

UCH-FC  
DOC BMCN  
M971  
e.1

**“MODULACIÓN OXIDATIVA DE LA VÍA ERK/MAPK, MEDIADA  
POR HIERRO Y SUS EFECTOS EN PLASTICIDAD SINÁPTICA”**

**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De  
Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y  
Neurociencias**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Pablo César Muñoz Carvajal**

**Noviembre, 2006**

**Director de Tesis Dr: Marco Tulio Nuñez**

**Co-director de Tesis Dra: Cecilia Hidalgo**



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE DOCTORADO**

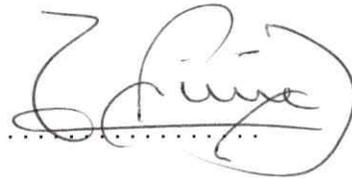
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

***Pablo César Muñoz Carvajal***

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_ de Noviembre de 2006.

**Director de Tesis:**

Dr. Marco Tulio Nuñez



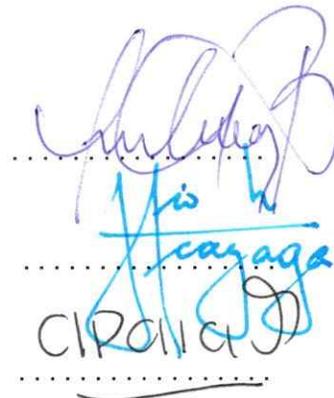
**Co-director de Tesis:**

Dra. Cecilia Hidalgo



**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Cristian Gonzalez (Presidente)



Dr. Julio Alcayaga

Dr. Adrián Palacios

*A Frida del Campo,  
Vicente, Sebastián y Alfonsina.*



## **AUTOBIOGRAFÍA**

Yo, **Pablo Muñoz Carvajal**, nacido de Rubén y Lila, el menor de cinco hermanos, escribo estas páginas con sudor y lágrimas...

Estudí en el Instituto Nacional. Posteriormente, me hice Bioquímico en la Universidad de Santiago, haciendo mi tesis de pregrado en la Pontificia Universidad Católica. Me embarqué en un Doctorado en la Universidad de Chile, realizando estadías en Johns Hopkins University y en Baylor College of Medicine. Hoy me encuentro en la Universidad de Valparaíso.

En este camino conocí personas excepcionales que de una u otra forma lograron que esté escribiendo estas líneas. Al recordar, se me cruzan las más excepcionales de todas, las que convierten el sudor y las lágrimas en sonrisas: Vicente, Sebastián y Alfonsina.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer desde lo más hondo a mis padres y hermanos que siempre han estado formando parte de mi centro.

A los Drs. Marco Tulio Nuñez y Cecilia Hidalgo por la suerte de haberlos encontrado en el camino. Por todas las lecciones recibidas. Por la confianza en el trabajo realizado.

A los miembros de la comisión de tesis, por sus críticas y aportes en el desarrollo de esta empresa.

Al Dr. Alfredo Kirkwood por sus enseñanzas electrofisiológicas y apoyar mis estadías en su laboratorio en Baltimore, USA.

Al Dr. Eric Klann por abrir las puertas de su laboratorio en Houston, USA.

A mis cien amigos más cercanos, en particular, a Victoria, Dora, Natalia, Carol, Carola, Pamela, Daniel, Daniela, Enrique, Gabriela, Carlitos, todos del laboratorio del envejecimiento.

A Paola Haeger, Tatiana Adasme, Juan Pablo Muñoz, Paola Llanos, Alexis Humeres por compartir buenos momentos en la facultad de Medicina.

Finalmente, dar *gracias a la vida que me ha dado tanto...*

## INDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCIÓN	1
<b>1.1. Antecedentes bibliográficos</b>	1
1.1.1. Especies reactivas del oxígeno	1
1.1.2. El hierro como productor de ROS	2
1.1.3. ROS y función neuronal	5
1.1.4. Memoria y mecanismos celulares de plasticidad sináptica	7
1.1.5. Calcio en plasticidad sináptica	12
1.1.6. El receptor de ryanodina	12
1.1.7. Vía ERK / MAPK en plasticidad sináptica y memoria	15
1.1.8. Especies Reactivas de Oxígeno en Plasticidad Sináptica	19
<b>1.2. Hipótesis</b>	26
<b>1.3. Objetivo General</b>	26
<b>1.4. Objetivos Específicos</b>	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
<b>2.1. Materiales</b>	29
2.1.1. Reactivos Generales	29
2.1.2. Anticuerpos y western blot	29
2.1.3. Fluoróforos	29
2.1.4. Equipos	30
2.1.5. Cultivo celular	30
2.1.6. Materiales de Cultivo	30
2.1.7. Material biológico	31
<b>2.2. Métodos</b>	31
2.2.1. Cultivos celulares	31
2.2.2. Células PC12	31
2.2.3. Cultivo Primario de hipocampo de rata	32
2.2.4. Preparación de rebanadas de hipocampo	33
2.2.5. Detección del radical libre hidroxilo	34

2.2.6. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno	34
2.2.7. Determinación de Calcio intracelular	35
2.2.8. Western Blots de extractos de células PC12	36
2.2.9. Western Blots de rebanadas de hipocampo de ratón	37
2.2.10. Localización subcelular de ERK en células PC12	38
2.2.11. Localización subcelular de ERK en neuronas hipocampales en cultivo	39
2.2.12. Fosforilación de CREB en neuronas hipocampales en cultivo	40
2.2.13. Registros electrofisiológicos en rebanadas de hipocampo	41
<b>3. RESULTADOS</b>	42
<b>3.1. Determinación de la interacción entre ROS mediadas por hierro y las señales de calcio</b>	42
3.1.1. La entrada de hierro está asociada a la reacción de Fenton <i>in vivo</i>	42
3.1.2. La activación de NMDAR induce entrada de calcio y se asocia a la producción de ROS.	46
3.1.3. Las ROS generadas por hierro inducen la salida de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY	50
3.1.4. La señal de calcio evocada por activación de NMDAR, es modulada por ROS generadas por hierro	57
<b>3.2. Consecuencias celulares de la interacción entre ROS y señales de calcio</b>	60
3.2.1. Las ROS generadas por hierro inducen fosforilación de ERK	61
3.2.2. La liberación de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY inducida por hierro es crucial para la activación de la vía MAPK/ERK.	67
3.2.3. El calcio liberado desde reservorios intracelulares sensibles a RY es crítico en la activación de ERK dependiente de NMDAR.	68
3.2.4. La activación de ERK dependiente de NMDAR	69

requiere un tono redox permisivo mediado por hierro.	
3.2.5. NMDA induce activación de la vía MAPK/ERK/CREB en neuronas hipocampales, mediante un proceso que involucra ROS generadas por hierro y RYR.	71
<b>3.3.Efectos del hierro en fenómenos de plasticidad sináptica</b>	<b>77</b>
3.3.1. Desferroxamina induce depresión en la respuesta sináptica de la zona CA1 frente a estimulación en la zona CA3.	78
3.3.2. El hierro favorece e induce un aumento de la transmisión sináptica en la zona CA1 del hipocampo	87
3.3.3. Transmisión sináptica y la activación de ERK	90
3.3.4. Efecto oxidativo del hierro en la activación de ERK y CREB dependiente de NMDAR, en la zona CA1 del hipocampo	90
3.3.5. ROS generadas por hierro inducen fosforilación de ERK y CREB en la zona CA1 del hipocampo	94
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>99</b>
4.1. Hierro y efecto oxidativo asociado a radicales libres	100
4.2. Hierro y estimulación de la señal de calcio mediada por RYR	103
4.3. Estimulación redox de la liberación de calcio mediada por RYR	109
4.4. Participación del RyR en funciones neuronales	110
4.5. Liberación de calcio mediado por RYR en procesos sinápticos	113
4.6. Hierro en Plasticidad sináptica	118
<b>5. CONCLUSIONES FINALES</b>	<b>125</b>
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>128</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	44
La producción del radical hidroxilo, inducida por hierro, es bloqueada por manitol.	
Figura 2	45
Esquema de la interacción DFO-Fe <sup>3+</sup> . El sideróforo DFO corresponde a un quelante hexadentado de muy alta especificidad por Fe <sup>3+</sup> .	
Figura 3	47
Estructuras químicas y propiedades espectrales de las sondas fluorescentes utilizadas.	
Figura 4	49
La producción de ROS está acoplada a la activación de NMDAR.	
Figura 5	51
El hierro aumenta la frecuencia de los eventos de calcio.	
Figura 6	52
El hierro induce la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY en células PC12.	
Figura 7	54
El hierro induce la liberación de calcio en neuronas hipocampales en cultivo.	
Figura 8	56
Las ROS generadas por hierro inducen la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY en neuronas hipocampales.	
Figura 9	58
Los aumentos de Ca <sup>2+</sup> inducidos por activación de NMDAR son modulados oxidativamente por hierro e involucran la salida de Ca <sup>2+</sup> desde compartimentos sensibles a RY.	
Figura 10	62
El hierro induce fosforilación de ERK1/2, dependiente del tiempo. A) Western blot representativo mostrando cambios en la inmunoreactividad para	
Figura 11	64
El hierro induce fosforilación de ERK1/2 dependiente de la concentración.	
Figura 12	66
El hierro induce activación y translocación nuclear de ERK, mediante un proceso que involucra radicales libres hidroxilo.	

Figura 13	67
La liberación de calcio desde compartimentos sensibles a RY es crítica para la fosforilación de ERK.	
Figura 14	69
La activación y la translocación nuclear de ERK dependiente de NMDAR en células PC 12 involucran un estado redox permisivo mediado por hierro y por liberación de Ca <sup>+2</sup> -inducida por Ca <sup>+2</sup> desde depósitos sensibles a RY.	
Figura 15	73
La translocación nuclear de ERK dependiente de NMDAR involucra un estado redox permisivo mediado por hierro y liberación de Ca <sup>+2</sup> inducida por Ca <sup>+2</sup> desde depósitos sensibles a RY, en neuronas de hipocampo en cultivo.	
Figura 16	74
Hierro induce activación y translocación nuclear de ERK en neuronas de hipocampo en cultivo.	
Figura 17	76
La activación de NMDAR induce fosforilación de CREB por un proceso que involucra radicales libres generados por hierro y liberación de Ca <sup>+2</sup> inducida por Ca <sup>+2</sup> desde depósitos sensibles a RY, en neuronas de hipocampo en cultivo.	
Figura 18	79
Registro obtenido en el Stratum Radiatum de la zona CA1 de hipocampo de rata.	
Figura 19	80
DFO induce una depresión persistente de la respuesta sináptica en neuronas CA1 por estimulación de pulsos pareados en CA3.	
Figura 20	83
La depresión sináptica inducida por estimulación de pulsos pareados en presencia de DFO requiere de actividad sináptica dependiente de activación de NMDAR.	
Figura 21	84
DFO no altera la transmisión sináptica basal.	
Figura 22	86
DFO disminuye la duración de la LTP en neuronas CA1, inducida por trenes de estimulación de alta frecuencia en las fibras aferentes de la zona CA3 del hipocampo.	
Figura 23	88
El hierro convierte una potenciación de la transmisión sináptica transitoria en una más persistente y además facilita la inducción de un tipo de LTP en respuesta a estimulación por pulso pareado.	

Figura 24 92  
La fosforilación de ERK y de CREB, dependientes de la activación de NMDAR por NMDA en rebanadas de hipocampo, involucra un estado redox permisivo mediado por hierro, y además liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  inducida por  $\text{Ca}^{+2}$  desde depósitos sensibles a RY.

Figura 25 95  
El hierro induce la fosforilación de ERK y de CREB por un proceso que involucra radicales libres y liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  inducida por  $\text{Ca}^{+2}$  desde depósitos sensibles a RY, en rebanadas de hipocampo.

Figura 26 98  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  induce la fosforilación de ERK y de CREB por un proceso que involucra radicales libres y liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  inducida por  $\text{Ca}^{+2}$  desde depósitos sensibles a RY, en rebanadas de hipocampo.

## ABREVIATURAS

AMPA	: $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4- propionic acid
BDNF	: Brain-derived neurotrophic factor
Ca	: Calcio
cADPR	: ADP ribosa cíclica
CaMK II/IV	: Quinasas dependiente de calcio/ calmodulina II y IV
cAMP	: Cyclic adenosine 3',5'-phosphate
CICR	: Liberación de calcio inducida por calcio
CPA	: Ácido ciclopiazónico
CREB	: cAMP-responsive element binding protein
DFO	: Desferroxamina
DG	: Giro dentado
DMEM	: Medio mínimo esencial Dulbecco
EDTA	: Ácido etilendiaminotetracético
EPSPs	: Potenciales excitatorios postsinápticos
ERK1/2	: Extracellular signal-regulated kinase 1/2
Fe	: Hierro
GSH	: Glutación reducido
HBSS	: Hank's buffer salt solution
H2DCF	: 2,7-diclorodihidrofluoresceína
HEPES	: N-(2-hidroximetil) piperazina-N' (ácido 2-etanosulfónico)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Peróxido de hidrógeno
IP3	: Inositol trifosfato

IP3R	: Receptores de IP3
IRE	: Elemento que responde a hierro
IRP	: Proteína reguladora de hierro
LSM	: <u>L</u> aser <u>s</u> canning <u>m</u> icroscope
LTD	: Depresión de largo término
LTP	: Potenciación de largo término
Mg	: Magnesio
MAN	: Manitol
MAPK	: <u>M</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inases
mHBSS	: solución salina de Hanks modificada
NMDA	: N-metil-D-aspartato
NMDAR	: Receptores de NMDA
NAC	: <u>N</u> - <u>a</u> cetil <u>c</u> isteína
NTA	: N,N-bis (carboximetil) glicina, ácido triglicolámico
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	: Superóxido
OH <sup>•</sup>	: Radical libre hidroxilo
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	: Buffer salino fosfato
PPF	: Facilitación por pulsos pareados
PTP	: Potenciación post-tetánica
PS	: Plasticidad sináptica
RE	: Retículo endoplásmico
RNS	: Especies reactivas del nitrógeno
ROS	: Especies reactivas del oxígeno

RY : Ryanodina  
RZR : Receptor de ryanodina  
SDS : Dodecil sulfato de sodio  
SOD : Superóxido dismutasa  
STP : Potenciación de corto término  
TBS : Estimulación tetánica de alta frecuencia  
TEMPO 9 : 4-((9-acridinecarbonyl)amino)-2,2,6,6- tetramethylpiperidin-1-oxyl

## ABSTRACT

Little is known about the neuronal processes in which iron is involved, including its effects on signal transduction and synaptic plasticity. Iron, potentially toxic, reacts with hydrogen peroxide generating the highly reactive hydroxyl free radical (OH•). However, Reactive Oxygen Species (ROS) have been shown to play a critical role as signaling molecules during synaptic plasticity (SP) and memory formation and they can also modulate the activity of the ryanodine (RY) receptor (RYR), an endoplasmic reticulum calcium channel involved in physiological calcium release that can be activated in neurons by selective redox modification of thiols. In particular, SH-modifying reagents have been shown to activate calcium release from RY-sensitive stores. Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) is critical for the induction of SP, but the factors that control  $\text{Ca}^{2+}$  handling and the molecular mechanisms how ROS under physiological conditions affect RYR in neurons are largely unknown. Using PC12 and hippocampal cells in culture, the oxidative effect of iron on RYR-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive RAS/ERK pathway was studied, as well as its role in modifications of synaptic strength during neuronal activity in a model of hippocampal brain slices. Incubation of cultures with NMDA produced a sustained increase in the intracellular calcium concentration, estimated by using the  $\text{Ca}^{2+}$ -specific dye Fluo 3-AM. This sustained increase was abolished by the iron chelator deferoxamine (DFO), by the hydroxyl scavenger mannitol (MAN) or by  $\mu\text{M}$  RY, a highly selective blocker of RYR, suggesting that iron and hydroxyl radicals are involved in this effect through the release of calcium from RY-sensitive intracellular stores. Consistently and given the high RYR redox sensitivity, treatment of hippocampal cells with iron increased

the frequency of  $\text{Ca}^{+2}$  signal occurrence. The iron-evoked events were blocked by RY, an indication that activation of RYR underlies the  $\text{Ca}^{2+}$  release. Iron and NMDA also activated the ERK/CREB pathway. Activation resulted in phosphorylation and nuclear translocation of the ERK1/2. Both phosphorylation and nuclear translocation were abolished by deferoxamine, mannitol or ryanodine, an indication that iron and hydroxyl radicals are involved in the activation of this signal transduction pathway through the release of calcium from cellular stores. We have found that incubation of hippocampal slices with DFO generated LTD-like responses and inhibited the induction of LTP. In contrast, iron incubation (100  $\mu\text{M}$ ) produced LTP-like responses. Perfusion with iron (20  $\mu\text{M}$ ) for 10 min before a single tetanus produced a lasting LTP that was significantly greater than that produced by one-train tetanus alone. In summary, our results suggest that iron is involved in the generation of LTP while its deficiency results in LTD and those iron-induced elementary events from RY-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores such as those described in this study can be initiated by iron-generated ROS during neuronal activity. This action is possibly initiated by iron-mediated oxidative stimulation of the RYR calcium channels, which in turn activates the MAPK/CREB pathway. These results suggest an important role for iron in the establishment of cognitive processes.

