm SEM$). El análisis de significancia estadística de los resultados se evaluó con el programa GraphPad Software (San Diego, CA), utilizando análisis de varianza (ANOVA) seguido de un post test, Tukey.

RESULTADOS

1. BDNF promueve la generación de ROS por un mecanismo dependiente de Ca^{2+}

De acuerdo a los trabajos previos del laboratorio que involucraron la participación de las señales intracelulares de Ca^{2+} en los mecanismos de plasticidad inducidos por BDNF, la primera aproximación para resolver las preguntas planteadas en esta tesis, fue estudiar si la incubación de las neuronas hipocampales en cultivo con BDNF, induce la generación de H_2O_2 citoplasmático, a través de un mecanismo dependiente del influjo de Ca^{2+} a través de los NMDAR y/o liberación de Ca^{2+} mediada por el receptor de Ryanodina. Para ello, se transfectaron los cultivos de neuronas hipocampales con el vector plasmidial Hyper-cyto, que permite expresar una proteína fluorescente que sensa H_2O_2 , de manera altamente específica, a través de la modificación oxidativa de sus cisteínas, que aumentan la emisión de fluorescencia y que es posible seguir en un curso temporal, (Belousov et al., 2006). Así, 24 horas post transfección de este vector, las células fueron tratadas durante 30 minutos con MK801 (10 μM), un antagonista no competitivo y altamente selectivo de los receptores NMDA (Wong et al., 1986). A continuación, a través de un ensayo de curso temporal, se determinaron los cambios en los niveles de fluorescencia de Hyper-cyto, respecto a sus niveles basales tras agregar BDNF 50 ng/ml. La Figura 4 A muestra el resultado de un experimento representativo, en el que se observan los cambios en los niveles de fluorescencia de las neuronas transfectadas y posteriormente incubadas *in situ* con BDNF (50 ng/ml), en presencia o no de MK801 o un control sin estímulo para verificar la estabilidad del sensor fluorescente. El trazo rojo muestra un incremento en la fluorescencia de Hyper-cyto tras agregar BDNF, este incremento se previno al bloquear los receptores de NMDA con MK801 (trazo naranja), en el trazo verde se muestran las células sin tratamiento, en donde se observa que la intensidad de fluorescencia se mantuvo constante durante todo el experimento. La figura 4 B muestra la cuantificación de los resultados obtenidos a partir de 4 experimentos independientes, en este se grafica la intensidad de fluorescencia obtenida a los

2800 segundos, normalizada con respecto a la fluorescencia basal del registro (F_{final}/F_0). De estos resultados, concluimos que BDNF incrementa la generación de H_2O_2 citoplasmático, y que este efecto es prevenido al pre-tratar las neuronas con MK801, sugiriendo que el influjo de Ca^{2+} a través de los NMDAR es necesario para generación de H_2O_2 inducida por BDNF.

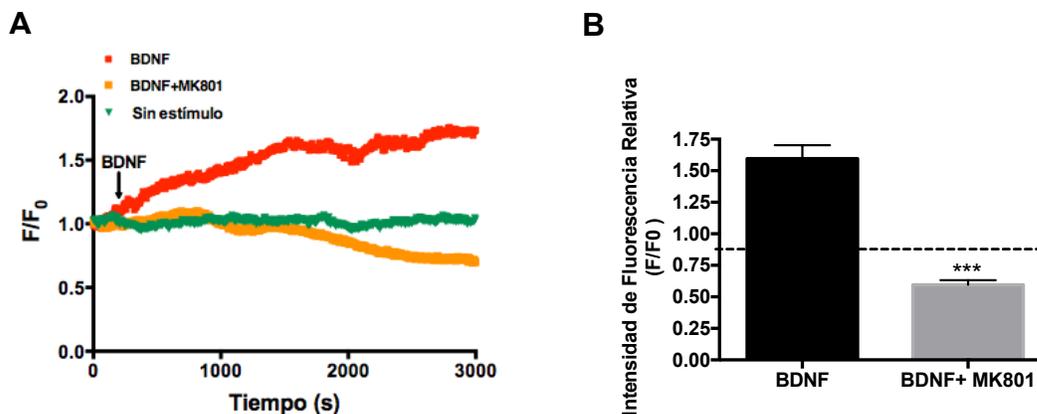


Figura 4. El influjo de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA es requerido para la generación de H_2O_2 inducida por BDNF. A) Curso temporal de la intensidad de fluorescencia de Hyper-cyto. Los cambios en la intensidad de fluorescencia se expresan como F/F_0 , donde F_0 corresponde a la fluorescencia basal registrada. La fluorescencia basal corresponde a los datos adquiridos luego de 200 segundos de registro, antes de la adición de BDNF 50 ng/ml (trazo rojo), BDNF en células preincubadas con MK801 (trazo naranja) o vehículo (línea verde). El MK801 fue preincubado durante 30 minutos previos a la adición de BDNF o vehículo. B) Cuantificación de las intensidades de fluorescencia registradas en 4 experimentos independientes. Los valores de F/F_0 fueron obtenidos al finalizar el experimento (2800 segundos) en cada condición y las barras representan el promedio \pm SE. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por test student (***) $p < 0,001$, $n=4$).

2. La generación de ROS inducida por BDNF requiere de la actividad del Receptor de Ryanodina.

Para evaluar la participación de la actividad de RyR, cultivos primarios de neuronas hipocampales previamente transfectadas con Hyper-cyto, se incubaron con 50 μM Ryanodina (Rya) durante 30 minutos, y a continuación se determinaron los cambios en los niveles de fluorescencia de Hyper-cyto tras adicionar BDNF 50

ng/ml. La figura 5 A muestra los resultados de un experimento representativo, en él que se observa que tras adicionar BDNF, se incrementa la intensidad de fluorescencia de la sonda (trazo rojo), esto no ocurre en presencia de Rya (trazo azul), observándose una disminución de los niveles de fluorescencia con respecto a BDNF y al control sin estímulo (trazo verde), donde las células fueron transfectadas con hyper-cyto, pero no se adicionó BDNF ni se pre-incubaron con Rya. La figura 5 B resume los resultados obtenidos a partir de 4 experimentos independientes, en esta se compara la intensidad de fluorescencia normalizada con respecto a la fluorescencia basal (F_{final}/F_0) obtenida a los 2800 del registro. De estos resultados se puede concluir que se requiere la liberación de Ca^{2+} desde el RE mediada por RyR, para la generación de H_2O_2 inducida por BDNF.

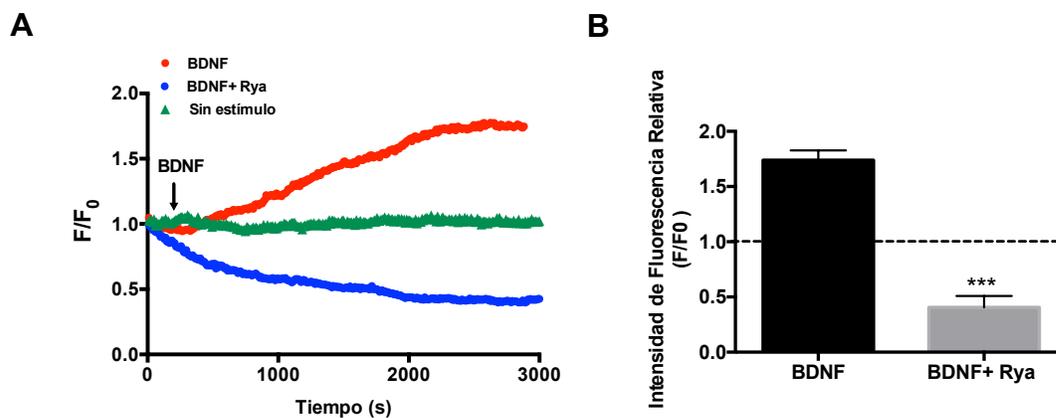


Figura 5. La Liberación de calcio mediada por RyR es requerida para generación de H_2O_2 inducida por BDNF. A) Curso temporal de la intensidad de fluorescencia de Hyper-cyto. Los cambios en la intensidad de fluorescencia se expresan como F/F_0 , donde F_0 corresponde a la fluorescencia basal registrada. Los datos fueron adquiridos luego de 200 segundos de registro de la fluorescencia basal y posterior adición de BDNF 50 ng/ml (trazo rojo), BDNF en presencia de Ryanodina 50 μM (trazo azul) y tras la adición de vehículo (trazo verde). B) Cuantificación de las intensidades de fluorescencia registradas en 4 experimentos independientes. Los valores de F/F_0 fueron obtenidos al finalizar el experimento (2800 segundos) en cada condición, las barras representan el promedio \pm SE. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por test student (***) $p < 0,001$, $n=4$).

3. La generación de H₂O₂ inducida por BDNF requiere de las ROS provenientes de la NOS y NOX2.

Dado que la generación de H₂O₂ inducida por BDNF requiere del influjo de Ca²⁺ y posterior amplificación de la señal de Ca²⁺ mediada por RyR, el siguiente paso fue determinar las fuentes generadoras de ROS que contribuyen a los incrementos de H₂O₂, tras la estimulación de las neuronas hipocampales con BDNF. Para ello, cultivos primarios transfectados con el vector Hyper-cyto, fueron pre-incubados con los inhibidores específicos de las enzimas productoras de ROS la NOS y NOX. Así, para estudiar la participación de la NOS, en la generación de ROS inducida por BDNF, se utilizó el inhibidor general de las NOS, L-NAME (10 μM). L-NAME es un compuesto análogo de la arginina, que inhibe competitivamente todas las isoformas de la NOS (constitutiva e inducible), bloqueando de esta manera la principal enzima productora de NO[•] (Rees et al., 1990). Las células transfectadas se incubaron con L-NAME durante 30 minutos y se registraron los cambios en la intensidad de fluorescencia de Hyper-cyto mediante microscopía confocal, desde el nivel basal y tras la adición de BDNF (50 ng/ml). En la figura 6 A se muestra un experimento representativo, donde se observa que tras la adición de BDNF, se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia de la sonda, por lo tanto, un aumento en la producción de H₂O₂ (trazo rojo). Este efecto es prevenido en las neuronas incubadas con L-NAME (10 μM) (trazo celeste). La Figura 6 B resume la cuantificación de 4 experimentos realizados con cultivos independientes, donde se grafican la intensidad de fluorescencia relativa, correspondientes a los niveles de fluorescencia registrados a los 2800 segundos de experimento, y obtenidos al tratar las células sólo con BDNF o con BDNF en presencia del inhibidor L-NAME,. De estos resultados, concluimos que el bloqueo de la actividad de la NOS previene la producción de H₂O₂ inducida tras la adición de BDNF.

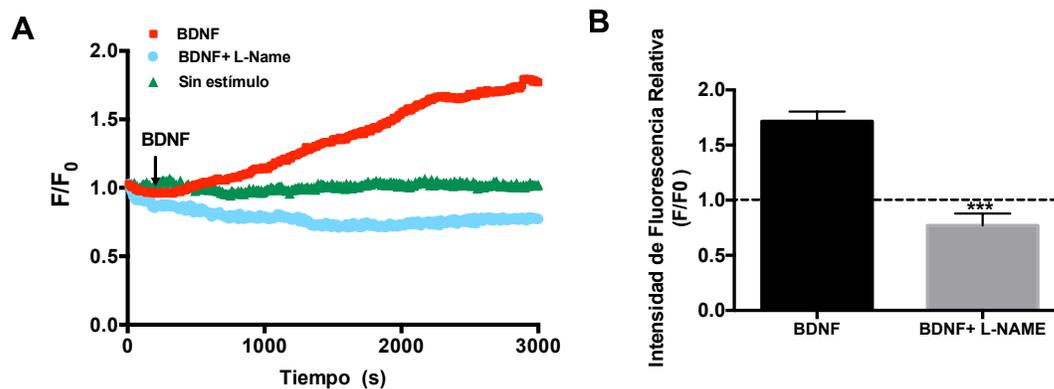


Figura 6. La pre-incubación con L-NAME previene la producción de H₂O₂ inducida por BDNF.