## RESUMEN.

Los procesos neuronales en los cuales hierro está involucrado son poco conocidos, incluyendo su efecto en transducción de señales y plasticidad sináptica (PS). El hierro y las especies reactivas del oxígeno (ROS: Reactive Oxygen Species) han sido asociados a estrés oxidativo, envejecimiento y ciertas enfermedades neurodegenerativas, debido a que el hierro reacciona con peróxido de hidrógeno generando el radical libre altamente reactivo hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ). No obstante, ha sido reportado que las ROS juegan un papel crítico como segundos mensajeros durante PS y formación de memoria. Por otro lado, en neuronas y en otros tipos celulares el receptor de ryanodina (RYR), un canal de calcio ubicado en el retículo endoplasmático que media la liberación de calcio en respuesta a calcio, puede ser activado por ROS mediante modificaciones del estado redox de tioles en este canal, modulando así su actividad. La liberación de calcio inducida por calcio (CICR: Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )- induced Ca<sup>+2</sup> release) mediada por RYR es crítica para la inducción de PS. En neuronas, los mecanismos moleculares de cómo las ROS afectan RYR bajo condiciones fisiológicas son desconocidos. Puesto que la vía ERK/MAPK, de demostrada importancia para la PS, es sensible a cambios en la frecuencia y amplitud de los aumentos de la concentración intracelular de calcio libre y además es activada por ROS, en este trabajo estudiamos el efecto oxidativo del hierro en la señalización de calcio dependiente de RYR y en la activación de la vía sensible a calcio Ras/ERK/CREB usando células PC12 y neuronas hipocámpales en cultivo, así como también la función del hierro en el fortalecimiento sináptico durante actividad neuronal usando rebanadas de hipocampo. Incubaciones de los cultivos neuronales con N-methyl-D-aspartate

(NMDA) produjo un sostenido aumento de la concentración de calcio intracelular, estimado usando la sonda sensible a calcio Fluo 3-AM. Este incremento fue inhibido por el quelante de hierro desferroxamina (DFO), por el atrapador del radical libre hidroxilo manitol (MAN) o por concentraciones  $\mu\text{M}$  de ryanodina (RY), un bloqueador altamente selectivo de RYR usada en este rango de concentraciones, sugiriendo que hierro y en particular las ROS generadas por hierro están involucradas en este efecto a través de la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY. Consistentemente y dada la fuerte modulación redox de RYR, en cultivos neuronales sometidos a tratamiento con hierro fue posible observar un aumento en los eventos de calcio. Los eventos de calcio evocados por hierro fueron bloqueados por RY, indicando que es RYR está involucrado en estos aumentos. Mediante el uso de un anticuerpo específico que detectan la forma activa de ERK, encontramos que tanto hierro como NMDA indujeron una robusta activación de la vía Ras/ERK/CREB que resultó en la fosforilación y la translocación nuclear de ERK. Preincubando las células neuronales con DFO, MAN o RY se logró prevenir tanto la fosforilación como la translocación de ERK, indicando que el hierro y los radicales  $\text{OH}\cdot$  están involucrado en la activación de esta vía de transducción de señales a través de la liberación de calcio desde depósitos intracelulares sensibles a RY. Usando una aproximación electrofisiológica encontramos que DFO inhibe la transmisión sináptica en la zona CA1 de rebanadas de hipocampo, generando una respuesta tipo LTD; este efecto de DFO ocurre a nivel post-sináptico y requiere de NMDAR funcionales, pues no ocurre en presencia de un bloqueador específico de NMDAR. Además, DFO inhibe la LTP inducida por cuatro trenes de estimulación de alta

frecuencia. Junto con esto, el sólo hecho de incubar rebanadas de hipocampo con alto hierro produjo un aumento de la transmisión sináptica (tipo LTP) además de estimular la fosforilación de ERK: ambos efectos no ocurren en rebanadas preincubadas con DFO. Finalmente, una concentración de hierro que no induce cambios en la transmisión sináptica basal, transformó a una potenciación transitoria, inducida por un solo tren de estimulación de alta frecuencia, en una más persistente. En resumen, nuestros resultados sugieren que el hierro está involucrado en la completa expresión de LTP mientras que su déficit resulta en LTD y por otro lado soportan la idea que la liberación de calcio desde compartimentos sensibles a RY pueden ser iniciados por ROS generadas por hierro durante actividad neuronal. Esta acción es posiblemente iniciada por estimulación oxidativa mediada por hierro sobre el RYR, la cual a su vez activa la vía Ras/ERK/CREB.

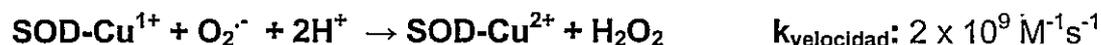
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### *1.1.1. Especies reactivas del oxígeno*

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) incluyen radicales libres que poseen un electrón no apareado, como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ): entre las ROS se incluyen, además, otras especies no radicalarias que contienen un oxígeno reactivo, tales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Las ROS han sido tradicionalmente estudiadas como mediadores de daño celular y apoptosis (Coyle & Puttfarcken, 1993; Guyton et al., 1996; Mattson et al., 2001; Thannickal et al., 2000) sin embargo, estudios mas recientes indican que también un papel como mediadoras de señales fisiológicas.

Las ROS son productos normales del metabolismo celular, pues la cadena de transporte de electrones de la mitocondria produce el anión superóxido como sub-producto. Se estima que el 2% de los electrones que pasan por este sistema se fugan y reaccionan con el oxígeno del ambiente intramitocondrial, produciendo  $O_2^{\cdot-}$  (Chance et al., 1979). El  $O_2^{\cdot-}$  dismuta a  $H_2O_2$  ya sea en forma espontánea o mediante una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Si bien el anión superóxido no es permeable, el  $H_2O_2$  si lo es. Esto hace que el  $H_2O_2$  sea el ROS predominante generado por el metabolismo celular (Banci et al., 1993; Bielski & Allen, 1977; Bielski & Cabelli, 1991; Bielski et al., 1985; Bolann et al., 1992; Ellerby et al., 1996; Getzoff et al., 1992; Klug et al., 1972).

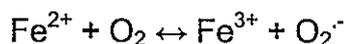


### 1.1.2. El hierro como productor de ROS

El hierro es un elemento generador de radicales libres debido a su participación en reacciones de un electrón y a su flexibilidad para cambiar su potencial de reducción según el ligando al que esté unido. En particular, mediante una reacción no-enzimática conocida como reacción de Fenton, el hierro en su estado reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) media la conversión de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que posee un moderado potencial reductor, al radical libre hidroxilo que es altamente reactivo:



Similarmente, en presencia de oxígeno el ambiente reductor intracelular favorece la reacción de  $\text{Fe}^{2+}$  con el oxígeno molecular, generando el anión superóxido en una reacción conocida como reacción de Haber-Weiss:



El  $\text{Fe}^{3+}$  producido en ambas reacciones es nuevamente reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  por reductores celulares, como ascorbato y glutatión reducido (GSH), comportándose como un catalizador de la producción de radicales libre hidroxilo y anión superóxido. No existe un mecanismo de detoxificación para el radical hidroxilo, de manera que una vez producido reacciona rápidamente con

componentes celulares como lípidos, proteínas y ADN (Gutteridge & Halliwell, 2000; Hauptmann & Cadenas, 1997).

Para mantener el hierro dentro de un rango de concentraciones que le permita ejercer sus funciones fisiológicas e impedir la formación de radicales libres, las células de mamíferos (incluyendo las neuronas) poseen un mecanismo de regulación post-transcripcional conocido como sistema homeostático IRE/IRP (Iron Responsive Element / Iron Regulatory Protein). Este sistema es activado por bajas concentraciones de hierro, induciendo la expresión del receptor de transferrina y probablemente del transportador de entrada de hierro DMT1 (Hentze & Kühn, 1996; Hubert & Hentze, 2002). El sistema IRE/IRP es también activado por estrés oxidativo, incluyendo el generado por hierro, llevando a la desregulación de la homeostasis de hierro (Núñez et al., 2003).

En neuronas, la actividad pro-oxidante del hierro no es necesariamente perjudicial, más aun, puede ser esencial si es mantenida dentro de límites fisiológicos. Es así como las células de neuroblastoma SHSY5Y crecidas en un medio con bajo hierro exhiben alteraciones en su excitabilidad, lo que incluye una reducción en el potencial de membrana basal y en las corrientes evocadas por pulsos de voltajes despolarizantes (Mura et al., en prensa). Una explicación a estos hechos podría encontrarse en la posible contribución del hierro a mantener un "tono redox" en neuronas. Sin embargo, aunque el hierro parece ser esencial para la función neuronal normal, su acumulación es una fuente de daño celular mediado por ROS (Núñez-Millacura et al., 2002; Núñez et al., 2004). Junto con el aumento en el estrés oxidativo asociado a niveles elevados de hierro,

se produce una reducción del contenido de GSH en células SHSY5Y, lo cual resulta en una disminución en el potencial de reducción medido por la razón GSH/GSSG (glutatiión oxidado) (Núñez et al., 2004). Lo anterior trae como consecuencia una masiva muerte celular que correlaciona con cambios en el potencial redox celular a valores más positivos que -300 mV (Núñez et al., 2004). Notoriamente, un porcentaje de la población celular logra adaptarse y sobrevivir aumentando su contenido de GSH aún bajo condiciones de sobrecarga de hierro (Aguirre et al., 2006). De esta forma, el hierro es un elemento que posee dos caras, pues es esencial y también potencialmente tóxico para las células neuronales. La toxicidad es producida en células que no pueden detener la acumulación de hierro a través del sistema IRE/IRP, generando un círculo vicioso de “hierro - estrés oxidativo - actividad IRP” (Núñez-Millacura et al., 2002). En este contexto, es importante destacar que durante los últimos años se ha establecido una relación causal entre la acumulación de hierro, con el inherente estrés oxidativo asociado a esta acumulación, y enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica y el mal de Parkinson (Ali et al., 2006; Berg et al., 2001; Calabrese et al., 2005; Egaña et al., 2003; Fernaeus et al., 2005; Jellinger, 1999; Mandel et al., 2005; Mundy et al., 1997; Oshiro et al., 2000; Traver et al., 2005; Sayre et al., 2005; Shoham & Youdim, 2000)

### **1.1.3. ROS y función neuronal.**

Si bien las ROS pueden producir daño celular, se sabe que cuando son generadas en bajas concentraciones por reacciones enzimáticas o mediante interacciones químicas, regulan importantes procesos como ciclo celular, transcripción génica y plasticidad sináptica (PS), entre otros (Akopian & Walsh, 2006; Chiarugi, 2003; Hu et al., 2006; Kamsler & Segal, 2004; Knapp & Klann, 2002; Liu et al., 2002; Mattson & Liu, 2002; Serrano & Klann, 2004; Thiels et al., 2000; Wolin et al., 2005; Yermolaieva et al., 2000). El concepto de que las ROS participan en cascadas de señalización es reciente. No obstante, una serie de factores de transcripción, moléculas involucradas en transducción de señales, receptores y canales iónicos son sensibles al estado redox celular (Coelho et al., 2002; Griendling et al., 2000; Lee & Esselman, 2002; Lee & Helmann, 2006; van Montfort et al., 2003; Yan et al., 2006). De esta manera, las ROS generan un determinado "tono redox" celular que determina la funcionalidad de componentes moleculares sensibles a este tono. En particular, fluctuaciones transitorias de ROS regulan los estados reducidos u oxidados de ciertos aminoácidos (cisteínas y tirosinas) en las proteínas antes señaladas, regulando así su función.

El rol del calcio como segundo mensajero en la regulación de cascadas intracelulares ha sido extensivamente estudiado y es bien conocido (Berridge et al., 2000; Brini & Carafoli, 2000; Kornhauser et al., 2002; Tao et al., 1998). Sin embargo, existe una interrelación entre la señalización mediada por calcio y ROS que es bastante menos conocida y que puede modular la activación diferencial de

vías de señalización (Camello-Almaraz et al., 2006; Chiarugi, 2003; Ischiropoulos, 2001; Liu et al., 2002; Martindale & Holbrook, 2002; Parkash et al., 2006; Squier, 2001; Touyz, 2005; Yan et al., 2006). Aunque los mecanismos celulares que regulan esta interrelación se desconocen en detalle, la activación conjunta por ROS y calcio de la liberación de calcio de depósitos intracelulares mediada por receptores de ryanodina (RYR) podría jugar un papel importante en la interrelación entre la señalización mediada por calcio y ROS. Tanto las ROS como las especies reactivas del nitrógeno (RNS) juegan un papel central entre los múltiples componentes celulares que regulan la actividad de RyR, y que incluyen además ATP, H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, ADP ribosa cíclica (cADPR) y proteínas específicas como quinasas y fosfatasas, (Hidalgo, 2005; Hidalgo et al., 2006; Fill & Copello 2002). En particular, muchos estudios han reportado modificaciones de cisteínas en el RyR por compuestos redox no fisiológicos (Aracena et al. 2003; Aracena-Parks et al., 2006; Hamilton, 2005; Hidalgo et al., 2004; Hidalgo et al., 2005; Pessah et al., 2002). Estos estudios han contribuido a entender cómo modificaciones en residuos de cisteínas cambian la función de RYR afectando la liberación de calcio y además sugiere que las moléculas redox activas producidas endógenamente podrían modular la actividad del canal. En este aspecto, cabe destacar que en la modulación de RYR se ha involucrado a distintos radicales libres, como óxido nítrico, anión superóxido e hidroxilo, ya sea por una acción directa de estos radicales o bien indirectamente a través de reacciones químicas enzimáticas o no enzimáticas secundarias que producen especies no radicales de menor reactividad, con tiempos de vida media más largos pero con la ventaja de tener

una mayor capacidad de difusión comparada con la vida media de un radical libre (Hidalgo et al., 2005; Jung et al., 2005; Kemmerling et al., 2006).

Actualmente existen algunos estudios que indican que la actividad de RYR es altamente sensible a cambios en el estado redox celular (Hidalgo, 2005), y que cambios en la razón glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) ejercen un marcado efecto en la actividad del RYR como canal de calcio (Hidalgo et al., 2004). Estas propiedades del RYR han llevado a proponer a este canal de calcio como un sensor redox intracelular (Eu et al., 2000; Hidalgo et al., 2005). Si bien se ha mostrado que los mecanismos de oxido-reducción celular modifican la actividad del RYR, no se conocen el papel ni las consecuencias que pudiesen tener estas modificaciones durante la actividad neuronal normal.

En este trabajo de tesis se propone estudiar el efecto de las ROS generadas por hierro en la liberación de calcio mediada por RYR durante la actividad neuronal, y determinar, además, las consecuencias a nivel celular, empleando como parámetro la activación de la vía ERK/MAPK, para estudiar, finalmente, como estas modificaciones a escala celular se correlacionan con modificaciones de la eficiencia sináptica, fenómeno involucrado en procesos de orden cognitivo como la memoria y el aprendizaje en el SNC adulto.