A) Curso temporal de la intensidad de fluorescencia de Hyper-cyto. Los cambios en la intensidad de fluorescencia se expresan como F/F_0 , donde F_0 corresponde a la fluorescencia basal, que fueron adquiridos durante 200 segundos previos a la adición de BDNF 50 ng/ml en (trazo rojo), BDNF en células pre-incubadas con L-NAME 10 μ M (trazo celeste) o tras la adición de vehículo (trazo verde). B) Cuantificación de las intensidades de fluorescencia registradas en 4 experimentos independientes. Los valores de F/F_0 fueron obtenidos al finalizar el experimento (2800 segundos) en cada condición, las barras representan el promedio \pm SE. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por test student (***) $p < 0,001$, $n=4$).

A continuación estudiamos la participación de la NOX en la vía de señalización de BDNF, utilizando el péptido quimérico gp91 ds-tat (1,5 μ M). Este péptido contiene una pequeña secuencia involucrada en la unión de las subunidades $p47^{phox}$ y $gp91^{phox}$, unida a una secuencia de 9 aminoácidos homóloga a la encontrada en la cubierta del virus del VIH (VIH-tat), que permite la internalización al citoplasma (Rey et al., 2001). De esta manera, gp91 ds-tat previene la asociación de las subunidades $p47^{phox}$ y $gp91^{phox}$, impidiendo el proceso fundamental que permite el acoplamiento y actividad de la NOX. Como control, se utilizó el análogo inactivo gp-scrambled (gpsc) (1,5 μ M), que contiene la secuencia de gp91 ds-tat ordenada de modo aleatorio y que resulta inactiva.

La figura 7 A muestra en un experimento representativo, el curso temporal de los cambios de la intensidad de fluorescencia de Hyper-Cyto. En este se observa que, tras la adición de BDNF las células incubadas durante 30 minutos con gp91 ds-tat

(trazo morado), no se produce el incremento en la señal fluorescente que si se produce en las células incubadas con gpscr (trazo rojo). Las células sin estimular, no mostraron cambios significativos en la intensidad de fluorescencia (trazo verde). La figura 7 B resume la cuantificación de 4 experimentos independientes, en un gráfico de barras, donde se expresan los valores relativos de fluorescencia (F/F_0) obtenidos a los 2800 segundos del experimento, con el respectivo pretratamiento que recibieron las células. De estos resultados se concluye que la generación de ROS inducida por BDNF requiere de la actividad de la NOX2, ya que la inhibición de su actividad previno la generación de H_2O_2 inducido por BDNF.

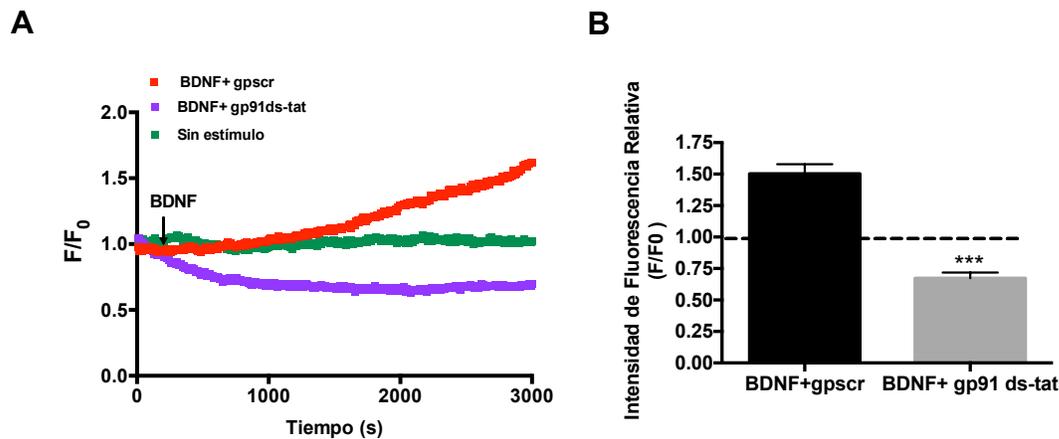


Figura 7. La NOX2 participa de la generación de H_2O_2 inducida por BDNF. A) Curso temporal de la intensidad de fluorescencia de Hyper-cyto. Los cambios en la intensidad de fluorescencia se expresan como F/F_0 , donde F_0 corresponde a la fluorescencia basal registrada. Los cambios en la intensidad de fluorescencia se expresan como F/F_0 , donde F_0 corresponde a la fluorescencia basal, que fueron adquiridos durante 200 segundos previos a la adición de BDNF 50 ng/ml de BDNF 50 ng/ml en presencia de gpscr 1,5 μ M (trazo rojo), BDNF en presencia de gp91 ds-tat 1,5 μ M (trazo morado) y tras la adición de vehículo (trazo verde). B) Cuantificación de las intensidades de fluorescencia registradas en 4 experimentos independientes. Los valores de F/F_0 fueron obtenidos al finalizar el experimento (2800 segundos) en cada condición, las barras representan el promedio \pm SE. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por test student (***) $p < 0,001$, $n=4$).

4. Las señales de calcio mediadas por RyR requieren de la actividad de NOS y NOX2.

Diferentes trabajos indican que las ROS/RNS estimulan la actividad de RyR (Hidalgo & Donoso, 2008). De acuerdo a esto, se estudió el efecto del tratamiento de los cultivos neuronales con L-NAME (10 μ M) o gp91 ds-tat (1,5 μ M), sobre la liberación de Ca^{2+} mediada RyR. Para ello, se utilizaron cultivos preincubados durante 30 minutos con los inhibidores de la NOS o la NOX2 que posteriormente fueron cargados con la sonda fluorescente indicadora de Ca^{2+} Fluo4-AM. Estas células se estimularon con 4-cloro-metilcresol (4-CMC), un agonista específico de RyR, para producir la liberación de Ca^{2+} mediada por RyR. La Figura 8 A muestra la respuesta de las neuronas controles o que fueron pre-tratadas con L-NAME, observándose que la liberación de Ca^{2+} inducida por 4-CMC, (mediada por RyR), es prevenida en las células que fueron incubadas con este inhibidor. La figura 8 B resume la cuantificación de 4 experimentos independientes, en este se grafica la intensidad fluorescencia relativa obtenida en cada condición a los 800 segundos de registro. El análisis de este experimento nos permite concluir que la actividad de la NOS es necesaria para inducir la liberación de Ca^{2+} desde el RE mediada por RyR.

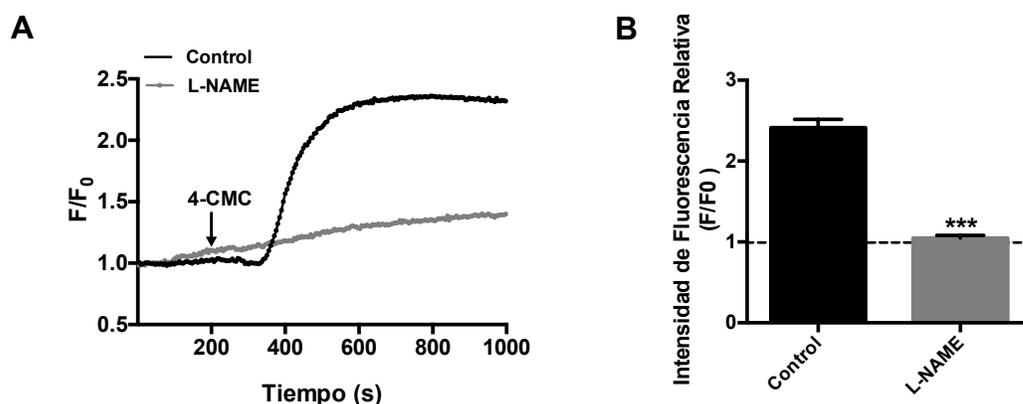


Figura 8. Las señales de calcio mediadas por RyR requieren de la actividad de la NOS. Neuronas hipocampales se incubaron con L-NAME (10 μ M) durante 30 minutos y luego fueron cargadas con Fluo-4 AM. Posteriormente, se estimuló la liberación de Ca^{2+} con el agonista de RyR, 4-CMC (0,5 mM). A) El gráfico muestra el curso temporal de los cambios de intensidad de fluorescencia luego de la adición de 4-CMC, en neuronas controles (trazo negro) o en presencia de L-NAME (trazo gris). Los cambios en la intensidad de fluorescencia se expresan como F/F_0 , donde F_0 corresponde a la fluorescencia basal registrada. B) El gráfico muestra la cuantificación de los valores F/F_0 obtenidos a los 800 segundos de registro para cada condición, que corresponden a 6 experimentos independientes, las barras representan el promedio \pm SE. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por test student (***) $p < 0,0001$, $n=6$).

Paralelamente se evaluó la participación de la actividad de la NOX en la liberación de Ca^{2+} mediada por RyR. Para ello, los cultivos primarios de neuronas hipocampales fueron incubados con gp91 ds-tat o gp91 ds-sc y se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para la determinación de señales de Ca^{2+} . La figura 9 A muestra un experimento representativo de las neuronas pre-tratadas con gp91 ds-tat o gp91 ds-sc, que luego fueron estimuladas con 4-CMC (0,5 mM). Se observa que los cambios en la intensidad de fluorescencia son significativamente mayores en las neuronas tratadas previamente con gp91 ds-sc que fueron estimuladas con 4-CMC, que en las neuronas en que se inhibió la actividad de la NOX2 con gp91 ds-tat. La figura 9 B muestra la cuantificación de 6 experimentos independientes, donde se comparan los valores intensidad de fluorescencia relativa tras 800 segundos de experimento. De estos resultados se concluye que

las señales de Ca^{2+} mediadas por RyR, que fueron inducidas por el tratamiento de las células con su agonista específico, 4-CMC, son prevenidas al inhibir la actividad de la NOX 2, sugiriendo que existe una conversación cruzada entre generación de ROS y las señales de Ca^{2+} mediadas por RyR.

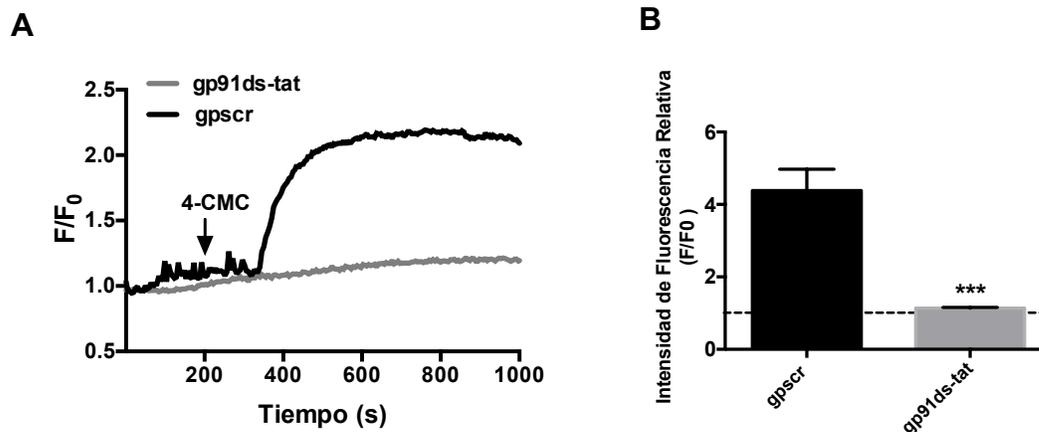


Figura 9. La actividad de la NOX2 es requerida para la liberación de calcio mediada por RyR. Neuronas hipocampales se incubaron con gp91 ds-tat (1,5 μM) o gpscr (1,5 μM) durante 30 minutos y a continuación fueron cargadas con Fluo-4 AM, luego se estimuló la liberación de Ca^{2+} con el agonista de RyR, 4-CMC (0,5 mM). A) El gráfico muestra el curso temporal de los cambios intensidad de fluorescencia luego de la adición de 4-CMC, en presencia de gp91 ds-tat (trazo gris) o gpscr (trazo negro). Los cambios en la intensidad de fluorescencia se expresan como F/F_0 , donde F_0 corresponde a la fluorescencia basal registrada. B) El gráfico muestra la cuantificación de los valores F/F_0 obtenidos a los 800 segundos de registro para cada condición, correspondientes a 6 experimentos independientes, las barras representan el promedio \pm SE. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por test student (***) $p < 0,0001$, $n = 6$.