#### ***1.1.4. Memoria y mecanismos celulares de plasticidad sináptica.***

La plasticidad sináptica, definida como los cambios funcionales y estructurales que ocurren en la sinapsis en respuesta a determinada actividad

neuronal, es crítica para el procesamiento de información en el cerebro. Es ampliamente aceptado que los cambios en las conexiones sinápticas definen como las memorias son codificadas y almacenadas en el sistema nervioso central. A nivel celular, se producen estos cambios cuando una neurona post-sináptica responde a una determinada estimulación presináptica, ya sea por despolarización o bien por liberación de neurotransmisores, lo que inicia una serie de cambios metabólicos en una o en ambas neuronas, activando finalmente la expresión de genes necesarios para permitir y consolidar cambios de largo termino. En su forma mas general, la hipótesis que relaciona PS y memoria establece que: *“la plasticidad sináptica dependiente de la actividad neuronal es inducida en ciertas sinapsis durante la formación de memoria, y esta es necesaria y suficiente para almacenar información, delineando el tipo de memoria involucrada por el área del cerebro en la cual se observa plasticidad”* (Kandel & Schwartz, 1982; Lynch & Baudry, 1984; McNaughton & Morris, 1987; Morris & Frey, 1997). De esta hipótesis se puede colegir que existen distintos tipos de memoria, mediados por distintas zonas del cerebro.

La PS puede manifestarse como un aumento o un descenso en la eficiencia sináptica, denominadas, respectivamente, potenciación de largo término (LTP: Long-Term Potential) o depresión de largo término (LTD: Long-Term Depression). Si estos cambios ocurren en las mismas sinápsis que son estimuladas, estas se denominan sinapsis homo-sinápticas, y hetero-sinápticas si los cambios ocurren en sinápsis distintas de donde se produce la estimulación.

Existen variadas interrogantes que no se pretenden abarcar en esta tesis,

como por ejemplo, analizar qué tipos de LTP están involucradas en la formación de memoria, cuales son las propiedades de LTP relevantes a memoria; si ambos procesos LTD y LTP están involucrados o qué tipos de aprendizaje pueden ser mediados por LTP o LTD. Este trabajo más bien apunta a estudiar los mecanismos celulares que permiten la inducción, expresión y permanencia en el tiempo de estos procesos.

Los mecanismos celulares y moleculares de LTP y LTD han sido extensivamente estudiados en el hipocampo, área implicada en la formación de memoria espacial en ratas y en humanos. En el hipocampo, muchas formas de plasticidad, en particular LTP y LTD homo- y hetero-sinápticas, requieren para su inducción de un incremento de la concentración de calcio en la neurona postsináptica. Este aumento de calcio puede ser iniciado por influjo de calcio desde el espacio extracelular vía receptores de glutamato del tipo N-methyl-D-aspartate (NMDA) o a través de canales de calcio dependiente de voltaje (CCV). Debido a la conocida dependencia de calcio del proceso de aprendizaje, junto al hecho que la entrada de calcio mediado por los receptores de NMDA (NMDAR) ha sido bien establecido en la zona CA1 del hipocampo, mucho del trabajo experimental concerniente a la posible función de LTP en aprendizaje se ha focalizado en LTP dependiente de NMDAR (Baker & Kim, 2002; Gould & Lewis, 2005; Jia et al., 1998; Torras-Garcia et al., 2005). Estos trabajos han mostrado que bloqueando farmacológicamente los NMDAR se pueden detectar alteraciones tanto en PS como en aprendizaje (Fanselow et al., 1994; Gould & Lewis, 2005; Mao et al., 2006; Torras-Garcia et al., 2005; Toyoda et al., 2005). En forma

similar, en un ratón mutante modificado genéticamente en la sub-unidad R1 de los NMDAR se aprecian alteraciones en PS y en memoria espacial que se correlacionan con alteraciones en LTP o LTD (Collingridge & Bliss, 1995).

Las formas de plasticidad dependientes de NMDAR incluyen la clásica LTP asociativa entre la vía perforante y el giro dentado y entre las neuronas de la zona CA3 y CA1, la potenciación de corto término (STP: Short-Term Potential) y finalmente la PS asociada al acoplamiento entre los potenciales excitatorios postsinápticos (EPSPs: Excitatory Post Synaptic Potentials) y los potenciales de acción. Existen también formas de plasticidad que son independientes de los NMDAR, como la LTP que ocurre entre las fibras musgosas del giro dentado y las neuronas de la región CA3 del hipocampo. Además, la potenciación post-tetánica (PTP: Post Tetanic Potential) y la facilitación por pulsos pareados (PPF: Paired-Pulse Facilitation), ambas formas de plasticidad de corto término, son otros ejemplos de plasticidad independientes de NMDAR que se generan pre-sinápticamente (Bender et al., 2006; Duguid & Sjostrom, 2006; Lauri et al., 2006; Nicholls et al., 2006). Existe también un número de formas de PS independientes de NMDAR que pueden ser inducidas por una breve aplicación de ciertos factores de crecimiento o neurotransmisores, como BDNF (brain-derived neurotrophic factor), acetilcolina y norepinefrina (Kirkwood et al., 1999; Wibbrand et al., 2006)

En las sinapsis glutamatérgicas, el glutamato liberado desde las vesículas presinápticas, difunde a través de la hendidura sináptica para luego unirse a los receptores de  $\alpha$ -amino-3-hidroxy-5-metilisoxazole-4- propionico acid (AMPA) y NMDAR frecuentemente colocalizados en la membrana postsináptica. La

activación de los receptores de AMPA (AMPA), permite la entrada de sodio y la salida de potasio, causando una pequeña corriente postsináptica excitatoria que provoca pequeños cambios transitorios despolarizantes en el potencial de membrana, llamados potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP). Bajo condiciones de reposo, un ion  $Mg^{2+}$  en el poro del NMDAR bloquea la conducción de iones a través de este canal. Sin embargo, con una fuerte despolarización, típicamente alcanzada durante un tren de actividad presináptica de alta frecuencia o bien mediante la inyección directa de corriente a la neurona postsináptica, el  $Mg^{2+}$  es liberado del poro del canal y el NMDAR se abre permitiendo la entrada de sodio y de calcio al terminal postsináptico (Emptage et al., 1999).

Existe controversia respecto al mecanismo responsable de los cambios en los EPSP durante este tipo de eventos. Un aumento de los EPSP puede ser consecuencia tanto de una mayor concentración de glutamato en la sinapsis como de una mayor sensibilidad al glutamato por parte de la neurona postsináptica. De este modo, mecanismos pre y/o post-sinápticos pueden iniciar los cambios en la intensidad sináptica. La neurona presináptica puede liberar mayor o menor número de vesículas (aumento o descenso en la probabilidad de liberación de vesículas). Alternativamente, la eficacia sináptica puede ser incrementada o disminuida postsinápticamente, por un aumento o descenso en el número de receptores disponibles en la membrana (Lee et al., 2000). Al parecer, diferentes condiciones de estimulación favorecen uno u otro de estos mecanismos. La LTP puede ser inducida por un tren de estimulación de alta frecuencia de actividad presináptica, en tanto que un largo tren de baja frecuencia induce LTD. Este

efecto diferencial puede ser atribuido a diferencias en la duración y concentración de calcio libre postsináptico (Franks & Sejnowski, 2002; Gall et al., 2005; Ismailov et al., 2004, Johnston et al., 2003).

#### ***1.1.5. Calcio en plasticidad sináptica.***

Un aumento prolongado (>60 segundos) del calcio intracelular a bajas concentraciones ( $\sim 0.7 \mu\text{M}$ ) produce LTD; en cambio, un aumento mayor de calcio ( $\sim 10 \mu\text{M}$ ) por tiempos cortos ( $\sim 3$  segundos) produce LTP (Berridge et al., 2000). Si bien la entrada de calcio inicia la respuesta neuronal frente a un estímulo determinado, en axones y terminales nerviosos el calcio puede también provenir de otras fuentes, como el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias. Pese a que se conocen desde hace años inhibidores específicos para prevenir la salida de calcio desde estos compartimentos, solo se han ocupado recientemente para explorar si el calcio que proviene de estas fuentes participa en PS.

#### ***1.1.6. El receptor de ryanodina***

La salida de calcio desde el RE es mediada por dos tipos de canales de calcio: los receptores de IP3 (IP3R) y los receptores de ryanodina (RYR). Si bien ambos median la salida de calcio desde el RE en un proceso conocido como liberación de calcio inducida por calcio (CICR: calcium-induced calcium release), este proceso se asocia principalmente a RYR. Mediante CICR estos canales, al

ser activados fisiológicamente por calcio, responden al influjo de calcio liberando más calcio. El hecho que el RYR sea activado por calcio le confiere la propiedad de amplificar la señal de calcio, jugando un papel clave en algunos tipos de LTP. Sin embargo, la activación de RYR por calcio parece depender del estado redox de RYR, pues *in vitro* los canales muy reducidos no responden a calcio (Hidalgo, 2005; Hidalgo et al., 2004).

En mamíferos, el RYR posee al menos tres subtipos, que se han identificado en músculo esquelético (subtipo 1, RYR1), en músculo cardiaco (subtipo 2, RYR2) y en cerebro (subtipo3, RYR3). En cerebro se expresan todos los subtipos, sin embargo el más abundante es el subtipo RYR2. Se ha observado que los ARN mensajeros que codifican para las distintas isoformas son altamente expresados en el hipocampo, y en particular en las espinas dendríticas de la zona CA1. De este modo, se ha establecido que la CICR desde compartimentos intracelulares, mediada por RYR, podría ser un evento necesario para la inducción de PS, al menos en el hipocampo (Bardo et al., 2006; Kubota et al., 2005; Shimuta et al., 2001).

Una posible participación de los compartimentos intracelulares y de CICR en los aumentos de calcio evocados sinápticamente ha sido sugerida previamente (Emptage et al., 1999; Emptage et al., 2001; Petrozzino & Pozzo, 1995; Schiller et al., 1998). Las señales de calcio evocadas sinápticamente en las espinas dendríticas de neuronas hipocampales, se ha podido estudiar usando técnicas de alta resolución espacial y temporal mediante microscopía confocal (Emptage et al., 1999). Inicialmente, los aumentos globales de calcio fueron atribuidos solo a un

influjo desde el espacio extracelular, ya que bloqueando tanto los AMPAR como los NMDAR con antagonistas específicos se logra prevenir estos aumentos. Sin embargo, usando compuestos que bloquean la salida de calcio desde compartimentos internos, en particular desde fuentes sensibles a ryanodina (RY), se logra prevenir los aumentos globales de calcio pero el influjo de calcio puede ser igualmente detectado. De esta forma, la estimulación sináptica activa NMDAR produciendo entrada de calcio desde el espacio extracelular, la que estimula la salida de calcio desde el RE a través de CICR, induciéndose ya sea LTP o LTD. Es también sabido que la maquinaria estructural y molecular que permite CICR se encuentra presente en dendritas, espinas dendríticas y en filopodios dendríticos de neuronas hipocampales cultivadas (Bardo et al., 2006), de tal forma que la aplicación de agonistas de RYR, como cafeína, inducen elevaciones de calcio, además de aumentar el número y el área de superficie de las espinas (Korkotian & Segal, 1999).

La liberación de calcio desde compartimentos sensibles a RY y a tapsigargina que se observa en espinas dendríticas durante estimulación de alta frecuencia, apoya un papel importante de CICR en PS. Otros estudios han demostrado que al inhibir la bomba de calcio del RE con ácido ciclopiazónico (CPA), lo que induce el vaciamiento de este depósito, se reduce la amplitud de los aumentos de calcio inducidos por actividad neuronal (Seidler et al., 1989), lo que apoya la participación de CICR. Por otro lado, la capacidad de RY de bloquear estos aumentos indica que CICR es mediada por RYR. Finalmente, los bloqueadores de CICR no tienen efecto en la amplitud de EPSP ni en las

respuestas dependientes de NMDAR aislado (Emptage et al. 1999). Por lo tanto, RY solo reduce los aumentos de calcio provenientes desde compartimentos intracelulares sensibles a RY sin afectar la entrada de calcio que puede ser igualmente detectada por estas metodologías (Emptage et al. 1999).

### ***1.1.7. Vía ERK / MAPK en plasticidad sináptica y memoria.***

En la sección anterior se describieron los mecanismos involucrados para alcanzar postsinápticamente una determinada concentración de calcio, permitiendo la inducción de LTP o bien de LTD. A continuación se describirán ciertos procesos bioquímicos involucrados en PS, que son desencadenados por la señal de calcio y que permiten la inducción, expresión y permanencia temporal de algunos tipos de LTP.

En general, las variaciones en el calcio postsináptico estimulan proteínas quinasas y fosfatasas, modificando su estado de fosforilación en residuos de serina y treonina, eventos bioquímicos que se consideran esenciales para la iniciación y permanencia en el tiempo de LTP o de LTD, respectivamente. La CICR desde compartimentos celulares sensibles a ryanodina tiene una especial relevancia debido a que las proteínas quinasas involucradas poseen una baja sensibilidad por calcio, lo que hace necesario alcanzar una concentración suficientemente alta de calcio libre para activar estas proteínas.

El aumento de calcio en la neurona postsináptica activa diferentes cascadas, como las proteínas quinasas dependiente de calcio/ calmodulina II y IV

(CaMK II/IV) y la cascada de ERK1/2, las que a su vez activan la transcripción de genes involucrados en PS. En este contexto, el factor de transcripción CREB ha sido foco de atención por su importante papel en expresión génica dependiente de actividad neuronal y por su contribución en memoria y aprendizaje (Kornhauser et al., 2002; Silva et al., 1998). La permanencia temporal de la fosforilación de CREB determina el rango de genes afectados (Kornhauser et al., 2002). La fosforilación de CREB en su residuo Serina 133 puede ser mediada por CaMK-II y CaMK-IV, sistema de fosforilación que responde rápidamente al influjo de calcio pero sólo en forma transitoria. Por otro lado, ERK /MAPK, una familia de proteínas Ser/Thr quinasas, está involucradas en la regulación de un amplio rango de procesos celulares, incluyendo PS (Dajas-Bailador et al., 2002; Dugan et al., 1997; Ekinci et al., 1999; English & Sweatt, 1997; Guyton et al., 1996; Lander et al., 1996; Regan et al., 2001; Rothstein et al., 2002; Thiels et al., 2002). La vía ERK/MAPK se activa tardíamente en respuesta a alzas en el calcio citosólico fosforilando CREB en una etapa posterior a la fosforilación inducida por CaMK II/IV (Kornhauser et al., 2002). Algunos autores han reportado que, a diferencia de CaMK II/IV, la vía MAPK/ERK lo hace en una forma más prolongada de tal forma que este sistema puede mediar efectos más duraderos en el tiempo permitiendo la consolidación de cambios de largo término necesarios para perpetuar la memoria y el aprendizaje. Sin embargo, es necesario determinar con mayor precisión la importancia relativa de las distintas vías de fosforilación de CREB para la expresión génica (Tao et al., 1998; West et al., 2001).

La capacidad de la vía ERK/MAPK de integrar señales coincidentes y de

transducir la magnitud de estas señales hacia respuestas espacio-temporales, apoya la participación de esta vía en la PS del sistema nervioso central. El nexo entre MAPK, plasticidad sináptica y memoria proviene de la observación que los componentes de esta vía están altamente expresados en áreas del cerebro implicadas en memoria y aprendizaje, como la amígdala, la corteza y el hipocampo (Cannich et al., 2004; Chwang et al., 2006; Banko et al., 2004; Botreau & Gisquet-Verrier, 2006; Hugues et al., 2006; Kelleher et al., 2004; Trifilieff et al., 2006). Además, en la zona CA1 del hipocampo, algunos tipos de LTP están asociados a una activación de ERK/MAPK, cuyo efecto es bloqueado parcialmente por inhibidores de MEK, una quinasa activadora río arriba de ERK (Kushner et al., 2005; Nakamichi et al., 2002; Shalin et al., 2004; Shalin et al., 2006; Sweatt, 2004; Villarreal & Barea-Rodriguez, 2006). Por último, existen paradigmas de aprendizaje que permiten evaluar distintos tipos de memoria en ratas, y que han permitido estudiar la participación de MAPK en la formación y consolidación de la memoria. Al respecto, el condicionamiento contextual al miedo, un paradigma dependiente del hipocampo, produce un marcado aumento en la activación de ERK/MAPK en ratas sometidas a este tipo de condicionamiento asociativo (Atkins et al., 1998). Utilizando el laberinto acuático de Morris (Morris Water Maze), otro tipo de paradigma también dependiente del hipocampo que mide la orientación espacial de un animal entrenado, se ha logrado determinar un aumento en la fosforilación de ERK/MAPK específicamente en el hipocampo dorsal, región del cerebro requerida para el aprendizaje de tipo espacial (Blum et al., 1999).