5. Los incrementos en la expresión de RyR2 inducidos por BDNF son regulados por ROS.

Para determinar si los incrementos en los niveles de expresión de RyR2 inducidos por BDNF requieren de la señalización mediada por las ROS, se utilizó N-acetilcisteína (NAC), un precursor de glutatión y atrapador de ROS para mantener los cultivos en un ambiente reducido. De esta manera, los cultivos primarios de neuronas hipocampales fueron pre incubados durante 30 minutos con NAC 10 mM, y a continuación fueron tratados con BDNF (50 ng/ml) durante 6h, manteniendo la presencia de NAC en el medio. Terminadas las 6 horas de incubación, se realizó extracción de mRNA y se prepararon extractos de proteínas para ser analizados por qPCR y western blot, respectivamente. La Figura 10 A muestra los cambios en los niveles de transcrito de RyR2 para las diferentes condiciones. Los resultados obtenidos muestran que la incubación con BDNF durante 6 horas induce un incremento en el transcrito de RyR2, reproduciendo los resultados previamente publicados por el laboratorio (Adasme et al., 2011). Sin embargo, la incubación de las células con NAC previno este efecto. Paralelamente, cuando se evaluó bajo las mismas condiciones, los niveles relativos de proteína RyR2 normalizados con respecto a la expresión de β -actina, estos mostraron un incremento significativo inducido por BDNF, efecto que no se observó en presencia de NAC (Figura 10 B). Estos resultados sugieren que los incrementos en los niveles de transcrito y proteína RyR2 inducidos por BDNF requieren de la generación de ROS.

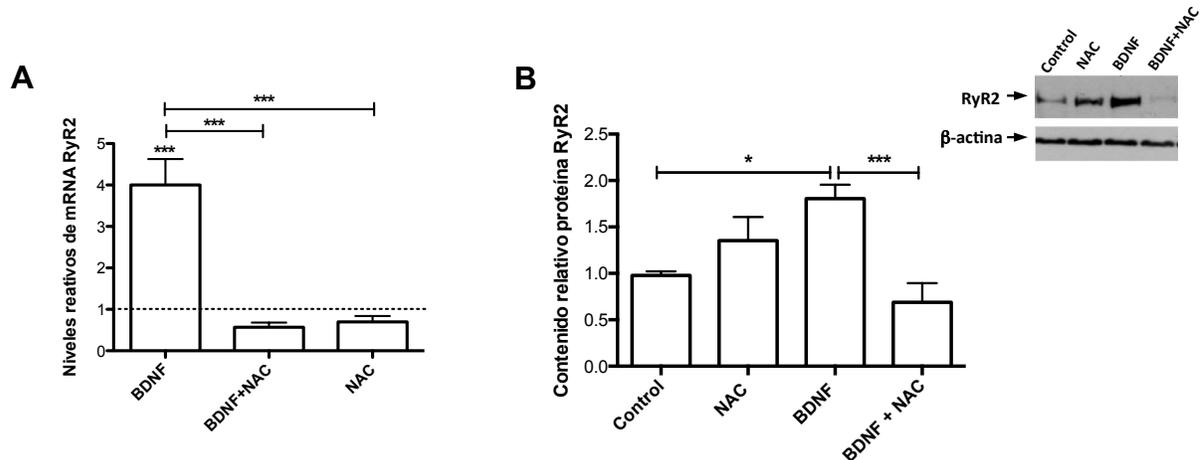


Figura 10. NAC previene los incrementos en los niveles del transcrito y de la proteína de RyR2, inducidos por BDNF. Cultivos primarios de neuronas hipocampales fueron preincubadas por 30 minutos con NAC y luego tratadas con BDNF o mantenidas con NAC durante 6 horas. A) Niveles relativos del transcrito de RyR2 en condiciones indicadas, determinados por qPCR; B) Imagen representativa y gráfico correspondiente a la cuantificación densitométrica para determinar los cambios en el contenido de proteína RyR2 de las condiciones. En cada caso, los valores correspondientes a mRNA o proteína fueron normalizados por los niveles de transcrito o proteína de β -actina. Se grafican los promedios \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía, post test Tuckey's, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

6. Los incrementos en el contenido de proteína RyR2 inducidos por BDNF requieren de la actividad de la NOS.

Para evaluar si la señalización intracelular inducida por BDNF que participa en los incrementos del contenido de proteína RyR2, requiere de la actividad de la NOS, los cultivos primarios de células hipocampales fueron incubados con L-NAME (10 μ M) durante 30 minutos, previo al estímulo con BDNF (50 ng/ml). Culminado las 6 horas de incubación con BDNF en presencia de L-NAME, se determinó la abundancia del transcrito y de la proteína RyR2. La figura 11 A muestra el gráfico que resume los experimentos de qPCR realizados, el tratamiento por 6 horas con BDNF produce un incremento en los niveles de transcrito de RyR2, mientras que en las células incubadas con L-NAME se observa una disminución respecto al nivel basal del mensajero de RyR2, el pre-tratamiento con L-NAME impide el

aumento en los niveles de transcrito RyR2 inducidos por BDNF. Concordante con estos resultados, el análisis por western blot de los niveles de proteína RyR2 muestra un comportamiento similar (Figura 11 B), donde el incremento en el contenido de proteína RyR2 es prevenido al incubar las células con L-NAME. De estos resultados se puede concluir que, la señalización inducida por BDNF, necesaria para inducir los incrementos en el mensajero y proteína RyR2 requiere de la actividad de la NOS.

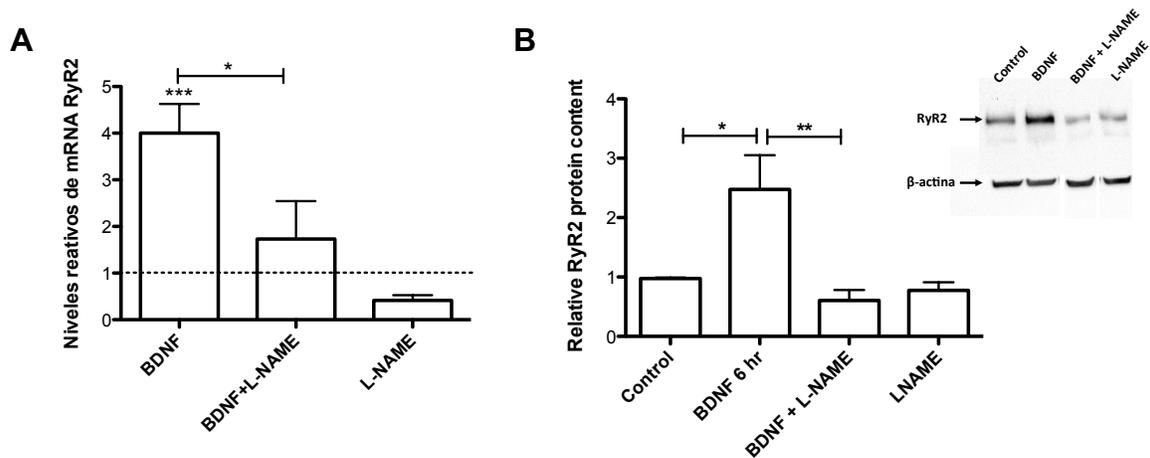


Figura 11. Los incrementos en los niveles de transcrito y de la proteína RyR2 inducidos por BDNF, requieren de la actividad de la NOS. Neuronas hipocampales en cultivo primario fueron preincubadas 30 minutos con L-NAME y tratadas con vehículo o 50 ng/ml BDNF por 6 horas. Los niveles de transcritos y proteína RyR2 fueron determinados por (A) qPCR o (B) western blot. Los valores correspondientes a mRNA y proteínas fueron normalizados por los niveles de expresión de β -actina. Se grafican los promedios \pm SEM de 4 experimentos independientes; ANOVA, de una vía, post test Tuckey, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

7. El incremento en el contenido de proteína RyR2 inducido por BDNF requiere de la actividad de la NOX2.

Para evaluar si la señalización intracelular inducida por BDNF que participa en el incremento del contenido de proteína RyR2, requiere de la actividad de la NOX2, los cultivos hipocampales fueron pre-incubados durante 30 minutos con el péptido inhibidor de la NOX2, gp91-dstat (1,5 μ M) o su análogo inactivo gpscr. Transcurrido este periodo, se incubaron con BDNF (50 ng/ml) durante 6 horas, y se mantuvieron en presencia de estos péptidos, transcurrido este tiempo se determinó la abundancia relativa de la proteína de RyR2 por western blot. El gráfico de la Figura 12 A muestra los cambios en los niveles relativos de proteína RyR2 normalizados con respecto a la expresión de la proteína β -actina. El tratamiento con gp91-dstat previene el incremento del contenido proteico de RyR2 generado tras la incubación con BDNF, efecto que sí ocurre cuando BDNF es incubado en presencia del péptido inactivo, gpscr. En la Figura 12 B observamos una imagen representativa de los westerns blot realizados.

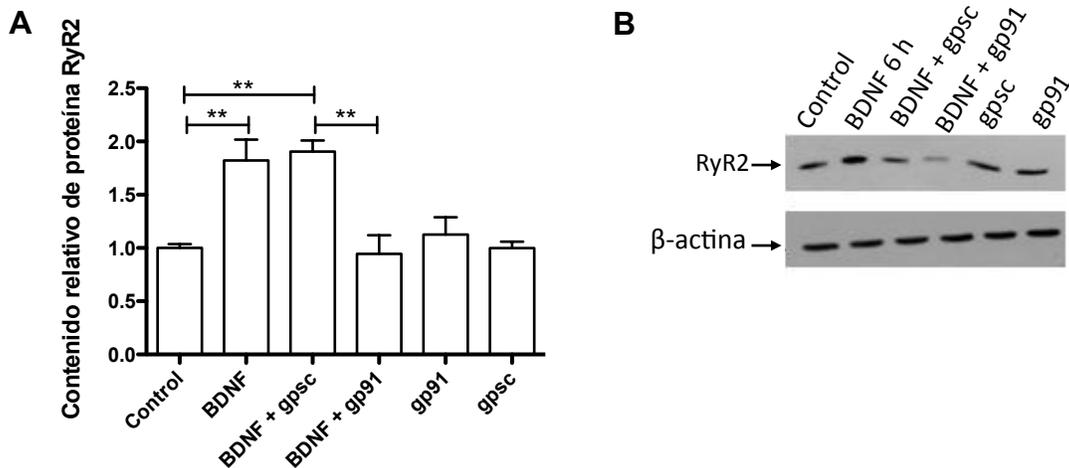


Figura 12. El incremento en el contenido de proteína RyR2 inducido por BDNF requiere de la actividad de la NOX2. Neuronas hipocampales de cultivo primario fueron preincubadas 30 minutos con el péptido inhibidor de la NOX (gp91-dstat) o el péptido análogo inactivo (gp91), y posteriormente tratadas con vehículo o BDNF por 6 h. A) Gráfico correspondiente a la cuantificación densitométrica de los westerns blot, para determinar los cambios en el contenido de proteína RyR2. B) Imagen representativa correspondiente a la cuantificación densitométrica para determinar los cambios en el contenido de proteína RyR2. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes, promedio \pm SEM, analizados por ANOVA, de una vía, post test Tuckey, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