Junto con la evidencia bioquímica, existe evidencia genética tanto en

invertebrados como en vertebrados de la importancia de la vía ERK/MAPK en plasticidad sináptica y memoria. Mutantes de *Drosophila* y ratones transgénicos que presentan alteraciones en la vía Ras/MAPK muestran un déficit en la formación de memoria asociativa en ciertos paradigmas de aprendizaje (Brambilla et al., 1997).

Los datos anteriores indican que la vía ERK/MAPK tiene un importante papel en PS. Sin embargo, las vías que conducen a la activación de ERK/MAPK son extremadamente complejas. En particular, la vía ERK/MAPK es sensible a cambios en la amplitud y la frecuencia de los cambios de la concentración de calcio libre en el citoplasma, y posee además una fuerte dependencia del estado redox celular (Knapp & Klann, 2002; Guyton et al., 1996; Liu et al., 2002; Thannical et al., 2000; Thiels et al., 2000).

Estudios en distintas líneas celulares y en neuronas en cultivo muestran que el peróxido de hidrogeno puede producir activación de ERK (Crossthwaite et al., 2002; Griendling et al., 2000; Guyton et al., 1996). Incluso, usando células PC-12 se observó que la activación de ERK mediada por peróxido se bloquea por tratamientos con el antioxidante NAC, con el quelante de  $Fe^{2+}$  o-fenantrolina o con manitol (atrapador de radical libre hidroxilo). Esto indica que la formación de radicales libres generados por hierro podría participar iniciando una cascada de señalización redox que lleva a la activación de ERK (Guyton et al., 1996). Este hecho resulta de especial relevancia al momento de analizar la posible participación de ROS generadas por hierro en la activación de ERK y su relación con PS.

### **1.1.8. Especies Reactivas de Oxígeno en Plasticidad Sináptica.**

La activación de NMDAR requerida para varias formas de PS en hipocampo estimula la producción de un número de segundos mensajeros, incluyendo entre otros cAMP, óxido nítrico, ácido araquidónico y, por supuesto, el calcio discutido en la sección anterior. Recientemente, las ROS se han sumado a la lista de moléculas generadas luego de la activación de NMDAR (Bindokas et al., 1996; Kishida et al., 2005).

El papel de ROS en modular la transmisión sináptica es complejo y depende de la concentración y duración del estímulo oxidante. En condiciones en las que se promueve estrés oxidativo, la transmisión sináptica se encuentra disminuida debido posiblemente a modificaciones oxidativas irreversibles en proteínas que participan en este proceso (Kamsler & Segal, 2003). Sin embargo, luego de la inducción de LTP se ha podido detectar la generación neuronal de ROS (Knapp & Klann, 2002; Thiels et al., 2000). Esta observación sugiere que las ROS pueden ser necesarias para la inducción del fenómeno y, además, indirectamente, relaciona la generación de ROS con actividad neuronal normal. Consistente con esto, ha sido reportada la necesidad de ROS tanto para PS como para memoria y aprendizaje, como se resume a continuación.

La activación farmacológica de NMDAR resulta en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  (Bindokas et al., 1996), lo que podría considerarse un efecto secundario indeseado de la actividad neuronal, con lo que surge la pregunta si la generación de  $O_2^{\cdot-}$  cumple alguna función fisiológica. Al parecer, adscribirle al  $O_2^{\cdot-}$  sólo un

efecto neurotóxico no es válido, pues cuando se inhibe la producción de  $O_2^-$  se inhibe notablemente la inducción de LTP (Knap & Klann, 2002; Thiels et al., 2000). La producción de  $O_2^-$  parece ser específica para el NMDAR, debido probablemente a que la maquinaria generadora de superóxido se encuentra asociada a estos receptores ionotrópicos, lo que podría explicar la especificidad del proceso (Tejada-Simon et al., 2005; Kishida et al., 2005). El complejo NADPH oxidasa es una fuente recientemente caracterizada que genera superóxido durante la estimulación de NMDAR en neuronas, particularmente a nivel sináptico (Tejada-Simon et al., 2005). Esta oxidasa ha sido ampliamente caracterizada en células del sistema inmune (Babior, 2004; Cross & Segal, 2004). El hecho de que la inducción de LTP sea bloqueada por secuestradores permeables e impermeables de superóxido, y que cuando se incuban rebanadas de cerebro con SOD, una enzima antioxidante que cataliza la remoción de superóxido, se atenúa la inducción de LTP en el área CA1 del hipocampo (Knap & Klann, 2002; Thiels et al., 2000) sugiere que el anión superóxido desempeña un papel importante en la inducción de LTP. Consistente con lo anterior, en rebanadas de ratones transgénicos que sobreexpresan la isoforma Cu/Zn-SOD es posible observar alteraciones en LTP (Hu et al., 2006; Serrano & Klann, 2004). A diferencia de lo que ocurre con LTP, en estos ratones mutantes la potenciación post-tetánica (PPT) y la potenciación de corto término (STP) son insensibles a tratamientos con atrapadores de radical superóxido, lo que indica que este radical no está involucrado en el mecanismo molecular que produce PPT o STP, y que el anión superóxido puede jugar un rol central en la transducción que se produce luego de

la inducción de LTP (Knap & Klann, 2002; Thiels et al., 2000). De esta forma, el anión superóxido puede ser producido como resultado de, o en conjunción con, otras moléculas necesarias para el LTP.

Aunque diversos estudios han implicado al superóxido en activación de quinasas relacionadas con PS, como PKC y ERK, el mecanismo de acción del superóxido no está aún definido (Kanterewicz et al., 1998; Knapp & Klann, 2002; Lee & Esselman., 2002). Aunque el superóxido puede mediar su efecto en PS, se ha descrito también el efecto de otras ROS, como  $H_2O_2$ , que impactan fuertemente vías de señalización que modulan PS (Hu et al., 2006; Malinow et al., 1989; Watson et al., 2002). La incubación de rebanadas de hipocampo con la enzima catalasa atenúa el LTP, sugiriendo un rol para  $H_2O_2$  en PS (Kamsler & Segal, 2003b; Kamsler & Segal, 2004; Watson et al., 2002; Yermolaieva et al., 2000). Otros estudios electrofisiológicos dan cuenta de resultados contradictorios y de difícil interpretación, mostrando el grado de complejidad del efecto redox. Usando rebanadas de hipocampo de rata se encontró que una alta concentración de  $H_2O_2$  (0.5-5 mM) reduce los EPSP tanto en sinapsis potenciadas como no potenciadas. La exposición a 20  $\mu M$   $H_2O_2$  no tiene ningún efecto en la expresión de LTP, pero previene la inducción de un nuevo LTP y aumenta la LTD. Sorpresivamente, una concentración de 1  $\mu M$  causa un aumento de dos veces en LTP comparado al control en ausencia de peróxido y suprime el LTD. Otro importante efecto de la baja concentración de  $H_2O_2$  (1  $\mu M$ ) es la pérdida de un tipo de LTP independiente de NMDAR, que es inducido por bajas concentraciones de agonistas muscarínicos (Kamsler & Segal, 2003a). Pareciera entonces que concentraciones altas de  $H_2O_2$ ,

muy improbables de ocurrir bajo condiciones fisiológicas, pueden dar origen a reacciones oxidativas secundarias no relacionadas con una respuesta fisiológica. Por otro lado, concentraciones bajas de  $H_2O_2$  pueden ser parte del mecanismo normal de inducción de LTP.

Dentro del contexto de niveles regulados de ROS como inductores de la función neuronal, las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss que involucran al anión superóxido y al peróxido de hidrogeno, podrían tener relevancia biológica, pues la primera traduce cambios en las concentraciones de peróxido en cambios de radical hidroxilo, y la segunda puede generar o atrapar anión superóxido. Si bien no existen estudios que relacionen directamente estos radicales generados por hierro en transmisión sináptica y PS, existen datos clínicos que muestran que la deficiencia de hierro durante la infancia tiene un fuerte impacto en algunas funciones cognitivas relacionadas con PS, y que este efecto persiste en el individuo adulto aunque se restauren sus niveles normales de hierro (Jorgenson et al., 2005; McEchron & Paronish, 2005).

El hierro juega un papel especial en la función neuronal. En seres humanos, la anemia por déficit de hierro se asocia con un menoscabo en el desempeño de tareas motoras y mentales, así como también con cambios conductuales (Eden, 2005; Grantham-McGregor & Ani, 2001; Lozoff et al., 1991). Mas aun, estudios realizados en animales han revelado que las ratas alimentadas con una dieta baja en hierro durante etapas tempranas de su desarrollo poseen alteraciones irreversibles en la función cerebral, que están asociadas a una insuficiente mielinización (Beard & Connor, 2003), un establecimiento defectuoso

del tracto dopaminérgico (Agarwal, 2001; McGahan et al., 2005) y a un déficit persistente de las capacidades sensoriales asociadas a los sistemas hipocampales (Felt et al., 2006).

Los niños con deficiencia de hierro (DH) presentan alteraciones cognitivas, motoras y socio-emocionales. La DH durante estados tardíos fetales o durante estados postnatales tempranos es una condición que causa deterioro del aprendizaje y la memoria en seres humanos mientras permanece la condición de deficiencia, o incluso posterior a la suplementación de hierro (Jorgenson et al., 2005; McEchron & Paronish, 2005). En forma consistente con estas alteraciones observadas, se ha demostrado usando ratas como modelo animal que la DH fetal se traduce en significativas anormalidades estructurales y bioquímicas que pueden predisponer la región del hipocampo a una electrofisiología alterada. Ratas sometidas a una condición de deficiencia de hierro durante estados embrionarios o bien durante estados postnatales tempranos no mostraron diferencias en la transmisión sináptica basal al comparar ratas en día postnatal (P) 15 y P30 en condiciones de DH y ratas P15 y P30 con niveles normales de hierro, en la región CA1 del hipocampo. Sin embargo, en el grupo DH no fue posible observar la misma madurez sináptica alcanzada en ratas P65 normales durante el desarrollo. También se observó que la PPF se encontraba alterada en el grupo con DH. Junto con las observaciones anteriores se pudo comprobar que en este grupo la expresión de LTP era menor tanto en P30 como P65 (Jorgenson et al., 2005). En otro estudio realizado en rebanadas de hipocampo provenientes de ratas P25 y P37 con niveles normales de hierro y DH desde el día gestacional 11, no se logró

mostrar alteraciones en PPF o LTP medidas en la regiones DG y CA1 (McEchron & Paronish, 2005), lo cual sugiere que la fisiología de los centros cognitivos y de aprendizaje en el cerebro, tales como el hipocampo, pueden estar comprometidos diferencialmente por DH durante el desarrollo y en las distintas zonas del hipocampo.

Los mecanismos exactos que median estas alteraciones son totalmente desconocidos, aunque los autores asocian este efecto perjudicial de la carencia de hierro para las funciones cognitivas a alteraciones en el SNC durante el desarrollo, debido a que los animales con deficiencia de hierro durante el embarazo evidencian anomalías estructurales en las conexiones sinápticas. Si bien no han sido explorados los posibles efectos de la carencia de hierro en el SNC adulto, donde también ocurren cambios en las conexiones sinápticas similares a las observadas durante el desarrollo, nuestro trabajo postula que el hierro puede jugar un papel importante en la instauración y la permanencia temporal de procesos cognitivos, no solo participando a través de formar parte estructural de algunas proteínas involucradas en la transmisión sináptica, sino también manteniendo un estado redox celular adecuado para que ocurran los eventos necesarios para PS.

Resumiendo, la liberación de calcio inducida por influjos de calcio a través de NMDAR en respuesta a actividad neuronal puede activar la vía ERK/MAPK, que además posee una fuerte dependencia oxidativa. En esta vía el hierro juega un importante papel, si bien las bases moleculares no están definidas. El conocimiento de la comunicación cruzada entre los estímulos oxidativos mediados por hierro y la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a

ryanodina, podría proporcionar nuevos elementos para entender el proceso de PS y sus posibles alteraciones durante estrés oxidativo y envejecimiento.

## **1.2. Hipótesis**

*Las ROS generadas por hierro durante la actividad neuronal participan necesariamente en las cascadas de señalización redox que modulan la respuesta primaria de liberación de calcio inducida por calcio vía RYR.*

## **1.3. Objetivo General**

Determinar si ROS y radicales libres producidos por hierro modifican las señales de calcio inducidas por actividad neuronal y generan patrones de activación de ERK/MAPK y estudiar la relevancia fisiológica de esta activación en plasticidad sináptica.

## **1.4. Objetivos Específicos.**

***Objetivo 1: Determinar la interacción entre ROS mediadas por hierro y las señales de calcio.***

1.1. Estudiar el efecto del hierro en la concentración de ROS, como peróxido de hidrógeno y el radical libre hidroxilo - especies involucradas en la reacción de Fenton - en células PC-12 indiferenciadas y en neuronas hipocámpales de rata cultivadas 10 a 14 días en condiciones de reposo o estimuladas con NMDA.

1.2. Estudiar el efecto del hierro en la concentración de calcio libre, en células PC-12 indiferenciadas y neuronas hipocampales de rata cultivadas 10 a 14 días en condiciones de reposo o estimuladas con NMDA.

1.3. Estudiar la participación de ROS generadas por hierro en la liberación de calcio mediada por calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY en las distintas condiciones antes señaladas.

***Objetivo 2: Determinar las consecuencias celulares de la interacción entre ROS generados por hierro y las señales de calcio evaluando cambios en la activación de ERK/MAPK.***

2.1. Estudiar el efecto del hierro en la activación de ERK 1 y 2, en células PC-12 indiferenciadas y en neuronas hipocampales de rata cultivadas 10 a 14 días, en condiciones de reposo y estimuladas con NMDA.

2.2. Estudiar el efecto transcripcional del hierro en la fosforilación del factor de transcripción CREB, en neuronas hipocampales cultivadas entre 10 a 14 días en condiciones de reposo y estimuladas con NMDA.

***Objetivo 3: Determinar las consecuencias fisiológicas de ROS generadas por hierro en fenómenos de plasticidad sináptica (LTP o LTD) correlacionándolas con cambios en la concentración de calcio y en la activación de MAPK.***

3.1. Determinar en rebanadas de hipocampo de rata y de ratón el efecto oxidativo del hierro en la inducción y/o duración de LTP, evaluando posibles alteraciones en estos procesos en presencia de DFO.

3.2. Determinar en rebanadas de hipocampo de rata y de ratón si cambios en las concentraciones de hierro producen cambios en la transmisión basal.

3.3. Evaluar si hierro participa en la activación de ERK / MAPK durante las condiciones antes señaladas en micro secciones de la zona CA1 en rebanadas de hipocampo.

*(Este objetivo se realizó en los laboratorios del Dr. Alfredo Kirkwood, Department of Neuroscience, Mind/Brain Institute, Johns Hopkins University, Baltimore, USA y del Dr. Eric Klann, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston, USA).*

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **2.1. MATERIALES.**

#### **2.1.1. Reactivos Generales.**

De Sigma Chemical Co. (Saint Louis, USA) se obtuvieron: Tris base, buffer fosfato salino (PBS) Dulbecco, NP-40, Hepes, PMSF,  $\beta$ -mercaptoetanol. Desferoxamina Mesilato, EDTA-Na, Dithiothreitol, ácido bórico, NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaOH,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , glicina,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , glucosa,  $\text{CH}_3\text{COOK}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , metanol, etanol, tween 20, glicerol, Tritón X-100, SDS, estándares de peso molecular, BAPTA-AM.