8. BDNF induce la translocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2.

Debido a que nuestros resultados indican que las ROS generadas tras la incubación con BDNF forman parte de las vías de señalización implicadas en los incrementos en los niveles de mensajero y proteína RyR2, estudiamos si este tipo de señalización mediada por ROS podría gatillar la expresión génica, a través de un factor de transcripción sensible a este tipo de señales. De acuerdo a esto, seleccionamos al Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, conocido como NFE2L2 o Nrf2, que es un factor transcripcional que se activa en respuesta a ROS. Así, exploramos su participación en la vía de señalización activada por BDNF, determinando la inducción de su translocación nuclear. Para determinar la temporalidad de este evento realizamos experimentos de estimulación con BDNF

(50 ng/ml) por diferentes tiempos, evaluando por western blot el tiempo al cual Nrf2 migra al núcleo. Los tiempos de estimulación con BDNF analizados fueron 3, 6 y 24 horas. Transcurrido este periodo, se prepararon fracciones citoplasmáticas y nucleares, y se determinó la abundancia relativa de la proteína Nrf2 en ambas fracciones mediante western blot. La Figura 13 A muestra las imágenes de los westerns blots para cada condición representativas de los 4 experimentos realizados. La Figura 13 B, muestra la cuantificación de los experimentos, donde el contenido relativo de Nrf2 en la fracción citoplasmática fue normalizado por el contenido de β -actina y el contenido de Nrf2 nuclear fue normalizado por la expresión la proteína de la membrana nuclear, lamina B1. La incubación con BDNF (50 ng/ml) durante 3, 6 o 24 horas, no genera variaciones significativas de la expresión de Nrf2 a nivel citoplasmático, pero sí se observa un aumento de los niveles nucleares de Nrf2 tras 6 horas de incubación con BDNF. Estos resultados sugieren que BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo luego de 6 h de incubación.

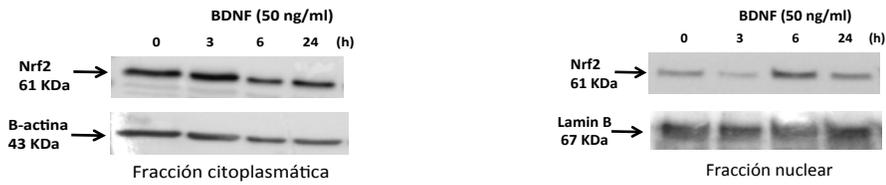
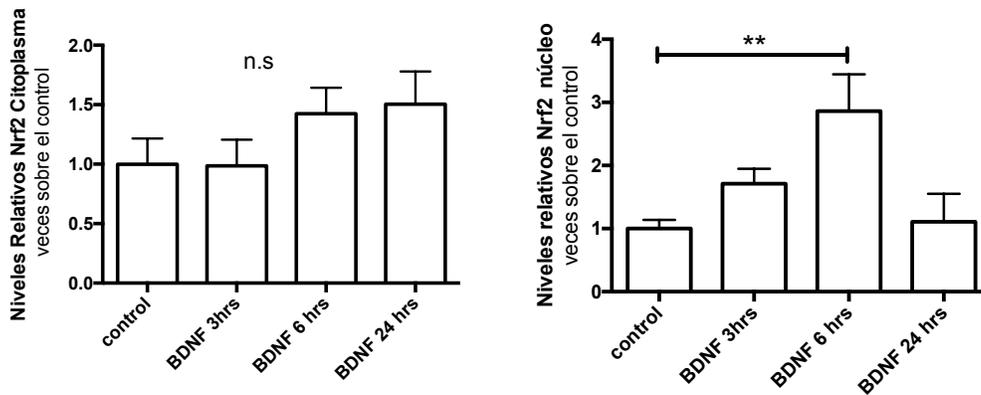
A**B**

Figura 13. BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo. A) Imagen representativa de los niveles proteicos de Nrf2 en la fracción citoplasmática o núcleo, con los respectivos controles de carga β -actina y Lamin B1. B) Cuantificación de los niveles relativos de Nrf2 citoplasmáticos y nucleares, normalizados por el control de carga β -actina y Lamin B1 respectivamente. Los datos corresponden a un $n = 4$, Promedio \pm SEM, ANOVA post test Tukey's, ** $p < 0,01$.

Debido a que nuestros cultivos poseen de un bajo, pero no despreciable, porcentaje de células gliales, decidimos reproducir este experimento por inmunofluorescencia para evaluar el contenido de Nrf2 particularmente en células neuronales, para así confirmar los resultados obtenidos mediante western blot. Para ello, se realizó un nuevo ensayo temporal en que las neuronas hipocampales fueron incubadas durante 1, 3 y 6 horas con BDNF 50 ng/ml. Culminado el tiempo del experimento, se realizó la inmunodetección de Nrf2 mediante inmunofluorescencia. La Figura 14 A muestra imágenes representativas de las inmunofluorescencias de una serie de 3 experimentos independientes, obtenidas por microscopía confocal. Se observa que Nrf2 (verde) presenta marca fluorescente tanto en el soma como en las dendritas, con un patrón de distribución homogéneo en las neuronas hipocampales. La Figura 14 B resume los resultados de 3 experimentos de inmunofluorescencia independientes, donde se

cuantificaron, 6 regiones ópticas de interés (ROI) en cada imagen (3 en el citoplasma y 3 en el núcleo). El análisis de estos resultados confirman los datos obtenidos mediante western blot ya que, tras cuantificar las células que presentaban la marca para Nrf2 y para β -tubulina III, que corresponden a neuronas, se observa que tras 6 horas de incubación con BDNF 50 ng/ml, los niveles nucleares de Nrf2 incrementan significativamente en comparación con las neuronas control no tratadas.

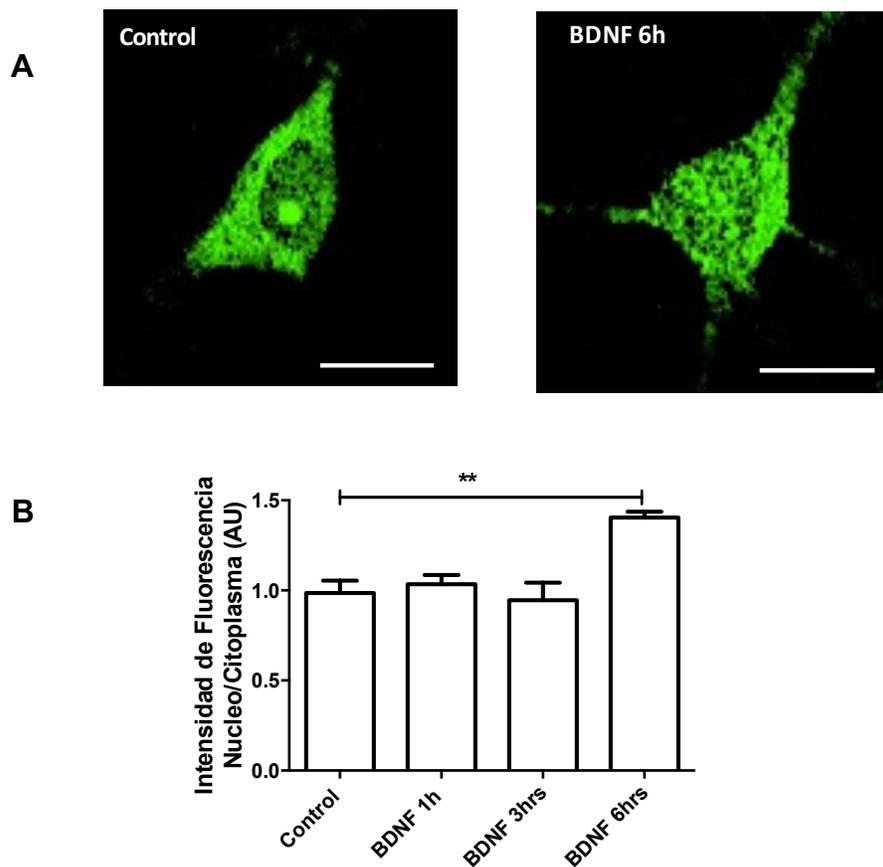


Figura 14. BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo en células neuronales.

A) Imágenes representativas de neuronas hipocámpales incubadas con vehículo o BDNF por 6 horas, obtenidas por microscopía confocal, objetivo 63X. Nrf2 (verde). Barra de escala de 20 μ m.

B) Cuantificación de los niveles de fluorescencia de Nrf2: se cuantificó la intensidad de fluorescencia de Nrf2 en el núcleo y citoplasma neuronal. El gráfico representa la razón de las intensidades de fluorescencia entre el núcleo y el citoplasma. $n=3$, se grafica el promedio \pm SE, el análisis estadístico se realizó por ANOVA, post test Tukey's, $**p<0,01$.

9. La translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF, requiere de las señales de calcio mediadas por RyR y de la generación de ROS.

Para estudiar si la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF requiere de la amplificación de la señal de Ca^{2+} mediada por RyR o de la generación de ROS/RNS inducidos por BDNF, los cultivos hipocampales fueron incubados durante 30 minutos con Ryanodina (Rya) 50 μM (concentración que inhibe la actividad de RyR) o NAC 10 mM, a continuación, se trataron con BDNF 50 ng/ml, y se mantuvieron con la incubación con Rya o NAC durante 6 horas más. Transcurrido el tiempo de incubación, se prepararon las fracciones citoplasmáticas y nucleares, y se determinó la abundancia relativa de la proteína Nrf2 en ambas fracciones mediante western blot. La figura 15 A muestra imágenes representativas de los westerns blot de Nrf2 tanto de la fracción citoplasmática como nuclear, y sus respectivos controles de carga. La Figura 15 B reúne los resultados de 5 experimentos independientes, donde se comparan los niveles relativos de Nrf2 en la fracción citoplasmática y nuclear por separado. Los resultados muestran que BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo, sin embargo, este efecto es bloqueado cuando se mantiene las células en presencia del antioxidante NAC, así como en presencia de Ryanodina, que inhibe la actividad de RyR. Estos resultados sugieren que la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF requiere tanto de la señalización redox, como de las señales intracelulares de Ca^{2+} mediadas por RyR.

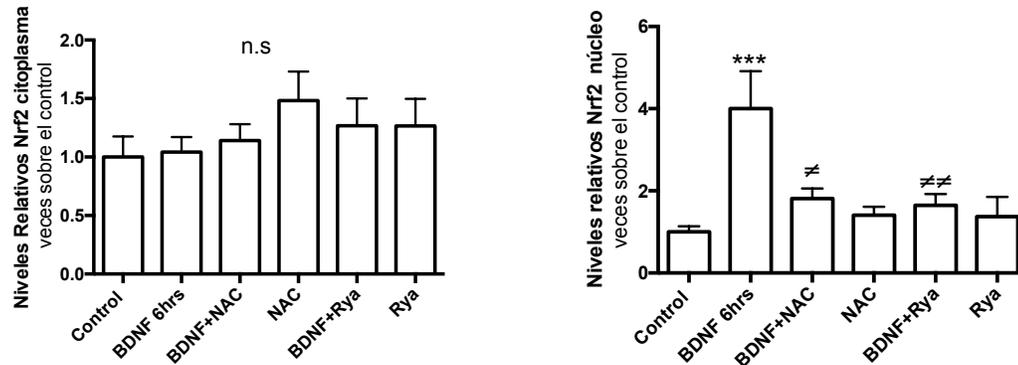
A**B**

Figura 15. BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo dependiente de la producción de ROS y la actividad de RyR. A) Imágenes representativas de los niveles proteicos de Nrf2 en la fracción citoplasmática y nuclear. La cuantificación de β-actina y Lamin B1 fueron utilizadas como controles de carga para normalizar el contenido proteico de las fracciones citoplasmáticas y nucleares, respectivamente. B) Gráficos que corresponden a la cuantificación de los niveles relativos de Nrf2 en el citoplasma normalizados por los niveles de β-actina y los niveles de Nrf2 en el núcleo normalizados por los niveles de Lamin B1 correspondientes a 5 experimentos independientes.,n= 5. Promedio ± SEM, ANOVA, post test Tukey's, ***p<0,001 versus el control; ≠p<0,05, ≠≠p<0,01 versus BDNF.

10. BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo independiente de la vía ERK.

Para estudiar si la vía de las ERK participa en la regulación de la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF, se preincubaron las células hipocampales con U0126 10 μ M, un inhibidor de la MEK (quinasa que fosforila y activa ERK), durante 30 minutos, y a continuación se adicionó BDNF 50 ng/ml, y se mantuvieron las células en presencia del inhibidor durante 6 horas. Luego, se prepararon las fracciones de citoplasma y núcleo, y se determinó mediante western blot el contenido proteico de Nrf2 en ambas fracciones. La figura 16 A muestra imágenes representativas del contenido proteico de Nrf2 en las fracciones citoplasmática y nuclear. La Figura 16 B resume los resultados obtenidos a partir de 5 experimentos independientes, donde no se observan cambios significativos en la abundancia de Nrf2 en la fracción citoplasmática, mientras que en la fracción nuclear se evidencian incrementos en el contenido proteico de Nrf2 sólo tras 6 horas de estimulación con BDNF, en concordancia con los resultados anteriores. Sin embargo, cuando se inhibe la actividad de las ERK $\frac{1}{2}$ con U0126, la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF permanece, sugiriendo que la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF no requiere de la actividad de las ERK.

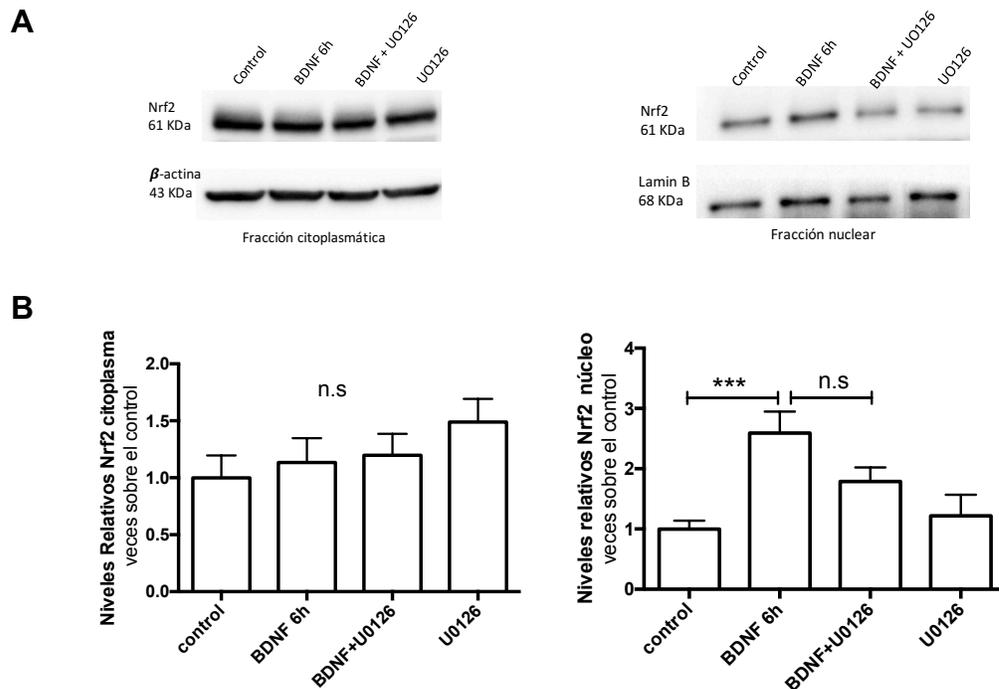


Figura 16. La vía de las ERK no participa en la señalización intracelular inducida por BDNF que promueve a translocación de Nrf2 al núcleo. A) Imágenes representativas de la expresión de Nrf2 en las fracciones citoplasmáticas y nucleares evaluadas por western blot. β -actina y Lamin B1 fueron utilizadas como controles de carga para normalizar las fracciones citoplasmáticas y nucleares. B) Gráficos que resumen los resultados de 5 experimentos independientes. Los resultados fueron expresados como los niveles relativos de Nrf2 en el citoplasma y los niveles de Nrf2 en el núcleo, normalizados cada uno por su control de carga. Los datos representan un $n=5$. Promedio \pm SEM, ANOVA, post test Tuckey's *** $p<0,001$ versus el control.

11. La vía de PI3K participa en la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF.

Para evaluar si la vía de la PI3K participa en los mecanismos de señalización que inducen la translocación de Nrf2 al núcleo inducidos por BDNF, los cultivos hipocampales fueron incubados durante 30 minutos con el inhibidor de la PI3K, LY294002 (10 μ M) y luego fueron estimulados con BDNF 50 ng/ml por 6 horas, en presencia de este inhibidor. Finalizado el tiempo de incubación, se prepararon las fracciones citoplasmáticas y nucleares y se determinaron los niveles proteicos de Nrf2 en ambas fracciones por western blot. La figura 17 A muestra las imágenes

representativas del contenido proteico de Nrf2 tanto en la fracción citoplasmática, como en la nuclear, con sus respectivos controles de carga β -actina y Lamin B1. La figura 17 B muestra los gráficos derivados de la cuantificación de 5 experimentos independientes, en ellos se observa que la determinación de Nrf2 en la fracción citoplasmática no presenta variaciones significativas en las distintas condiciones. Por el contrario, el análisis de las fracciones nucleares evidencia un incremento en el contenido nuclear de Nrf2 tras 6 h de estimulación con BDNF, efecto que es prevenido en las células pre-incubadas con el inhibidor de la PI3K, LY294002.

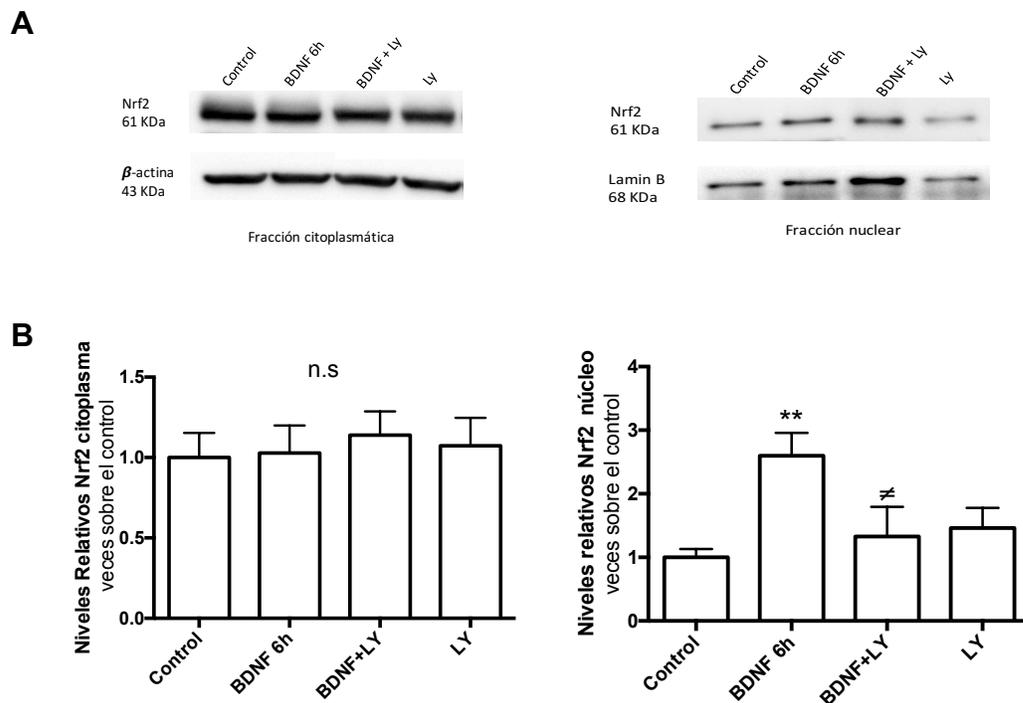


Figura 17. La PI3K participa en la señalización intracelular inducida por BDNF que promueve a translocación de Nrf2 al núcleo en neuronas hipocampales. A) Imágenes representativas de los niveles proteicos (evaluadas por western blot) de Nrf2 en las fracciones citoplasmáticas y nucleares de las diferentes condiciones. β -actina y Lamin B1 fueron utilizadas como controles de carga para normalizar las fracciones citoplasmáticas y nucleares. B) Gráficos que resumen los resultados de 5 experimentos independientes, que fueron expresados como los niveles relativos de Nrf2 en el citoplasma y en el núcleo, normalizados cada uno por su control de carga. Los datos representan un $n = 5$. Promedio \pm SEM, ANOVA, post test Tuckey's, ** $p < 0,01$ versus el control; $\neq p < 0,05$ versus BDNF.

DISCUSIÓN

El BDNF es uno de los miembros de la familia de las neurotrofinas que ha adquirido mayor relevancia durante las últimas décadas. Esto debido a la gran variedad de efectos beneficiosos que tienen sobre el sistema nervioso (Sakata, 2014). Entre ellos, es un factor esencial para los cambios estructurales en las espinas dendríticas (Narisawa-Saito et al., 2002; Tyler and Pozzo-Miller, 2003; Alonso et al., 2005) y el establecimiento de la LTP (Frey et al., 1996; Nguyen and Kandel, 1997), además esta neurotrofina se sintetiza, transporta y secreta durante los eventos celulares que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria (Leal et al., 2014). En este contexto, se ha destacado su posible uso como herramienta terapéutica, y se ha relacionado la carencia de su actividad fisiológica con el riesgo de sufrir deterioros cognitivos o enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (Song et al., 2015). En este trabajo, determinamos que tras la adición de BDNF (50 ng/ml), se generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que requieren la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA y la amplificación de estas señales mediadas por RyR, estos procesos también son necesarios para el incremento en la expresión de RyR2. Estos hallazgos resultan muy relevantes pues sugieren una conversación cruzada entre las señales de Ca^{2+} y la generación de ROS, inducidas tras la estimulación con BDNF.