#### **2.1.2. Anticuerpos y western blot.**

De Sta Cruz: Anti-ERK fosforilada (monoclonal), anti-ERK total (poli-clonal), anti-CREB fosforilada (policlonal), anti-MAP1B (policlonal).

De Sigma: anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano, anti IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano.

Membrana de Immobilon-P (Millipore).

#### **2.1.3. Fluoróforos.**

De Molecular Probes: Fluo-3 AM,  $\text{H}_2\text{DCF-AM}$ , TEMPO-9-AC, SYTO-62, Anti IgG de ratón hecho en burro conjugado a Alexa-Fluor 488, Anti IgG de cabra hecho en burro conjugado a Alexa-Fluor 594.

#### **2.1.4. Equipos.**

Microscopio Confocal, Carl Zeiss LSM 510 meta; Microscopio de epifluorescencia, Carl Zeiss; Espectrofotómetro UV-VIS, Perkin Elmer 559; Lector de placas Sunrise, Tecan (Austria); Incubador CO<sub>2</sub>-water Jacketed, Auto Flow, Nuaire; Minigel Bio Rad, mini Proteans; Transblot Bio Rad; Campana de Flujo laminar, Nuaire, UN-201-430; centrifuga Beckman J2-21 (CA,USA); Microcentrífuga refrigerada Mikro 22R, Hettich (Germany), lector de placas fluorescente CytoFluor II, cámara Maximov.

#### **2.1.5. Cultivo celular.**

De Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg, USA, se obtuvieron: Dulbeco's modificado Essential medium (DMEM), MEM, Medio neurobasal, Suplemento B27 (con antioxidantes), tripsina, fungizona, penicilina, estreptomycin, suero fetal bovino (FBS), suero de caballo (HS).

#### **2.1.6. Materiales de Cultivo.**

Botellas plásticas de 40ml, área de crecimiento 25cm<sup>2</sup>, Costar (3025).

Placas de cultivo 6 pocillos, 35mm diámetro, Costar (3406).

Placas de cultivo 24 pocillos, 16mm diámetro, Costar (3424).

Tubos de centrifugas plásticos 50ml y 15ml, Falcon.

Pipetas plásticas desechables Costar, 10 ml (4101), 5 ml (4050).

Unidades de filtración desechables, tamaño de poro 0,2 µm Costar, 500 ml.

Placas de Elisa, Nunc Inc.

### **2.1.7. Material biológico.**

Células PC12 (pheocromocitoma) de rata derivada de la glándula suprarrenal (Greene & Tischler, 1976), cultivo primario de neuronas hipocampales de rata, mantenidas en cultivo entre 10 a 14 días y rebanadas de hipocampo de rata y de ratón.

## **2.2. MÉTODOS**

### **2.2.1. Cultivos celulares.**

#### **2.2.2. Células PC12.**

Células PC12 fueron mantenidas en DMEM suplementado con 10% de FBS (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY), 5% de suero de caballo, 100.00 UI de penicilina/estreptomicina y 25 mg/ml de fungizona. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células en botellas de 25 ml. Se crecieron por seis días, cambiando el medio cada tres días. Se mantuvieron en un incubador a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron tripsinizadas y resembradas en iguales condiciones. Antes de realizar los tratamientos con los diferentes agentes las células fueron mantenidas en estado de reposo proliferativo durante 24 horas en un medio bajo en suero (DMEM suplementado con 1% de FBS (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY).

Los cultivos sometidos a tratamientos con el antioxidante N-acetil-cisteína (NAC, 500 µM), los atrapadores del radical hidroxilo manitol (MAN, 100 mM) o formato de

sodio (FORM, 300  $\mu$ M), el quelante de hierro deferoxamine (DF0, 500  $\mu$ M), el quelante permeable de calcio (BAPTA-AM, 10  $\mu$ M) o un bloqueador de RYR (RY, 20  $\mu$ M), fueron incubados con estos reactivos durante sesenta minutos antes del tratamiento con hierro o NMDA en DMEM 1% FBS.

### **2.2.3. Cultivo Primario de hipocampo de rata.**

Se utilizaron cerebros de embriones de ratas de 18 días. Los hipocampos extraídos fueron puestos en solución salina de Hanks modificada (mHBSS: Hank's buffer salt solution) y lavados tres veces para luego agregar tripsina (0,25%). Luego de este tratamiento, los hipocampos fueron lavados con mHBSS y transferidos a medio MEM suplementado con 10% de HS, disgregándose con pipeta Pasteur. La suspensión celular fue colectada por centrifugación a baja velocidad (2000 rpm X 20s) a temperatura ambiente. El sobrenadante fue guardado y el pellet fue nuevamente disgregado con una pipeta Pasteur de punta muy fina. Se realizó otra centrifugación a baja velocidad (2000 rpm X 20 s) a temperatura ambiente. El sobrenadante que contiene las células en suspensión fue juntado con el sobrenadante anterior y las células viables fueron contadas usando azul de Tripán (0,2%). Posteriormente, las neuronas se sembraron en placas de cultivo o bien, en cubreobjetos tratados previamente con poli-L-Lisina (0,1 mg/ml) en MEM suplementado con 10% HS. Luego que las neuronas hipocampales se adhirieron a la placa o al cubreobjeto, se les cambio de medio por un medio Neurobasal suplementado con B27, manteniéndose en cultivo entre

diez a catorce días. Los cultivos que fueron sometidos a tratamientos con el atrapador del radical hidroxilo como MAN (100 mM), el quelante de hierro como DF0 (500  $\mu$ M) o el bloqueador de RYR (RY, 20  $\mu$ M) se incubaron con estos reactivos durante sesenta minutos antes del tratamiento con hierro o NMDA en medio Neurobasal suplementado con B27.

#### **2.2.4. Preparación de rebanadas de hipocampo.**

Los hipocampos de ratas machos Sprague Dawley o ratones machos C57/B16 de tres semanas fueron removidos y colocados rápidamente en la solución salina de corte conteniendo: sacarosa 110 mM, NaCl 60 mM, KCl 3 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25 mM,  $\text{NaHCO}_3$  28 mM, D-glucosa 5 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.5 mM,  $\text{MgCl}_2$  7 mM, ácido ascórbico 0.6 mM y 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$  equilibrando la solución. Se usó un vibrátomo para cortar rebanadas de 400  $\mu$ m, las cuales fueron transferidas a una mezcla 1:1 de solución de corte y fluido cerebroespinal artificial (ACSF) compuesto de: NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, D-glucosa 25 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM y  $\text{MgCl}_2$  1 mM, equilibrada también con 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Las rebanadas fueron mantenidas a temperatura ambiente por al menos treinta minutos y entonces transferidas a una cámara de registro donde fueron estabilizadas y perfundidas sólo con ACSF a 32°C durante una hora antes de realizar los experimentos electrofisiológicos (Kirkwood et al. 1996) o bien las estimulaciones farmacológicas con NMDA,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{FeSO}_4$  o  $\text{FeCl}_2$ . Luego de las manipulaciones farmacológicas al menos dos rebanadas por condición fueron

congeladas en hielo seco. La zona CA1 fue microdisectada y homogenizada para ser guardada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis bioquímico (Kishida et al.2005).

#### **2.2.5. Detección del radical libre hidroxilo.**

La detección del radical libre hidroxilo se realizó usando el atrapador fluorogénico TEMPO-9-AC y el lector de placas fluorescente. Las células neuronales (PC12 o neuronas en cultivo primario) cultivadas en placas de 6 ó 24 pocillos fueron incubadas durante treinta minutos con TEMPO-9-AC  $20\mu\text{M}$  en DMEM sin rojo fenol suplementado con 1% de FBS, 0,5% de suero de caballo. Luego de la incubación se lavó con PBS el exceso de sonda no incorporada. Las células fueron excitadas a 358 nm y la emisión de la sonda activa fue registrada a 424 nm. Cambios en la fluorescencia de TEMPO-9-AC inducidos ya sea por hierro o NMDA, se midió en ausencia o en presencia de agentes que previenen o neutralizan la reacción de Fenton.

#### **2.2.6. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno.**

Células PC12 sembradas en cubreobjetos de vidrio fueron incubadas con  $5\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  por treinta minutos en HBSS. Luego de lavar las células con HBSS, se transfirieron al microscopio confocal en una cámara Maximov para su visualización. Se dejaron estabilizar por 20-30 minutos adicionales lo que permitió además la desesterificación de la sonda. La fluorescencia de DCF fue monitoreada continuamente cada 90 s en el microscopio confocal usando una

longitud de onda de excitación de 488 nm y el filtro de corte de 505-530 nm, cinco minutos antes y quince minutos posterior a la adición de Fe-NTA 20  $\mu$ M o NMDA 100  $\mu$ M.

El análisis cuantitativo fue realizado con el programa Zeiss LSM Image Browser. Básicamente, la intensidad de fluorescencia de cada célula en el campo observado fue determinada, promediada y normalizada con respecto a los valores de fluorescencia antes de agregar el estímulo.

### **2.2.7. Determinación de Calcio intracelular.**

Se sembraron células PC-12 en cubreobjetos de vidrio (10 x 20 mm) o neuronas hipocampales en cubreobjetos de vidrio (10 x 20 mm) tratados previamente con poli-L-Lisina (0,1 mg/ml). En ambos casos las células se cargaron con 5  $\mu$ M Fluo3-AM a 37°C en el incubador por 30-40 minutos en HBSS. Luego de cargar las células son lavadas para retirar el fluoróforo no incorporado y transferidas al microscopio confocal en una cámara Maximov para su visualización. Se dejaron estabilizar por 20-30 minutos adicionales permitiendo además la desesterificación de la sonda. La fluorescencia del Fluo3 fue monitoreada en el microscopio confocal excitando con un láser de argón a 488 nm y registrando la fluorescencia emitida usando un corte en la longitud de onda >505 nm (Grynkiewicz et al., 1985; Takahashi et al., 1999).

Para experimentos con NMDA, la solución HBSS libre de  $Mg^{+2}$  fue

suplementada con glicina (10  $\mu$ M) y la fluorescencia de un cuadro fue monitoreada continuamente a intervalos de 30 s.

Para los experimentos con Fe-NTA, las células fueron transferidas a HBSS modificado libre de  $\text{Ca}^{2+}$  para descartar que cambios en la fluorescencia sean por entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Para aumentar la resolución temporal de los eventos de  $\text{Ca}^{+2}$ , en estos experimentos se monitoreó sólo una línea cada 2 ms. Las imágenes representando el promedio de dos líneas fueron registradas para el análisis. La señal de  $\text{Ca}^{+2}$  es presentada como valores de  $\Delta F/F_0$ , donde  $F_0$  corresponde a la fluorescencia basal obtenida desde 2000 a 4000 líneas. Después de la adición de hierro, la fluorescencia fue registrada durante 2000 a 4000 líneas adicionales. La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  fue considerada ser un evento cuando la amplitud de esta fue al menos dos veces la desviación estándar del ruido basal. Aunque arbitrario, este parámetro ha sido usado en otros tipos celulares (Cheng et al., 1999). Todos los experimentos fueron hechos a temperatura ambiente (20-22°C).

### **2.2.8. Western Blots de extractos de células PC12.**

Para preparar los extractos celulares las células PC-12 se soltaron de la placa con Tris-salino EDTA y se colectaron por centrifugación. El sobrenadante fue removido y las células se resuspendieron en buffer de lisis (50  $\mu$ l /  $1 \times 10^6$  células de HEPES 10 mM/pH 7,5; 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 40 mM KCl; 1 mM PMSF; 10  $\mu$ g/ml de leupeptina; 0,5  $\mu$ g/ml de aprotinina; 0,7  $\mu$ g/ml de pepstatina A; 5% glicerol; 1

mM de DTT; 0,5% de Triton X-100). Se cargaron 70 µg de proteína en un gel 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE). Una vez separadas las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente con leche descremada 5% en solución de Tris salina compuesta de: Tris-HCl pH 7, NaCl 150mM y 0,05% Tween-20 Tris-salino con 0.2% Tween-20 (T-TBS). La incubación con el anticuerpo primario contra la proteína ERK fosforilada se realizó durante dos horas a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos en cada lavado con T-TBS, para luego incubar durante una hora el anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano. Se reveló usando un método quimioluminiscente (ECL). Las membranas fueron reensayadas con anticuerpo primario anti ERK total y anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano, usando un protocolo similar al descrito.

#### **2.2.9. Western Blots de rebanadas de hipocampo de ratón.**

Subregiones CA1 de hipocampo de ratón fueron microdisectadas y homogenizadas en una solución de lisis (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, NaF 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM y dilución 1X de una mezcla de inhibidores de fosfatasa compuesto de cantharidina, bromotetramisole, microcistina LR, ortovanadato de sodio, molibdato de sodio, tartrato de sodio e imidazol). La concentración total de proteínas fue determinada por el método de

Bradford (Bradford 1976). Se cargaron cantidades equivalentes de proteína en un gel 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE). Una vez separadas las proteínas se electro-transferieron a una membrana de Immobilon-P (Millipore), que se bloqueó luego durante una hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo: I-Block 0,02% en solución compuesta de Tris-HCl pH 7, NaCl 150 mM y 0,05% Tween-20 (T-TBS). La incubación con el anticuerpo primario contra la proteína ERK fosforilada se realizó durante dos horas a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos en cada lavado con T-TBS, para luego incubar durante una hora el anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano. Se reveló usando un método quimioluminiscente (ECL). Las membranas fueron re-ensayadas con un anticuerpo primario anti ERK total y anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano, usando un protocolo similar al descrito.

#### **2.2.10. Localización subcelular de ERK en células PC12.**

Luego del tratamiento con hierro o NMDA, las células PC12 crecidas en cubreobjetos fueron lavadas con PBS y fijadas en paraformaldehído 4% y sacarosa 4% en PBS por veinte minutos. Luego fueron permeabilizadas con Triton X-100 en PBS (0.1 %) por diez minutos. Las células fueron doblemente teñidas usando un anticuerpo monoclonal contra la proteína ERK fosforilada (1:50) y otro anticuerpo policlonal contra la proteína ERK total, independiente de su estado de

fosforilación (1:200) durante toda la noche a 4°C. Seguido de esto, las células fueron lavadas e incubadas con una mezcla de un anticuerpo anti IgG de ratón hecho en cabra conjugado con Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes.1:200) junto con un anticuerpo anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado con Alexa-Fluor (Molecular Probes.1:200). Los cubreobjetos fueron montados en un portaobjeto con medio de montaje Entellan.

Las preparaciones fueron observadas usando microscopio confocal Zeiss LSM 510 usando una configuración multitrack que permite la excitación con dos diferentes longitudes de onda (Exc = 543 nm. Filtro 560 nm) para CY y (Exc = 488 nm, filtro 505-530 nm) para FITC.

#### **2.2.11. Localización subcelular de ERK en neuronas hipocampales en cultivo.**

Luego del tratamiento con hierro o NMDA, las neuronas hipocampales en cultivo crecidas en cubreobjetos fueron lavadas con PBS y fijadas en paraformaldehido 4% y sacarosa 4% en PBS por veinte minutos. Luego fueron permeabilizadas con Triton X-100 en PBS (0.1 %) por diez minutos. Las células fueron doblemente teñidas usando un anticuerpo monoclonal contra la proteína ERK fosforilada (1:50) y otro anticuerpo policlonal contra la proteína MAP1B (1:200) durante toda la noche a 4°C. Seguido de esto, las células fueron lavadas e incubadas con una mezcla de un anticuerpo anti IgG de ratón hecho en burro

conjugado con Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes.1:200) junto con un anticuerpo anti IgG de cabra hecho en burro conjugado con Alexa-Fluor 594 (Molecular Probes.1:200). Los cubreobjetos fueron montados en un portaobjeto con medio de montaje Entellan. Las preparaciones fueron observadas usando microscopio confocal Zeiss LSM 510 usando una configuración multitrack que permite la excitación con dos diferentes longitudes de onda (Exc = 488 nm, filtro 505-530 nm) y (Exc = 543 nm. Filtro 560 nm).

#### **2.2.12. Fosforilación de CREB en neuronas hipocampales en cultivo.**

Luego del tratamiento con hierro o NMDA, neuronas hipocampales en cultivo crecidas en cubreobjetos fueron lavadas con PBS y fijadas en paraformaldehído 4% y sacarosa 4% en PBS por veinte minutos. Luego fueron permeabilizadas con Triton X-100 en PBS (0.1 %) por diez minutos. Las células fueron doblemente teñidas usando un anticuerpo policlonal contra la proteína CREB fosforilada en el residuo Ser133 (Santa Cruz, 1:50). Seguido de esto, las células fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado con Alexa-Fluor 594 (Molecular Probes.1:200). Como contra-tinción nuclear se usó el marcador rojo lejano SYTO 62 (Molecular Probes, 1:500) en neuronas tratadas previamente con RNAasas durante una hora a 37°C. Los cubreobjetos fueron montados en un portaobjeto con medio de montaje Entellan.

Las preparaciones fueron observadas usando microscopio confocal Zeiss

LSM 510 usando una configuración multitrack que permite la excitación con dos diferentes longitudes de onda (Exc = 543 nm. Filtro 560 nm) para CY y (Exc = 488 nm, filtro 505-530 nm) para FITC.

### **2.2.13. Registros electrofisiológicos en rebanadas de hipocampo.**

Para obtener los datos electrofisiológicos se estimularon simultáneamente dos rebanadas dentro de la misma cámara de registro. Las respuestas sinápticas fueron evocadas estimulando las fibras colaterales de Schaffer con pulsos de 0,2 ms aplicados con un electrodo de estimulación bipolar concéntrico y registradas extracelularmente en el *stratum radiatum* de la zona CA1 del hipocampo. La respuesta basal fue obtenida por estimulación cada 30s (0,033 Hz) durante 20 minutos antes de la inducción del LTP, usando una intensidad de corriente que evoca una pendiente del potencial de campo (fEPSP) equivalente a la mitad de la pendiente máxima. La inducción de LTP se hizo con un protocolo de inducción consistente en un tren de estimulación tetánica de alta frecuencia (TBS: Theta Burst Stimulation) consistente de diez tétanos (bursts) separados por 200ms (5 Hz). Cada tétano compuesto de cuatro pulsos separados por 10ms cada uno (100 Hz). La inducción de L-LTP se realizó con un protocolo de inducción consistente en cuatro trenes de estimulación tetánica de alta frecuencia (4XTBS) aplicados cada 20 s (0,05 Hz) (Kirkwood et al., 1996).

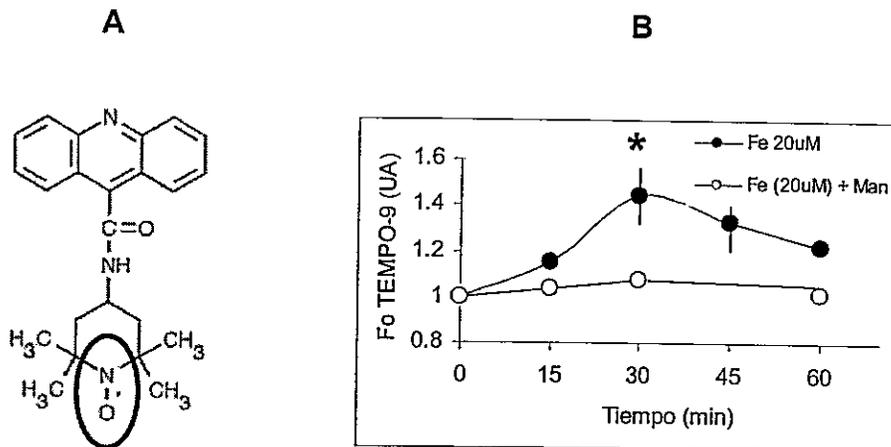
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Determinación de la interacción entre ROS mediadas por hierro y las señales de calcio.

De todas las ROS celulares, el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) es la más reactiva y en sistemas biológicos se forma principalmente a través de la reacción de Fenton. Además, está bien establecido que los niveles de hierro juegan un papel crítico en iniciar y catalizar una variedad de reacciones que involucran radicales libres. En particular, los radicales libres hidroxilos pueden causar daño oxidativo cuando son generados en exceso o cuando las defensas antioxidantes están alteradas. Las células neuronales sometidas a sobrecarga de hierro poseen una alteración en el estado redox celular, que se manifiesta como cambios en la relación glutatión oxidado/reducido. Por lo tanto, se hace necesario estudiar las consecuencias fisiológicas de la acumulación de hierro y los mecanismos moleculares que son producidos por la sobrecarga de hierro. Por otro lado, el hierro a concentraciones fisiológicas puede participar generando un tono oxidativo adecuado para el funcionamiento neuronal.

**3.1.1. La entrada de hierro está asociada a la reacción de Fenton in vivo.** Los radicales libres endógenos que se producen en sistemas biológicos tienen tiempos de vida muy cortos y se generan en bajas concentraciones, lo que hace muy difícil su detección por métodos directos. Además, debido a su alta

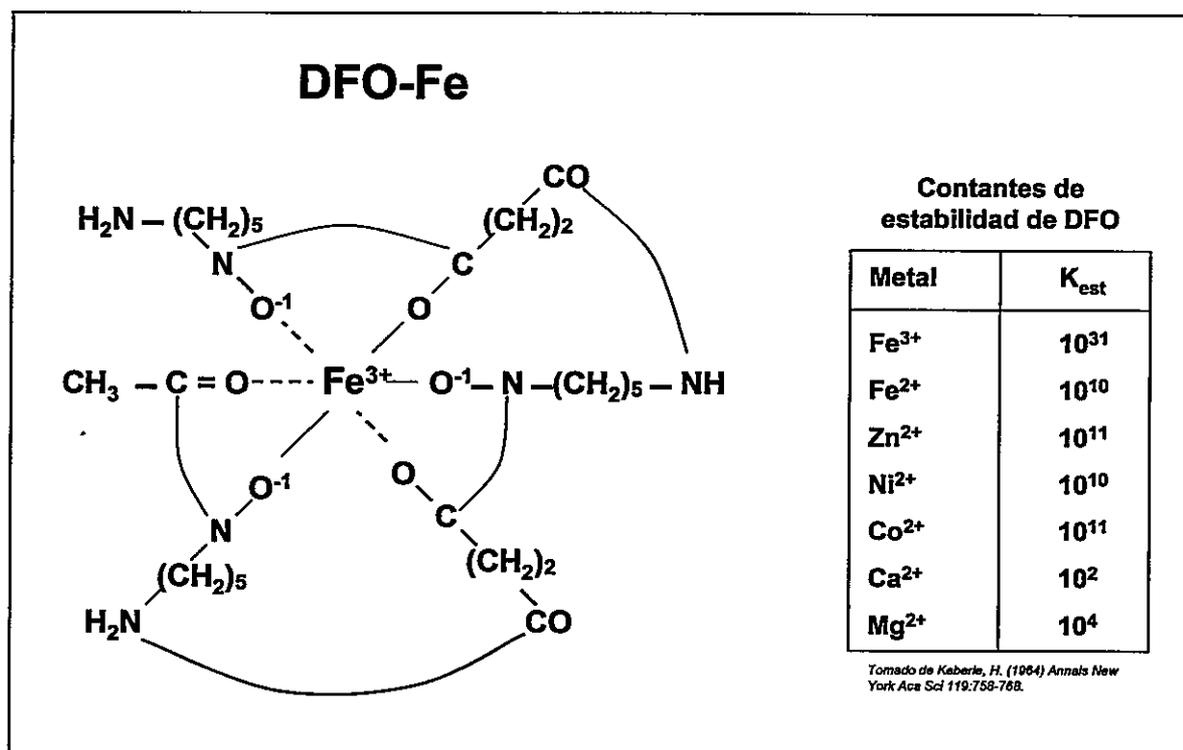
reactividad los radicales  $\text{OH}^{\cdot}$  han sido detectados después de la reacción con moléculas atraparoras (spin traps). Dado que el hierro reacciona con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la reacción de Fenton para generar el radical  $\text{OH}^{\cdot}$ , en la primera parte de este trabajo se demostró que la entrada de hierro está asociada a la reacción de Fenton *in vivo*, usando como modelo neuronal células no diferenciadas de "pheocromocitoma" (PC-12), o cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata. Para determinar si la incubación con hierro induce la producción de  $\text{OH}^{\cdot}$ , usamos un atrapador fluorogénico - TEMPO-9 - el cual contiene un grupo nitróxido que apaga la fluorescencia del compuesto hasta que un radical  $\text{OH}^{\cdot}$  reacciona con esta molécula y restaura la fluorescencia, lo que permite medir la producción de hidroxilo en un espectrofluorímetro (Figura 1A). Al adicionar Fe-NTA  $20 \mu\text{M}$ , durante una hora a células PC12 cargadas con TEMPO-9 con, se obtiene un aumento de fluorescencia que se asocia a un aumento en la concentración de  $\text{OH}^{\cdot}$  y que alcanza un máximo a los 30 minutos (Figura 1B). Cuando se preincubaron las células durante una hora con manitol  $100 \text{ mM}$ , un atrapador del radical  $\text{OH}^{\cdot}$ , no se detectó el aumento en la fluorescencia (Figura 1B), lo que indica que el manitol disminuyó la concentración efectiva de  $\text{OH}^{\cdot}$  bajo el límite de detección de la sonda.



**Figura 1. La producción del radical hidroxilo, inducida por hierro, es bloqueada por manitol.**

A) Estructura química de 4-((9-acridinecarbonyl)amino)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO-9-AC), molécula atrapadora con propiedades fluorogénicas. Esta molécula posee un grupo nitroxido (encerrado en círculo) que reacciona con el radical  $\text{OH}^{\cdot}$  produciendo un aumento en su fluorescencia. B) Células PC12 cargadas con TEMPO-9-AC se incubaron con Fe-NTA 20  $\mu\text{M}$ , lo que produce un aumento de la fluorescencia en la molécula, que se determina en un espectrofluorimetro. Preincubaciones con 100 mM de manitol previenen el aumento en la fluorescencia. Cada punto representa la fluorescencia media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos para cada grupo en los tiempos designados. \* indica significancia estadística entre cada grupo usando el test de Student,  $p < 0,05$ .

La DFO es un sideróforo sintetizado por actinomicetes y estreptomicetes que es altamente específico para hierro. El arreglo espacial de sus átomos de oxígeno se adapta finamente a la conformación octahédrica del hierro, y esto le permite quelar al hierro con una constante de estabilidad de  $10^{31}$  (Nielands, JB, in Proceedings of Symposium on Development of Iron Chelators for Clinical Use (Anderson, WF, Hillie, MC., editores), U.S. Department of Health Education and Welfare Publication 77-994, 1977, pag. 5-45) (Figura 2).



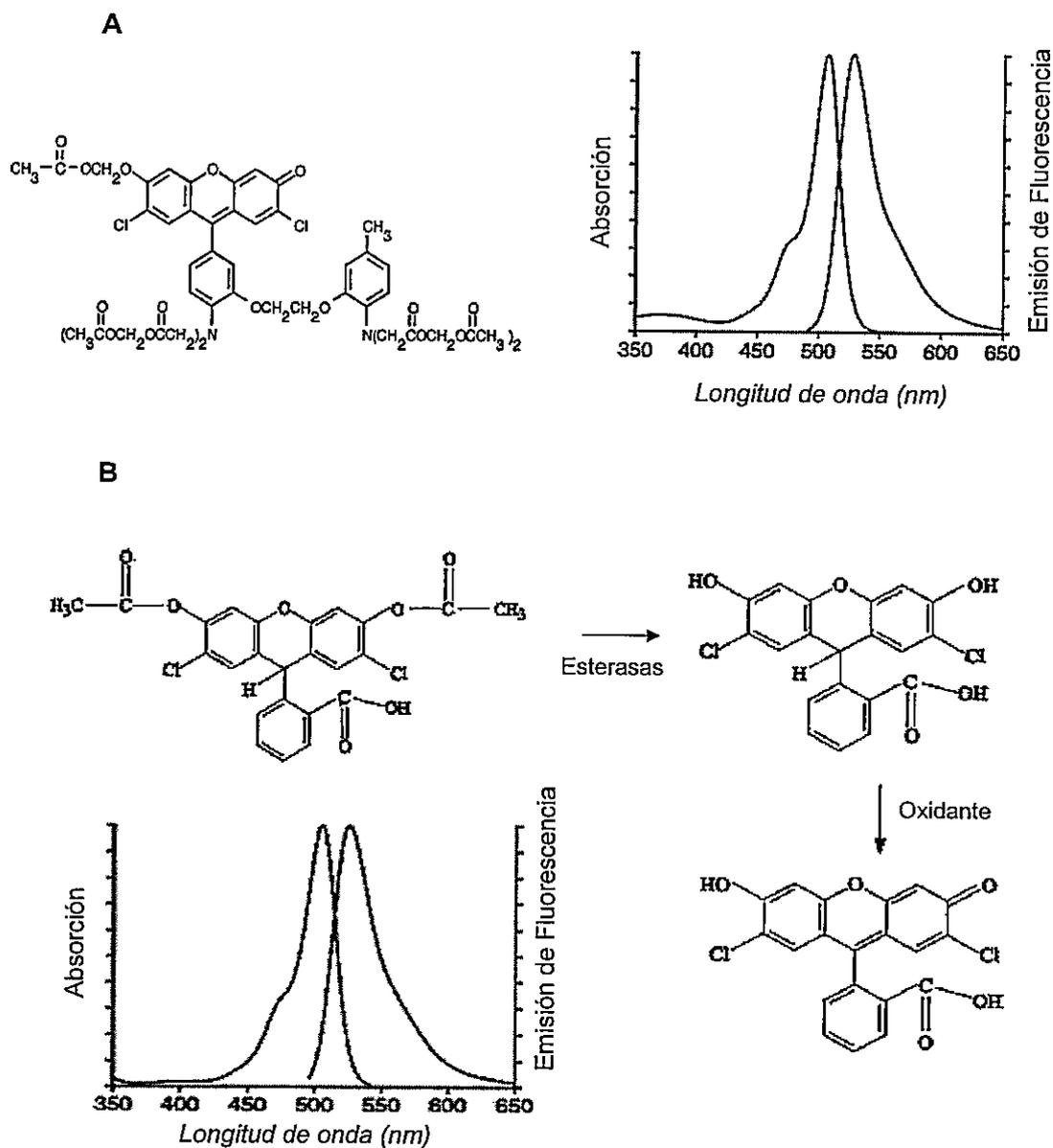
**Figura 2. Esquema de la interacción DFO-Fe<sup>3+</sup>.** El sideróforo DFO corresponde a un quelante hexadentado de muy alta especificidad por Fe<sup>3+</sup>.

Dado que en diferentes tipos celulares la incubación con hierro produce un aumento en el "pool" de hierro reactivo dentro de la célula (Núñez-Millacura et al. 2002), verificamos que estos cambios en el estado redox eran efectivamente consecuencia de la entrada de hierro. Para ello, medimos en células PC12 la cinética de entrada de hierro marcado radiactivamente. Estos estudios mostraron que las células PC12 fácilmente incorporan el hierro desde una fuente externa con una cinética lineal dentro de la hora de incorporación (dato no mostrado); este resultado es consistente con los experimentos que muestran un aumento en la concentración de radicales libres generados por hierro (ver Fig. 1B), e indican que

probablemente el hierro que entra a la célula, al menos en parte, induce la producción de  $\text{OH}^\cdot$  (Núñez-Millacura et al. 2002).