1.- BDNF y ROS

La unión de BDNF a su receptor TrkB, desencadena la activación de diversas vías de señalización que incluyen la vía de las ERK, PI3K y PLC (Numakawa et al., 2010a). Los resultados de esta tesis evidencian la participación de las ROS como nuevos mensajeros en la cascada de señalización intracelular inducida por BDNF, sugiriendo que tras la unión de BDNF a su receptor, se produce un influjo de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA, el que se requiere para la generación de ROS inducida por BDNF, siendo esencial también en este proceso la actividad de la NOS y de la NOX2. En relación con estos resultados, un reporte de la literatura muestra que en cultivo primario de neuronas corticales de ratón estimuladas con

NMDA, la entrada de Ca^{2+} a través de estos receptores, es un factor fundamental para la producción de superóxido dependiente de la NOX, ya que este efecto es bloqueado al tratar las células con apocinina, un inhibidor de NOX, o al estimular células provenientes de ratones *Ncf1*^{-/-}, que carecen de la subunidad p47phox que forma parte del complejo NOX (Brennan et al., 2009). Asimismo, Girouard, H. y cols. 2009, mostraron que la NOX2 es la principal fuente de ROS inducida tras la activación de la NOS y la vía de cGMP-PKG por NMDA, probando que la producción de NO un paso crítico en la activación de la NOX2 (Girouard et al., 2009). Otro estudio que investigó los mecanismos que subyacen el proceso de potenciación a largo plazo tardía (L-LTP), propuso que el NO forma parte de la señalización requerida para la mantención de la L-LTP, proceso que es dependiente de la síntesis de proteínas, en el que también está involucrada la liberación de Ca^{2+} mediada por RyR, que desencadena la fosforilación de CREB, el cuál es considerado un factor transcripcional esencial para la consolidación de los procesos de aprendizaje y memoria (Lu and Hawkins, 2002). En este contexto, los resultados presentados en esta tesis sugieren un mecanismo similar, pues muestran que la generación de ROS inducida por BDNF requiere de la actividad de RyR y de la NOS, ya que su producción se inhibe en presencia de Ryanodina en concentraciones inhibitorias o de L-NAME. Estos concuerdan con más evidencias de la literatura que han mostrado que las ROS son mensajeros clave en los procesos de plasticidad sináptica, modulando la actividad de diversas proteínas entre ellas, proteínas quinasas, como las ERK, esenciales para el establecimiento del LTP (Massaad and Klann, 2011). Otro trabajo reciente en cultivo de neuronas hipocámpales mostró que la adición de BDNF induce la generación de NO[•], tanto a nivel somático como dendrítico, lo que requiere de la unión de BDNF al receptor TrkB, y subsecuente incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular (Kolarow et al., 2014). Otros estudios en células ganglionares de retina y neuronas corticales, en los que se buscaba relacionar a BDNF con efectos apoptóticos y degenerativos, mostraron que la adición de BDNF induce la activación de la NOS como parte de los mecanismos de muerte celular (Koh et al., 1995; Klöcker et al., 1998).

La participación de la NOX en la cascada de señalización intracelular inducida por BDNF se evaluó utilizando el péptido inhibidor de la subunidad gp91, gp91 ds-tat y su análogo inactivo. Al respecto se determinó que al bloquear el ensamblaje de la NOX2 con gp91 ds-tat se previene la generación de H₂O₂ y también el incremento en el contenido de proteína RyR2 inducido tras la incubación con BDNF. En el contexto de la participación de la NOX en la generación de ROS inducida por BDNF, existe un estudio realizado en neuronas corticales que muestra que tras la estimulación de estas células por 48 h con BDNF 100 ng/ml, se incrementa la generación de ROS y la expresión de la subunidad p47 de la NADPH oxidasa (Kim et al., 2002) lo que reafirma la relación encontrada en este trabajo.

2.- RyR y ROS

La regulación de la actividad de RyR por ROS/RNS ha sido motivo de amplio estudio en nuestro laboratorio (Hidalgo et al., 2004, 2005). Al respecto, se ha establecido que la activación de RyR inducida por Ca²⁺ y ATP, y su inhibición por Mg²⁺, es influenciada por los cambios en el estado redox de RyR. Si algunos residuos cruciales de cisteína (altamente reactivos) de RyR están reducidos, la respuesta del canal a Ca²⁺ (su principal agonista) es prácticamente nula, mientras que, si estos residuos de cisteína están oxidados, se incrementa la respuesta de RyR a concentraciones micromolares de Ca²⁺. Por lo tanto, los RyR que presenten más residuos de cisteína reducidos responden pobremente a la activación por ATP y por Ca²⁺ (Bull et al., 2003). Otros estudios de nuestro grupo mostraron que el H₂O₂ y el NO[•], tienen la capacidad de estimular la actividad de RyR, gatillando la fosforilación de ERK y CREB en cultivo primario de neuronas hipocampales (Kemmerling et al., 2007). En esta tesis evaluamos la actividad de RyR utilizando el agonista específico 4-CMC, en presencia del inhibidor de la NOS y el péptido inhibidor de la NOX. Los resultados permitieron concluir que las ROS provenientes de la NOS y NOX modulan la actividad de RyR en neuronas hipocampales siendo, por lo tanto el tono redox celular un factor determinante en su actividad.

3.- BDNF y RyR2

Los antecedentes hasta ahora descritos apoyan los resultados obtenidos en este trabajo, además en esta tesis se estableció una relación entre la generación de ROS y el aumento en el nivel de expresión de RyR2 inducido por BDNF. Usualmente, se considera a RyR como un agente mediador y no como una proteína involucrada en procesos tan importantes como la expresión génica, el crecimiento de espinas dendríticas y la formación de la memoria. Previamente, nuestro grupo publicó que BDNF induce incrementos en la expresión de RyR2 en cultivo primario de neuronas hipocampales, en una forma dependiente de la actividad de RyR (Adasme et al., 2011). Anteriormente, Ring et al. mostraron a través de estudios con microarreglos, que el mRNA de RyR2 se encuentra entre los genes que incrementan su transcripción en respuesta a BDNF (Ring et al., 2006). Además, el grupo de Alkon et al. reportó que luego de una tarea de aprendizaje espacial, se activan mecanismos que llevan a la síntesis de mRNA y proteína de RyR2 (Zhao et al., 2000), sugiriendo que los cambios en la expresión de RyR2 son consecuencia directa de los procesos de plasticidad desencadenados por aprendizaje y memoria. Este trabajo muestra que los cambios en los niveles de transcrito y proteína RyR2 inducidos por BDNF, requieren de la actividad de la NOS y de la NOX2, además de la amplificación de la señal de Ca^{2+} mediada por RyR, lo que sugiere una conversación cruzada entre las señales mediadas por vía Ca^{2+} y ROS, que sería esencial para la inducción de los cambios de expresión de RyR2 por BDNF.

La temporalidad con la que ocurren los eventos en la señalización de BDNF, es un punto importante de discusión. Trabajos de literatura mencionados anteriormente, mostraron que la activación de los receptores NMDA promueve la generación de superóxido vía NOX2 (Brennan et al., 2009), para lo cual la producción de NO por la NOS es un paso esencial para la activación de la NOX2 mediado por cGMP-PKG (Girouard et al., 2009), proceso que concuerda con nuestros resultados ya que en este trabajo mostramos que, se requiere tanto el ingreso de Ca^{2+} vía NMDA como la actividad de la NOS y NOX2 para la generación de ROS inducida por BDNF. Una interesante posibilidad sería que estas ROS estarían

incrementando la actividad de RyR, aumentando las modificaciones oxidativas de residuos cisteína clave del receptor que controlan su actividad, lo que provoca mayor liberación de Ca^{2+} (Hidalgo et al., 2005). que amplificarían la cascada de señalización que culmina en el aumento de expresión de RyR2. Debemos tener en cuenta también que el aumento de Ca^{2+} citoplasmático a su vez aumenta la producción de ROS (Yan et al., 2006), potenciado la conversación cruzada entre las ROS y las señales de Ca^{2+} . Todos estos son los primeros eventos necesarios para activar la cascada de señalización que inducen la translocación nuclear de Nrf2 y los incrementos en la expresión de RyR2 inducidos por BDNF.

4.- BDNF y Nrf2

El posible rol de las ROS/RNS en la señalización inducida por BDNF es una pregunta que surge de los antecedentes previamente reportados. De las ROS, el H_2O_2 es el que tiene mayor estabilidad, difunde a través de membranas biológicas y posee además una reactividad selectiva, estas características lo hacen una muy adecuada molécula de señalización (Klomsiri et al., 2011). Actúa a través de la oxidación de residuos proteicos de cisteína, que poseen un bajo pKa y existen como anión tiolato (S-) a pH fisiológico, haciéndolos más reactivos que las cisteínas protonadas de los grupos tioles (SH) y por ende siendo más específicos y selectivos (Klomsiri et al., 2011). La oxidación de estos residuos en forma de tiolato (S-) genera una forma sulfónica (SO-) la que promueve cambios de conformación y actividad de proteínas como quinasas, fosfatasas y factores de transcripción, permitiendo de esta manera activar una transducción de señales (Finkel, 2012). Sin embargo, no se entiende completamente cómo el H_2O_2 transmite su señal de oxidación, debido a que la célula presenta una gran batería de enzimas antioxidantes que pueden impedir esta forma de señalización. Uno de los mecanismos propuestos es, que enzimas como la glutathionperoxidasas (GPXs) y peroxidasas (PRXs) participen de la detección y la transducción de H_2O_2 , a través de un mecanismo denominado **relevé redox (Redox relay)** que ha sido bien descrito en *Saccharomyces cerevisiae*. En este mecanismo las enzimas antioxidantes son las que reciben la oxidación inicial por H_2O_2 y posteriormente

transfieren esta oxidación a la proteína diana deseada (Reczek and Chandel, 2015). Hemos constatado que BDNF genera ROS y que estos, junto al ión Ca^{2+} , son esenciales para incrementar los niveles de transcrito y proteína RyR2, y activar la translocación de Nrf2 al núcleo, cumpliéndose así con los objetivos de esta tesis. En este contexto, sólo un trabajo ha relacionado la expresión de RyR2 con algún factor transcripcional. En el laboratorio, realizamos un análisis *in silico* de la región del promotor de RyR2 y se encontraron elementos de respuesta para CREB, NFAT y Nrf2. El grupo de Nicotera y cols. ha sido hasta la fecha el único grupo en describir la relación entre un factor transcripcional y RyR2. Al respecto, mostraron que, en cultivos de neuronas corticales, los incrementos en los niveles de expresión de RyR2 inducidos por nicotina, dependen de la fosforilación a largo plazo del factor de transcripción CREB, que para su activación requiere de Ca^{2+} (Ziviani et al., 2011).

De acuerdo a los resultados de este trabajo, uno de los posibles blancos de las ROS, que podría estar participando en los cambios en los niveles de expresión de RyR2, es el factor de transcripción Nrf2. Los resultados obtenidos indican que BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo tras 6 horas de incubación. Además, indican que la translocación de Nrf2 inducida por BDNF depende de la generación de ROS, ya que se previene en presencia de NAC. Es importante destacar, que no existen antecedentes que relacionen a Nrf2 con la vía de señalización de BDNF directamente. Existe un antecedente presentado por Ring y cols., en donde a través de un microarreglo se observó que en neuronas hipocámpales incubadas con BDNF por 24 horas, se incrementaba la expresión de la NQO1, una enzima que es blanco de Nrf2 (Ring et al., 2006).

La participación de Nrf2 a nivel neuronal, ha sido estudiada en procesos patológicos, en donde Nrf2 actúa como agente citoprotector. Sin embargo la implicancia de Nrf2 en la fisiología neuronal ha sido contradictoria. Al respecto estudios en que se evaluó la citoprotección mediada por Nrf2, sugirieron que éste se encuentra expresado mayoritariamente en astrocitos y que sería a través de estas células desde donde mediaría la neuroprotección (Murphy et al., 2001; Shih et al., 2003). Otro estudio más reciente muestra que la actividad de Nrf2 está

regulada por medio de una ***sinapsis tripartita***. En donde un incremento en la actividad neuronal puede generar la liberación de neurotransmisores y otros factores solubles, que activan la vía de Nrf2 en astrocitos, involucrando la participación de receptores de glutamato de tipo metabotrópicos (Habas et al., 2013). Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con resultados de nuestro trabajo, ya que ha sido descrito que BDNF se libera por aumentos en la actividad neuronal (Balkowiec and Katz, 2002), siendo parte probablemente de los factores solubles que inducen la translocación nuclear de Nrf2 en astrocitos, que menciona el trabajo. Sin embargo, en este estudio se observó que Nrf2 solo transloca al núcleo en astrocitos. Datos que discrepan a los a los nuestros en donde observamos, a través de inmunocitoquímica que BDNF induce la translocación de Nrf2 a nivel neuronal. Adicionalmente, ellos observaron que el tratamiento con quelantes de Ca^{2+} tanto a nivel extracelular (EGTA) como intracelular (BAPTA-AM), bloquean la translocación de Nrf2 en astrocitos (Habas et al., 2013). Estos resultados concuerdan con nuestros datos en base al mecanismo involucrado sin embargo, el aporte de esta tesis al mecanismo en neuronas hipocampales es más específico, ya que observamos que la inhibición de la actividad de RyR con ryanodina, bloquea la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF. Adicionalmente, estudiamos la participación de las quinasas ERK y PI3K en el mecanismo que permite la translocación de Nrf2 inducido por BDNF. Los resultados sugieren que no se requiere la activación de las ERK para la translocación de Nrf2 al núcleo. No obstante, cuando se inhibió la actividad de la PI3K, la translocación de Nrf2 inducida por BDNF se bloqueó. Este resultado se correlaciona con reportes que muestran que la vía de la PI3K-Akt-BDNF son importantes en los mecanismos de neuroprotección (Nguyen et al., 2010) y neuroplasticidad (Karpova et al., 2006), en que Nrf2 puede ser activado para este propósito.