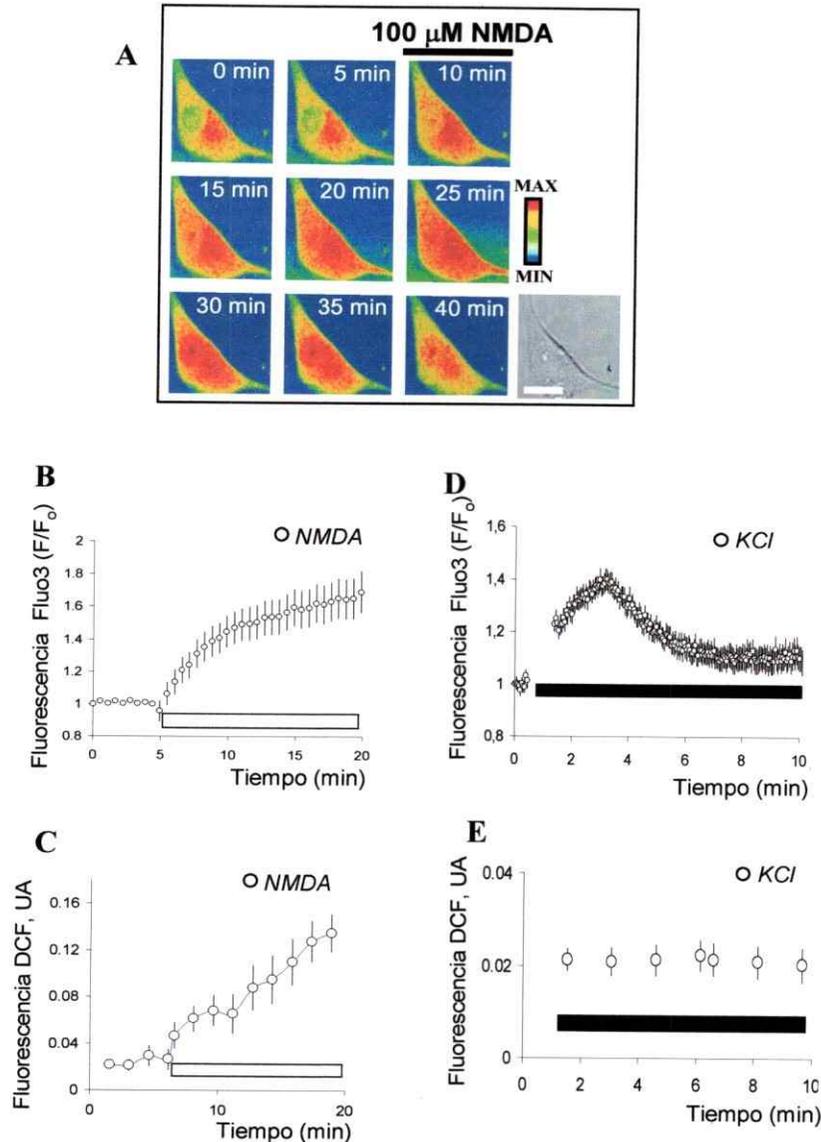
Este conjunto de resultados sugiere que el hierro induce la producción de  $\text{OH}^\cdot$  a través de la reacción de Fenton en células de tipo neuronal. Apoyan, además, la idea de que en nuestros sistemas celulares el hierro es esencial como catalizador en la formación del radical libre hidroxilo, ya que el quelante DFO inhibe la producción de éste (Núñez-Millacura et al. 2002).

**3.1.2. La activación de NMDAR induce entrada de calcio y se asocia a la producción de ROS.** Dada la importancia de las ROS generadas durante actividad neuronal, y en particular luego de la activación de NMDAR, exploramos la posible generación de ROS como función de la activación de NMDAR con NMDA. Para seguir los cambios en la concentración de calcio libre se utilizó la sonda fluorescente sensible a calcio Fluo3-AM (Figura 3A). Para evaluar si la activación de NMDAR se asocia a la producción de ROS, se usó la sonda fluorescente 2,7-diclorodihidrofluoresceína ( $\text{H}_2\text{DCF}$ ) (Figura 3B).



El tratamiento de las células PC12 con 100  $\mu$ M NMDA produjo un aumento transitorio en la concentración de calcio (Figuras 4A y 4B), detectado usando microscopía confocal. Junto con esto, el tratamiento con NMDA produjo un significativo aumento de la concentración de ROS sobre el nivel basal (Figura 4C).

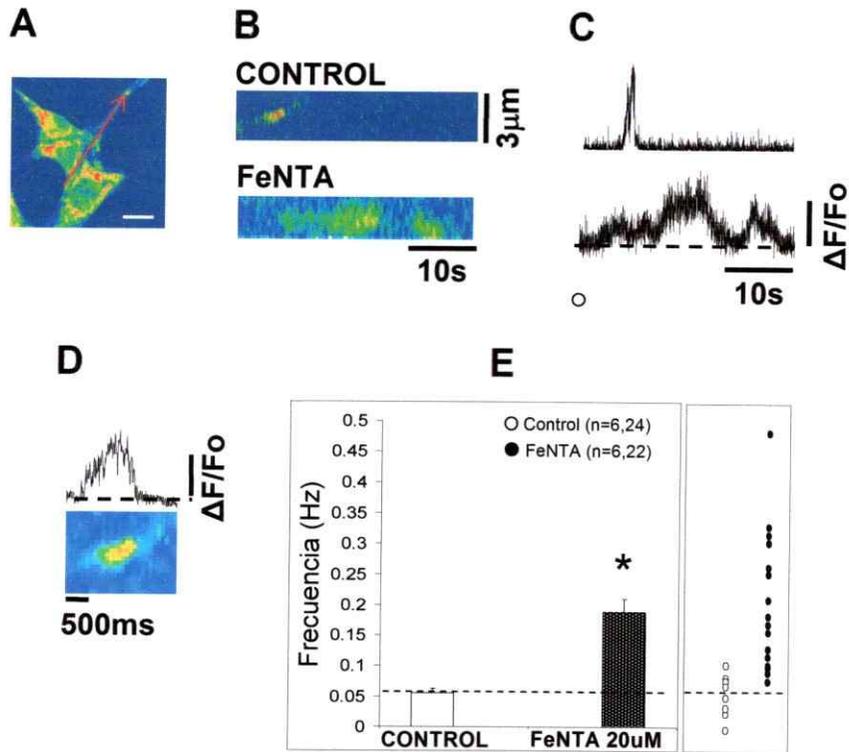
Estos resultados son consistentes con trabajos previos en otros tipos celulares, que muestran que la activación de NMDAR esta asociada a la producción de ROS (Bindokas et al. 1996). Para investigar si la generación de ROS es específica para la activación de NMDAR, las células PC12 fueron despolarizadas mediante una aplicación externa de 75 mM KCl, condición en la cual los canales de calcio dependiente de voltaje en la membrana plasmática se abren, generando un influjo de calcio (Figura 4D). Como se observa en la Figura 4D, este tratamiento aumenta la concentración de calcio, sin embargo, pese al aumento de calcio inducido por despolarización, los niveles de ROS no cambian (Figura 4E), sugiriendo que en células PC12, la generación de ROS está acoplada a la activación de NMDAR.



**Figura 4. La producción de ROS está acoplada a la activación de NMDAR.** A) Imágenes de células PC12 tomadas secuencialmente a los tiempos designados, usando microscopía confocal. Los valores representan intensidades de fluorescencia en el cuadro indicado. Las intensidades de colores van desde azul (mínima intensidad de fluorescencia) a rojo (máxima intensidad de fluorescencia) y fueron asignadas usando el programa Zeiss LSM Image Browser. Recuadro: imagen en contraste de fases. Calibración: 10  $\mu$ m. B) Respuesta de la concentración de  $Ca^{2+}$  en células PC12 cargadas con Fluo3-AM y expuestas a 100  $\mu$ M NMDA. (n=83). C) Respuesta de la concentración de ROS en células PC12 cargadas con  $H_2DCF$ -AM y expuestas a 100  $\mu$ M NMDA. (n=70). Barra blanca en B y C corresponde a la aplicación de NMDA D) Respuesta de la concentración de  $Ca^{2+}$  en células PC12 cargadas con Fluo3-AM y despolarizadas con 60 mM KCl (n=41). E) Respuesta de la concentración de ROS en células PC12 cargadas con  $H_2DCF$ -AM y despolarizadas con 60 mM KCl (n=53). Barra negra en D y E corresponde a la aplicación de KCl. Los datos están expresados como  $F/F_0$  para fluorescencia de Fluo-3 y como Unidades arbitrarias para DCF (Promedio  $\pm$  SEM).

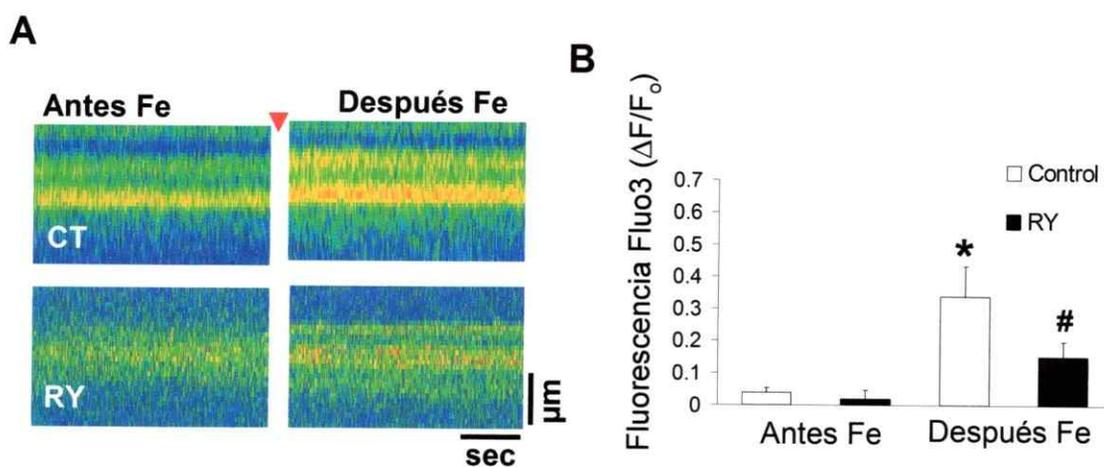
### **3.1.3. Las ROS generadas por hierro inducen la salida de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY.**

Debido a que el RYR posee una fuerte dependencia del estado redox celular, investigamos si un aumento en la concentración de ROS pudiese activar RYR y generar cambios en la concentración de calcio libre. Para evaluar esta posibilidad, las células PC12 fueron cargadas con Fluo3-AM y se midieron los cambios en la concentración de calcio con una alta resolución espacial y temporal usando microscopía confocal en una modalidad de muestreo en línea. La posición de la línea cruza la célula tratando de evitar el núcleo (Figura 5A), pasando siempre por la zona perinuclear que corresponde al RE donde se encuentran los RYR. Usando una escala de pseudo-colores, donde azul representa baja intensidad de fluorescencia y rojo un máximo de fluorescencia, se pudo observar que en una situación control, en ausencia de cualquier estímulo oxidativo, ocurren eventos espontáneos de liberación de calcio (señales de calcio) altamente localizados con una frecuencia de  $0,056 \pm 0,007$  Hz (Figuras 5B y 5C). Cuando las células fueron expuestas a  $20 \mu\text{M}$  Fe-NTA en una solución libre de calcio, aumentó la frecuencia de las señales de calcio a  $0,188 \pm 0,021$  Hz (Figuras 5B y 5C). La amplitud y curso temporal de las señales de calcio evocadas por incubaciones con hierro fueron indistinguibles de los eventos espontáneos (Figura 5D) y provienen desde compartimentos intracelulares ya que los experimentos fueron desarrollados en ausencia de calcio externo.



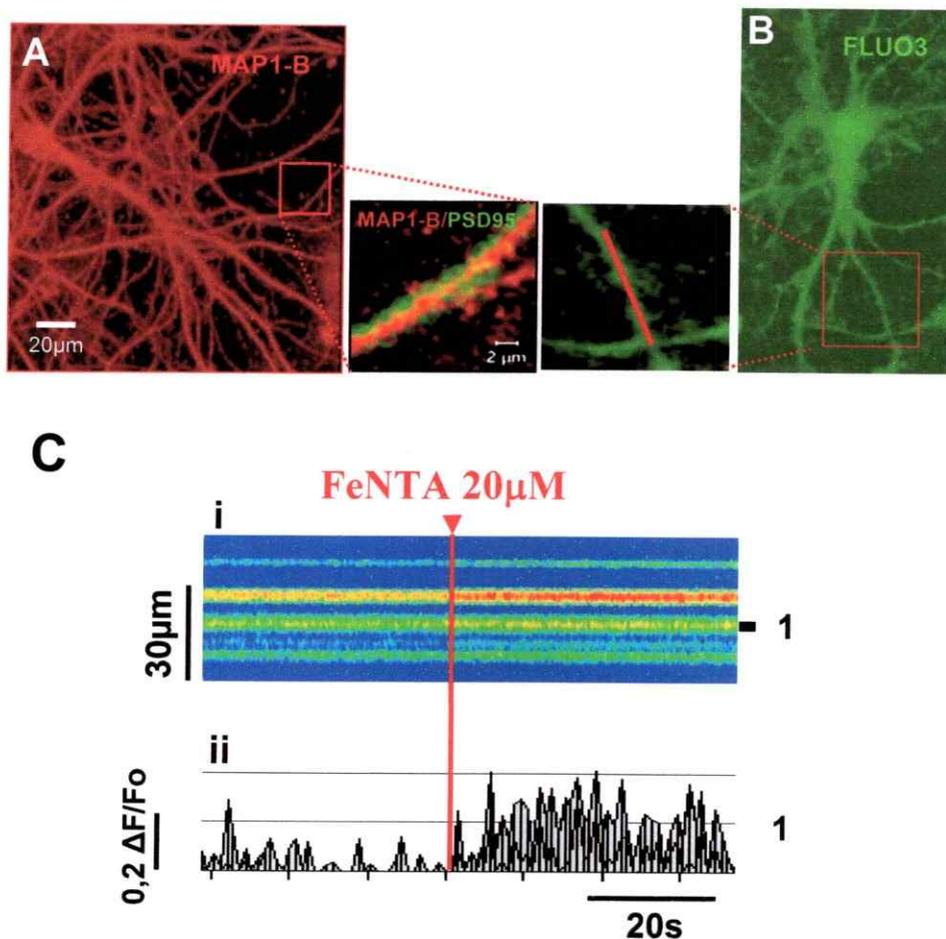
**Figura 5. El hierro aumenta la frecuencia de los eventos de calcio.** A) Posición de la línea de muestreo. La orientación de la línea se trazó a lo largo de la zona perinuclear, evitando el núcleo. El registro de la línea se realizó cada 2 ms permitiendo una alta resolución temporal. B) Visualización confocal de eventos espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de agregar hierro al medio de cultivo (Panel Superior). Después de la aplicación de 20  $\mu\text{M}$  Fe-NTA, aumentó la frecuencia de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Panel Inferior). C) Curso temporal de los aumentos transitorios tomados de los experimentos en B. D) Típico evento de  $\text{Ca}^{2+}$  ya sea espontáneo o provocado por hierro. E) Análisis estadístico de la frecuencia de eventos de calcio espontáneos (barra vacía) y provocados por Fe-NTA 20  $\mu\text{M}$  (barra negra). Los datos representan promedio  $\pm$  SEM, de 6 experimentos, con al menos tres ROIs por experimentos.  $p < 0,05$  calculado usando el test de Student pareado nos indica diferencias significativas entre los grupos (asterisco). Se muestran los valores de experimentos individuales a la derecha del gráfico.

Al incubar con una mayor concentración de hierro (Fe-NTA 100 $\mu$ M) se logro generar un gran número de eventos discretos que rápidamente se fusionaron dando origen a un aumento global de la concentración de calcio (Figura 6). Este aumento de calcio fue inhibido significativamente por 20  $\mu$ M de RY, sin embargo, no fue bloqueado completamente, sugiriendo que el calcio detectado proviene de principalmente desde compartimentos intracelulares sensibles a RY.



**Figura 6. El hierro induce la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY en células PC12.** A) Imagen obtenida por escaneo en línea de los aumentos de Ca<sup>2+</sup> inducidos por hierro (panel superior); A tiempo cero, FeNTA 100  $\mu$ M fue agregado a la solución externa (indicado por una cabeza de flecha roja). Las células PC12 fueron preincubadas con RY 20  $\mu$ M por 60 min antes de la aplicación de hierro (panel inferior). Las imágenes representan intensidades de fluorescencia en la línea de muestreo. Las intensidades de colores van desde azul (mínima intensidad de fluorescencia) a rojo (máxima intensidad de fluorescencia) y fueron asignadas usando el programa Zeiss LSM Image Browser. Calibración: 10 s, 5  $\mu$ m. B) Promedio de la amplitud máxima de fluorescencia de Ca<sup>2+</sup> representada como  $\Delta F/F_0$ , donde  $F_0$  corresponde a la fluorescencia basal obtenida por el promedio de 2000 a 4000 líneas. Los datos representan promedio  $\pm$  SEM, n = 3 con al menos tres ROIs por experimento para células controles (círculos blancos) o preincubadas con RY (cuadrado blancos). \* y # indican diferencias significativas con respecto al control antes y después de agregar hierro, usando el test de ANOVA seguido por analisis de comparaciones multiples Newman-Keuls.