RESUMEN DE RESULTADOS

Nuestros resultados sugieren que:

1. BDNF induce la generación de ROS/RNS por un mecanismo que requiere el ingreso de Ca^{2+} vía NMDAR, la amplificación de la señal de Ca^{2+} mediada por RyR y la contribución de la NOS y la NOX2.
2. La liberación de Ca^{2+} mediada por RyR requiere de las ROS provenientes de la NOS y NOX2.
3. Las ROS generadas en neuronas hipocampales tras la estimulación con BDNF, son agentes señalizadores esenciales que se requieren para los incrementos en los niveles de expresión de RyR2.
4. Se requiere las ROS provenientes de la NOS y la NOX2 para los incrementos en los niveles de mRNA y proteínas RyR2 inducidos por BDNF.
5. BDNF induce la translocación de Nrf2 al núcleo, tras 6 horas de incubación.
6. La liberación de calcio mediada por RyR y las ROS regulan la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por BDNF.
7. La inhibición de la vía de las ERKs no afecta la translocación de Nrf2 al núcleo.
8. La PI3K pertenece a la vía de señalización intracelular inducida por BDNF requerida para inducir la translocación de Nrf2 al núcleo.

CONCLUSIONES

Nuestros datos sugieren que, la incubación de neuronas hipocampales con BDNF, aumenta la generación de ROS, requiriendo el ingreso de Ca^{2+} a través de los NMDAR, la liberación de Ca^{2+} mediada por RyR, así como a las enzimas NOS y NOX2. Estas especies reactivas, participan en la vía de señalización inducida por BDNF, modulando la expresión de RyR2 e induciendo la translocación al núcleo de Nrf2. Además, observamos que la actividad del receptor de Ryanodina, modula la generación de ROS y la translocación de Nrf2 inducidos por BDNF. Asimismo, la vía de la PI3K activada por BDNF modula la translocación de Nrf2 al núcleo.

ESQUEMA FINAL

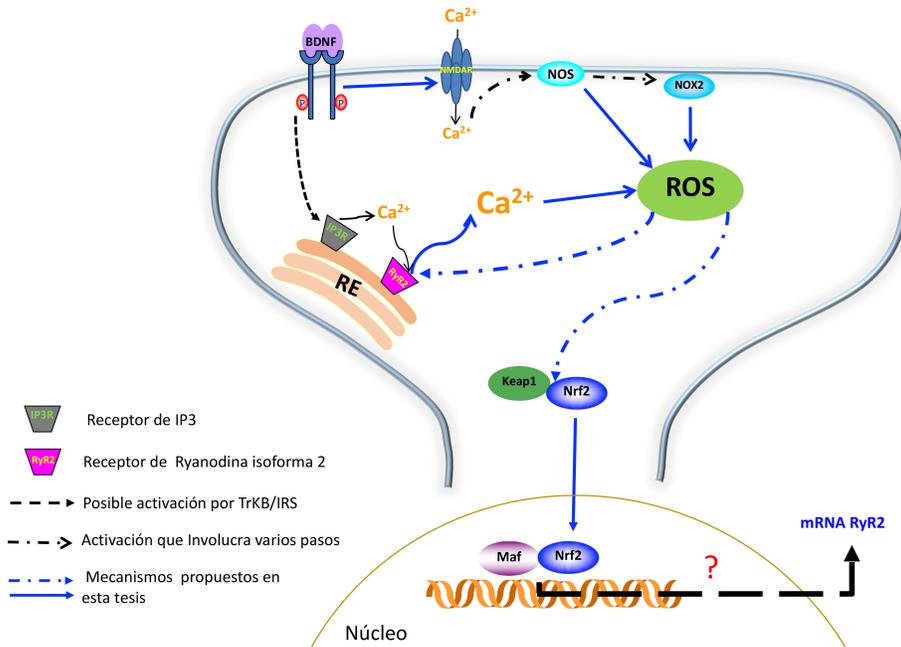


Figura 18: Conclusión participación de las ROS en la vía de señalización inducida por BDNF en neuronas hipocámpicas. La unión del homodímero de BDNF a TrkB induce la dimerización y autofosforilación de los residuos de tirosina del dominio citoplasmático del receptor. Las tirosinas fosforiladas actúan como sitios de reclutamiento para proteínas adaptadoras, con dominios Shc, que permiten la activación de proteínas como las Ras (GTPasa pequeña), las CaMKs y las ERKs (no mostrado). La PLC- γ interactúa directamente con la Y⁸¹⁶, lo que permite su activación y subsecuente hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), produciendo diacilglicerol e IP3 (no mostrado). El IP3 difunde fácilmente y abre los canales intracelulares de Ca²⁺ IP3R, induciendo la liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático. Este Ca²⁺ liberado por IP3R estimula la liberación de Ca²⁺ mediada por el receptor de Ryanodina (RyR) desencadenando el mecanismo de liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR), que promueve la apertura de los RyR y subsecuente liberación de Ca²⁺. Paralelamente, la proteína quinasa Fyn, que interactúa con tirosinas fosforiladas de TrkB, se activa y fosforila al receptor NMDA (no mostrado) (Blum and Konnerth, 2005). De esta manera, BDNF incrementa la entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular a través de los NMDAR. Este Ca²⁺ también activa el sistema CICR, incrementando la liberación de calcio mediada por los RyR. Subsecuente, se activan proteínas quinasas que permiten la activación de la NOS y la NOX2, las que incrementan su actividad generando ROS (Brennan et al., 2009; Girouard et al., 2009). Las ROS permiten la disociación del complejo Nrf2-Keap1, permitiendo la translocación de Nrf2 al núcleo. Juntas, las señales de Ca²⁺ y ROS participan en los mecanismos que subyacen a los incrementos de los niveles de expresión de RyR2 inducidos por BDNF.

REFERENCIAS

- Adasme T, Haeger P, Paula-Lima AC, Espinoza I, Casas-Alarcón MM, Carrasco MA, Hidalgo C (2011) Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3029–3034.
- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007) Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85:525–535.
- Alonso M, Bekinschtein P, Cammarota M, Vianna MRM, Izquierdo I, Medina JH (2005) Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem* 12:504–510.
- Balkowiec A, Katz DM (2002) Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci* 22:10399–10407.
- Bedard K, Krause K-H (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245–313.
- Belousov V V, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh A V, Lukyanov S (2006) Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods*:281–286.
- Benarroch EE, Ca O (2015) Brain-derived neurotrophic factor Regulation , effects , and potential clinical relevance.
- Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13–26.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517–529.
- Bibel M, Barde Y (2000) vertebrate nervous system Neurotrophins : key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*:2919–2937.
- Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors* 22:123–131.
- Blum R, Konnerth A (2005) Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)* 20:70–78.
- Bon CLM, Garthwaite J (2003) On the Role of Nitric Oxide in Hippocampal Long-Term Potentiation. *J Neurosci* 23:1941–1948.
- Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: The

synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76:99–125.

Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson R a (2009) NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 12:857–863.

Bull R, Marengo JJ, Finkelstein JP, Behrens MI, Alvarez O (2003) SH oxidation coordinates subunits of rat brain ryanodine receptor channels activated by calcium and ATP. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C119–C128.

Carroll S, Skarmeta J, Yu X, Collins KD, Inesi G (1991) Interdependence of ryanodine binding, oligomeric receptor interactions, and Ca²⁺ release regulation in junctional sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 290:239–247.

Cavallaro S, Meiri N, Yi CL, Musco S, Ma W, Goldberg J, Alkon DL (1997) Late memory-related genes in the hippocampus revealed by RNA fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9669–9673.

Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18–41.

Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3:1.

Dang J, Brandenburg LO, Rosen C, Fragoulis A, Kipp M, Pufe T, Beyer C, Wruck CJ (2012) Nrf2 expression by neurons, astroglia, and microglia in the cerebral cortical penumbra of ischemic rats. *J Mol Neurosci* 46:578–584.

de Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJM, Drukarch B, Hoozemans J, van Horsen J (2008) Nrf2-induced antioxidant protection: A promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radic Biol Med* 45:1375–1383.

Dröge W (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 82:47–95.

Dulhunty A, Haarmann C, Green D, Hart J, Al DET (2000) Forum Minireview How Many Cysteine Residues Regulate Ryanodine Receptor Channel Activity? *Antioxid Redox Signal* 2:27–34.

Edwards TM, Rickard NS (2006) Pharmacological evidence indicating a complex role for ryanodine receptor calcium release channels in memory processing for a passive avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 86:1–8.

Ellis-Davies GC KHTJHYMMMT (2008) Protein Synthesis and Neurotrophin-Dependent Structural Plasticity of Single Dendritic Spines. *Science* (80-) 319:1683–1688.

- Fill, Copello, Fill M, Copello J a (2002) Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol Rev* 82:893–922.
- Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky a, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME (1997) CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19:1031–1047.
- Finkel T (2012) From sulfenylation to sulfhydration: what a thiolate needs to tolerate. *Sci Signal* 5:pe10.
- Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J* 33:829–837.
- Frey U, Frey S, Schollmeier F, Krug M (1996) Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vivo and in vitro. *J Physiol* 490 (Pt 3:703–711.
- Fritzsch B, Tessarollo L, Coppola E, Reichardt LF (2004) Neurotrophins in the ear: Their roles in sensory neuron survival and fiber guidance. *Prog Brain Res* 146:265–278.
- Gahtan E, Auerbach JM, Groner Y, Segal M (1998) Reversible impairment of long-term potentiation in transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Eur J Neurosci* 10:538–544.
- Galeotti N, Quattrone A, Vivoli E, Norcini M, Bartolini A, Ghelardini C (2008) Different involvement of type 1 , 2 , and 3 ryanodine receptors in memory processes. :315–323.
- Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, Iadecola C (2009) NMDA Receptor Activation Increases Free Radical Production through Nitric Oxide and NOX2. *J Neurosci* 29:2545–2552.
- Gottschalk W, Pozzo-Miller LD, Figueroa a, Lu B (1998) Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus. *J Neurosci* 18:6830–6839.
- Habas A, Hahn J, Wang X, Margeta M (2013) Neuronal activity regulates astrocytic Nrf2 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:18291–18296.
- Hartree EF (1972) Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422–427.
- He J, Gong H, Luo Q (2005) BDNF acutely modulates synaptic transmission and calcium signalling in developing cortical neurons. *Cell Physiol Biochem* 16:69–76.
- Heinzel B, John M, Klatt P, Böhme E, Mayer B (1992) Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 281 (

Pt 3:627–630.

- Hernandes MS, Britto LRG (2012) NADPH oxidase and neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* 10:321–327.
- Hidalgo C, Bull R, Behrens MI, Donoso P (2004) Redox regulation of RyR-mediated Ca²⁺ release in muscle and neurons. *Biol Res* 37:539–552.
- Hidalgo C, Donoso P, Carrasco MA (2005) The Ryanodine Receptors Ca²⁺ Release Channels: Cellular Redox Sensors? *IUBMB Life (International Union Biochem Mol Biol Life)* 57:315–322.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609–642.
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB (2002) Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 277:42769–42774.
- Itoh K, Mimura J, Yamamoto M (2010) Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid Redox Signal* 13:1665–1678.
- Itoh K, Tong KI, Yamamoto M (2004) Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36:1208–1213.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13:76–86.
- Jovanovic JN, Czernik a J, Fienberg a a, Greengard P, Sihra TS (2000) Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 3:323–329.
- Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A (1999) Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 401:918–921.
- Kamsler A, Segal M (2003) Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity. *J Neurosci* 23:269–276.
- Kanninen K, Heikkinen R, Malm T, Rolova T, Kuhmonen S, Leinonen H, Yla-Herttuala S, Tanila H, Levonen A-L, Koistinaho M, Koistinaho J (2009) Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* 106:16505–16510.
- Kanninen K, Malm TM, Jyrkkänen HK, Goldsteins G, Keksa-Goldsteine V, Tanila

- H, Yamamoto M, Ylä-Herttuala S, Levonen AL, Koistinaho J (2008) Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid. *Mol Cell Neurosci* 39:302–313.
- Karpova A, Sanna PP, Behnisch T (2006) Involvement of multiple phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways in the persistence of late-phase long term potentiation expression. *Neuroscience* 137:833–841.
- Kemmerling U, Muñoz P, Müller M, Sánchez G, Aylwin ML, Klann E, Carrasco MA, Hidalgo C (2007) Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons. *Cell Calcium* 41:491–502.
- Kim SH, Won SJ, Sohn S, Kwon HJ, Lee JY, Park JH, Gwag BJ (2002) Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *J Cell Biol* 159:821–831.
- Kishida KT, Klann E (2007) Sources and Targets of Reactive Oxygen Species in Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid Redox Signal* 9:233–244.
- Kishida KT, Pao M, Holland SM, Klann E (2005) NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1. *J Neurochem* 94:299–306.
- Klann E, Kim HY, Lee KY, Lu Y, Wang J, Cui L, Kim SJ, Mo J, Ma T, Hoeffler CA, Wong H, Massaad CA, Zhou P, Iadecola C, Murphy MP, Pautler RG (1998) Cell-Permeable Scavengers of Superoxide Prevent Long-Term Potentiation in Hippocampal Area CA1. *Cell-Permeable Scavengers of Superoxide Prevent Long-Term Potentiation in Hippocampal Area CA1*. :452–457.
- Klöcker N, Cellerino a, Bähr M (1998) Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells In vivo. *J Neurosci* 18:1038–1046.
- Klomsiri C, Karplus PA, Poole LB (2011) Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxid Redox Signal* 14:1065–1077.
- Kobayashi A, Kang M, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M (2006) Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1 -- Kobayashi et al. 26 (1): 221 -- *Molecular and Cellular Biology*. 26:221–229.
- Koh J, Gwag BJ, Lobner D, Choi DW (1995) Potentiated Necrosis of Cultured Cortical Neurons. *Science* (80-) 268:573–575.
- Kolarow R, Kuhlmann CRW, Munsch T, Zehendner C, Brigadski T, Luhmann HJ,

- Lessmann V (2014) BDNF-induced nitric oxide signals in cultured rat hippocampal neurons: time course, mechanism of generation, and effect on neurotrophin secretion. *Front Cell Neurosci* 8:323.
- Kolb B, Gibb R, Robinson TE (2003) Brain plasticity and behavior. *Curr Dir Psychol Sci* 12:1–5.
- Kovalchuk Y, Hanse E, Kafitz KW, Konnerth A (2002) Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation. *Science* 295:1729–1734.
- Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4:181–189.
- Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL (2010) Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:1–21.
- Leal G, Comprido D, Duarte CB (2014) BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76:639–656.
- Lee JM, Shih AY, Murphy TH, Johnson JA (2003) NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J Biol Chem* 278:37948–37956.
- Li HS, Xu XZS, Montell C (1999) Activation of a trpc3-dependent cation current through the neurotrophin bdnf. *Neuron* 24:261–273.
- Lin SY, Wu K, Levine ES, Mount HTJ, Suen PC, Black IB (1998) BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Mol Brain Res* 55:20–27.
- Lu M-C, Ji J-A, Jiang Z-Y, You Q-D (2016) The Keap1–Nrf2–ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Med Res Rev* 36:924–963.
- Lu Y, Hawkins RD (2002) Ryanodine Receptors Contribute to cGMP-Induced Late-Phase LTP and CREB Phosphorylation in the Hippocampus. *J Neurophysiol* 88:1270–1278.
- Magesh S, Chen Y, Hu L (2012) Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med Res Rev* 32:687–726.
- Martínez MC, Andriantsitohaina R (2009) Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 11:669–702.

- Massaad C, Klann E (2011) Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 14:2013–2054.
- Mattei MG, Giannini G, Moscatelli F, Sorrentino V (1994) Chromosomal localization of murine ryanodine receptor genes RYR1, RYR2, and RYR3 by in situ hybridization. *Genomics* 22:202–204.
- Meng X, Sun G, Wang M, Sun J, Qin M, Sun X (2013) Mediated by Notoginsenoside R2 to Prevent 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptotic Death in SH-SY5Y Cells. 2013.
- Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M (2012) The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol* 2:200.
- Mori F, Fukaya M, Abe H, Wakabayashi K, Watanabe M (2000) Developmental changes in expression of the three ryanodine receptor mRNAs in the mouse brain. *Neurosci Lett* 285:57–60.
- Müller U (2006) Memory: Cellular and molecular networks. *Cell Mol Life Sci* 63:961–962.
- Muramatsu H, Katsuoka F, Toide K, Shimizu Y, Furusako S, Yamamoto M (2013) Nrf2 deficiency leads to behavioral, neurochemical and transcriptional changes in mice. *Genes to Cells* 18:899–908.
- Murphy TH, Yu J, Ng R, Johnson DA, Shen H, Honey CR, Johnson JA (2001) Preferential expression of antioxidant response element mediated gene expression in astrocytes. *J Neurochem* 76:1670–1678.
- Nakaso K, Nakamura C, Sato H, Imamura K, Takeshima T, Nakashima K (2006) Novel cytoprotective mechanism of anti-parkinsonian drug deprenyl: PI3K and Nrf2-derived induction of antioxidative proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 339:915–922.
- Narisawa-Saito M, Iwakura Y, Kawamura M, Araki K, Kozaki S, Takei N, Nawa H (2002) Brain-derived neurotrophic factor regulates surface expression of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors by enhancing the N-ethylmaleimide-sensitive factor/GLuR2 interaction in developing neocortical neurons. *J Biol Chem* 277:40901–40910.
- Nguyen TLX, Kim CK, Cho J-H, Lee K-H, Ahn J-Y (2010) Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7/IGF-IR [corrected]. *Exp Mol Med* 42:583–595.
- Nguyen P V, Kandel ER (1997) Brief theta-burst stimulation induces a transcription-dependent late phase of LTP requiring cAMP in area CA1 of the mouse hippocampus. *Learn Mem* 4:230–243.

- Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB (2005) The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 25:10895–10906.
- Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H (2010a) BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol* 25:237–258.
- Numakawa T, Yokomaku D, Richards M, Hori H, Adachi N, Kunugi H (2010b) Functional interactions between steroid hormones and neurotrophin BDNF. *World J Biol Chem* 1:133–143.
- Okano H, Hirano T, Balaban E (2000) Learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12403–12404.
- Park H, Poo MM (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14:7–23.
- Paula-Lima AC, Adasme T, Hidalgo C (2014) Contribution of Ca²⁺ Release Channels to Hippocampal Synaptic Plasticity and Spatial Memory: Potential Redox Modulation. *Antioxid Redox Signal* 21:892–914.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4:89–96.
- Ramsey CP, Charles A. Glass, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, Hamilton RL, Chu CT, Charleen T. Chu., Jordan-Sciutto KL (2007) Expression of Nrf2 in Neurodegenerative Diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:75–85.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24:981–990 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.
- Reczek CR, Chandel NS (2015) ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 33:8–13 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.010>.
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101:746–752.
- Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash a, Quinn MT, Pagano PJ (2001) Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 89:408–414.
- Ring RH, Alder J, Fennell M, Kouranova E, Black IB, Smita Thakker-Varia (2006)

Transcriptional Profiling of Brain-Derived- Neurotrophic Factor-Induced Neuronal Plasticity: A Novel Role for Nociceptin in Hippocampal Neurite Outgrowth. *J Neurobiol* 66:361–377

Rose CR, Konnerth A (2001) Stores Not Just for Storage: Intracellular Calcium Release and Synaptic Plasticity. *Neuron* 31:519–522.

Sakai N, Yamada M, Numakawa T, Ogura A, Hatanaka H (1997) BDNF potentiates spontaneous Ca²⁺ oscillations in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 778:318–328.

Sakata K (2014) Brain-Derived Neurotrophic Factor for Depression Therapeutics. *Austin J Pharmacol Ther* 2:1–10.

Sandberg M, Patil J, D'Angelo B, Weber SG, Mallard C (2014) NRF2-regulation in brain health and disease: Implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology* 79:298–306.

Shih AY, Johnson D a, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson J a, Murphy TH (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* 23:3394–3406.

Sihvola V, Levonen A-L (2016) Keap1 as the redox sensor of the antioxidant response. *Arch Biochem Biophys*:1–7 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986116304210>.

Song JH, Yu JT, Tan L (2015) Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease: Risk, Mechanisms, and Therapy. *Mol Neurobiol* 52:1477–1493.

Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Crit Care*:1005–1028.

Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, Yamamoto M (2006) Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol* 26:2887–2900.

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335–344.

Tyler WJ, Pozzo-Miller L (2003) Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J Physiol* 553:497–509.

Waterhouse EG, Xu B (2009) New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci* 42:81–89.

Webster MJ, Weickert CS, Herman MM, Kleinman JE (2002) BDNF mRNA

- expression during postnatal development, maturation and aging of the human prefrontal cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 139:139–150.
- Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL (1986) The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7104–7108.
- Yamada K, Nabeshima T (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 91:267–270.
- Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC (1997) Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 378:135–157.
- Yan Y, Wei CL, Zhang WR, Cheng HP, Liu J (2006) Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin* 27:821–826.
- Yang Y, Jiang S, Yan J, Li Y, Xin Z, Lin Y, Qu Y (2015) An overview of the molecular mechanisms and novel roles of Nrf2 in neurodegenerative disorders. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:47–57.
- Zalk R, Clarke OB, des Georges A, Grassucci RA, Reiken S, Mancina F, Hendrickson WA, Frank J, Marks AR (2015) Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature* 517:44–49.
- Zhang Y, Martin SG (2014) Redox Proteins and Radiotherapy. *Clin Oncol* 26:289–300.
- Zhao WQ, Meiri N, Xu H, Cavallaro S, Quattrone A, Zhang L, Alkon DL (2000) Spatial learning induced changes in expression of the ryanodine type II receptor in the rat hippocampus. *FASEB J* 14:290–300.
- Zhou L, Zhu D-Y (2009) Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide* 20:223–230.
- Ziviani E, Lippi G, Bano D, Munarriz E, Guiducci S, Zoli M, Young KW, Nicotera P (2011) Ryanodine receptor-2 upregulation and nicotine-mediated plasticity. *EMBO J* 30:194–204 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.279>.
- Zou W, Chen C, Zhong Y, An J, Zhang X, Yu Y, Yu Z, Fu J (2013) PI3K/Akt pathway mediates Nrf2/ARE activation in human L02 hepatocytes exposed to low-concentration HBCDs. *Environ Sci Technol* 47:12434–12440.