Dada la relevancia de los procesos de calcio en PS, evaluamos si un efecto similar podía ser observado en neuronas de hipocampo en cultivo, realizando experimentos conducentes a investigar una posible participación de ROS generadas por hierro en las señales de calcio a nivel sináptico (Figura 7). Los cultivos de neuronas se mantuvieron entre 10 a 14 días en cultivo, de tal forma que fue posible detectar sinapsis funcionales (Figura 7A) a estos días de cultivo, mediante inmunofluorescencia contra la proteína PSD-95 usada como marcador sináptico. De esta manera, los experimentos de muestreo en línea se realizaron en neuronas hipocampales en cultivo cargadas con Fluo-3, trazando la línea a través de las ramas sinápticas (recuadro, Figura 7B). En ausencia de hierro, se puede observar eventos espontáneos de calcio en la región sináptica. Al igual que lo observado en células PC12, las neuronas hipocampales expuestas a 20  $\mu$ M de FeNTA aumentaron la frecuencia y la amplitud de los eventos de calcio (Figura 7C).



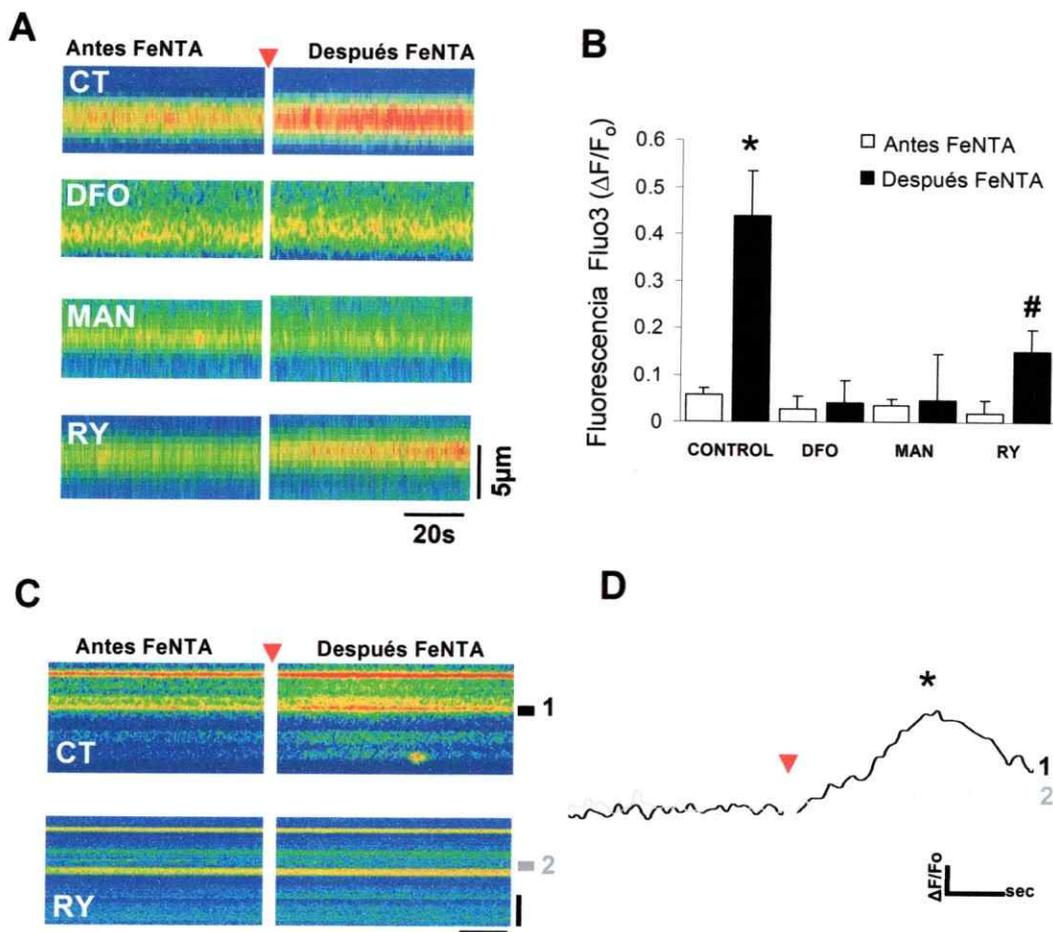
**Figura 7. El hierro induce la liberación de calcio en neuronas hipocámpales en cultivo.** A) Immunofluorescencia de una neurona piramidal de hipocampo de rata usando un anticuerpo que reconoce la proteína MAP-1B (rojo) usada como marcador neuronal. Recuadro: Aumento de la región indicada, mostrando una doble tinción con otro anticuerpo que reconoce la proteína sináptica PSD-95 (verde). B) Neurona piramidal de hipocampo de rata crecida en cubreobjeto de vidrio, cargada con Fluo3. Recuadro: Aumento de la región indicada que muestra la ubicación de la línea de muestreo, trazada a través de las ramas neuríticas. Ci) Imagen obtenida por muestreo en línea de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por hierro, en ausencia de calcio externo. La aplicación de  $20 \mu\text{M}$  de Fe-NTA se indica por una cabeza de flecha roja. Cii) Señales de  $\text{Ca}^{2+}$  tomadas desde la región indicada por el trazo negro, en una representación que permite observar los eventos localizados. Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  tomadas de la región indicada son representadas como  $\Delta F/F_0$ , donde  $F_0$  corresponde a la fluorescencia basal obtenida por el promedio de 2000 a 4000 líneas colectadas antes de la aplicación del hierro.

Aumentando la concentración de hierro ( $100 \mu\text{M}$  de FeNTA) fue posible evocar un robusto aumento de calcio (Figura 8A). Cuando se preincubaron las

neuronas con 500  $\mu\text{M}$  de DFO o con 100 mM de manitol durante una hora antes del tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de FeNTA, se logró prevenir estos aumentos de calcio, sugiriendo que el efecto observado en estas condiciones es mediado por hierro y por radicales  $\text{OH}\cdot$  (Figura 8A).

Al preincubar las neuronas por 60 min con 50  $\mu\text{M}$  de RY, que inhibe la salida de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY, el aumento de calcio es significativamente pero no completamente inhibido (Figuras 8A y 8B). La inhibición parcial observada sugiere que otra fuente de calcio dentro de la célula, insensible a RY, podría también contribuir a los aumentos de calcio inducidos por hierro.

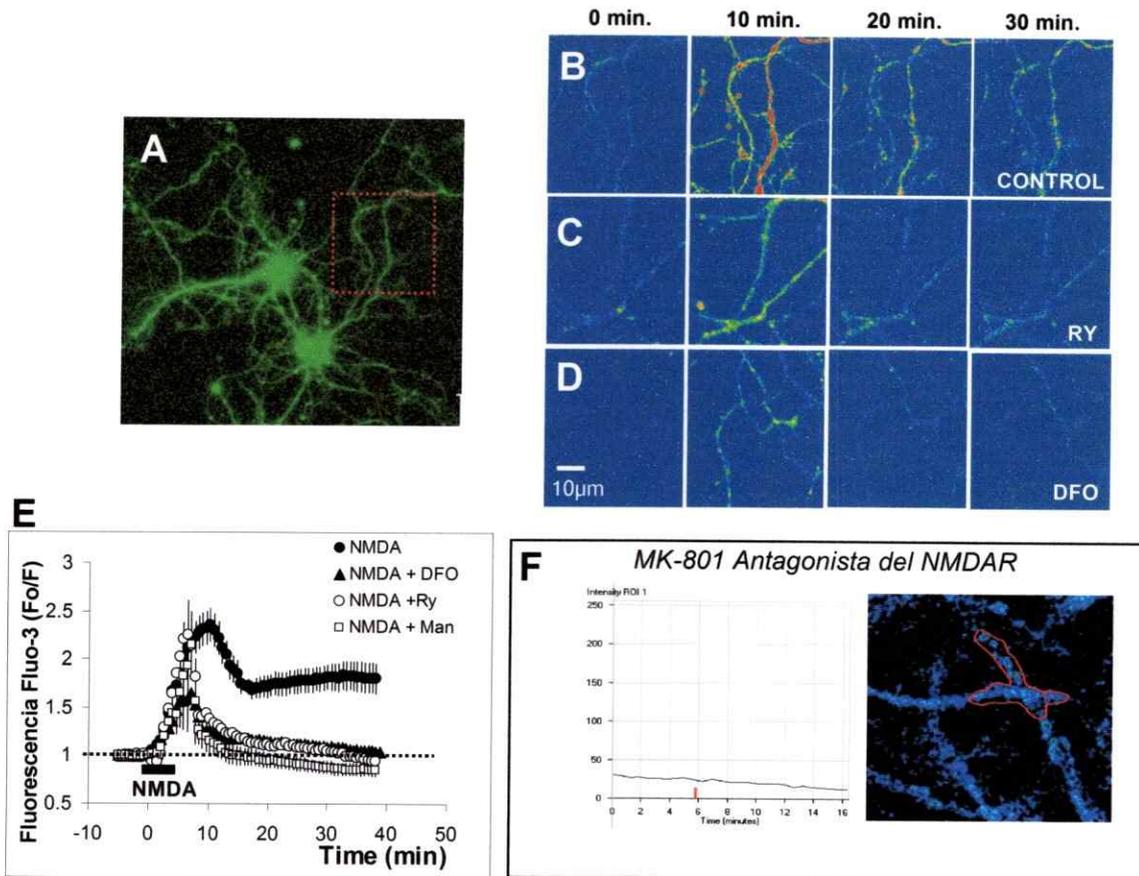
Los datos anteriores indican que el hierro, a través de un efecto oxidativo, genera señales de calcio dentro de la célula y sugieren, en particular, que el hierro puede jugar un rol importante a nivel sináptico modulando las señales producidas durante actividad neuronal. Para confirmar que los efectos observados con hierro sean de carácter oxidativo, favorecimos la generación de radicales libres aumentando la concentración de peróxido de hidrógeno, que es el otro participante en la reacción de Fenton. Como era de esperar,  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$  produjo un aumento en la concentración de calcio libre (Figuras 8C y 8D). Al incubar rebanadas de hipocampo con RY 50  $\mu\text{M}$  se inhibió el aumento de calcio, sugiriendo que este aumento es debido, principalmente, a la salida de calcio desde compartimentos sensibles a RY (Figuras 8C y 8D).



**Figura 8. Las ROS generadas por hierro inducen la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY en neuronas hipocámpicas.** A) Imagen obtenida por muestreo en línea de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por hierro. La aplicación de FeNTA 100  $\mu\text{M}$  se indica por la cabeza de flecha roja. Como se indica en la figura, en algunos casos las neuronas fueron preincubadas con 500  $\mu\text{M}$  de DFO, 100 mM de MAN o 50  $\mu\text{M}$  de RY por 60 min. antes de la aplicación de 100  $\mu\text{M}$  Fe-NTA. B) Promedio de la amplitud máxima de fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  representada como  $\Delta F/F_0$ , donde  $F_0$  corresponde a la fluorescencia basal obtenida por el promedio de 2000 a 4000 líneas. Los datos representan promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$  con al menos tres ROIs por experimentos para cada grupo. \* y # indican diferencias significativas con respecto al control antes de agregar hierro, usando el test de ANOVA seguido por un análisis de comparaciones múltiples Newman-Keuls. C) Imagen obtenida por muestreo en línea de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (panel superior); A tiempo cero, se agregó 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a la solución externa (indicado por una cabeza de flecha roja). Las neuronas fueron preincubadas con 50  $\mu\text{M}$  de RY por 60 min antes de la aplicación de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (panel inferior). Las imágenes en A y C representan intensidades de fluorescencia en la línea de muestreo. Las intensidades de colores van desde azul (mínima intensidad de fluorescencia) a rojo (máxima intensidad de fluorescencia) y fueron asignadas usando el programa Zeiss LSM Image Browser. Calibración: 10 s, 5  $\mu\text{m}$ . D) Promedio del curso temporal de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  tomados desde las regiones indicadas por trazos negros. Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  son presentadas como  $\Delta F/F_0$ , donde  $F_0$  corresponde a la fluorescencia basal obtenida por el promedio de 2000 a 4000 líneas. A tiempo cero, se agregó  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$  a la solución externa. Los datos representan promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$  con al menos tres ROIs por experimentos para células controles o preincubadas con RY. \* indica diferencias significativas entre ambos grupos,  $p < 0,05$  usando test de Student.

**3.1.4. La señal de calcio evocada por activación de NMDAR, es modulada por ROS generadas por hierro.**

Usando neuronas hipocampales cargadas con Fluo3-AM se siguieron los cambios en las señales de calcio generadas por activación de NMDAR a nivel de la sinápsis (Figura 9A). Las neuronas hipocampales fueron expuestas a 50  $\mu$ M de NMDA durante cinco minutos, lo que produjo un rápido incremento en la concentración de calcio ( $NMDA_{10min} = 2,17 \pm 0,15$ , expresada como  $F/F_0$  para fluorescencia de Fluo-3 a los diez minutos de la estimulación con NMDA, representando promedio  $\pm$  SEM,  $n \geq 3$  para cada grupo con al menos tres ROIs por experimento). Sin embargo, luego de remover el NMDA de la solución externa, la concentración de calcio se mantuvo más elevada que la basal ( $NMDA_{30min} = 1,82 \pm 0,14$  expresada como  $F/F_0$  para fluorescencia de Fluo-3 a los treinta minutos de la estimulación con NMDA, representando promedio  $\pm$  SEM,  $n \geq 3$  para cada grupo con al menos tres ROIs por experimento) (Figuras 9B y 9E), lo que indica que la entrada de calcio a través de NMDAR provocó un aumento sostenido de calcio. Este efecto fue bloqueado por MK-801, un antagonista del NMDAR, indicando que el aumento de calcio observado es debido a estimulación específica de estos receptores. Dado que los RYR pueden mediar la salida de calcio desde el RE en un proceso conocido como liberación de calcio inducida por calcio, evaluamos la posibilidad que este fenómeno estuviera involucrado en el aumento de calcio observado luego de la entrada de calcio mediada por NMDAR.



**Figura 9.** Los aumentos de  $Ca^{2+}$  inducidos por activación de NMDAR son modulados oxidativamente por hierro e involucran la salida de  $Ca^{2+}$  desde compartimentos sensibles a RY. A) Neuronas piramidales de hipocampo de rata cultivadas en un cubreobjetos de vidrio, cargadas con Fluo-3. Recuadro: Región típica seleccionada de entre las ramas sinápticas para los experimentos. B) Aumento de la concentración de calcio en regiones sinápticas de neuronas hipocámpicas expuestas a 50  $\mu$ M de NMDA durante cinco minutos. ( $n = 3$ ). Neuronas hipocámpicas pretratadas con 50  $\mu$ M de RY (C) o 500  $\mu$ M de DFO (D) expuestas a NMDA, se previno la salida de calcio desde compartimentos intracelulares. Las imágenes fueron tomadas secuencialmente en los tiempos designados, usando microscopía confocal. Los colores representan intensidades de fluorescencia, en el cuadro dado. Las intensidades de colores van desde azul (mínima intensidad de fluorescencia) a rojo (máxima intensidad de fluorescencia) y fueron asignadas usando el programa Zeiss LSM Image Browser. Calibración: 10  $\mu$ m. E) Promedio del curso temporal de la respuesta de calcio expresada como F/Fo para fluorescencia de Fluo-3. Los datos representan promedio  $\pm$  SEM,  $n \geq 3$  para cada grupo con al menos tres ROIs por experimento. F) Neuronas tratadas con 50  $\mu$ M de MK-801 (un antagonista de NMDAR) una hora previo y durante la aplicación de NMDA, previenen el aumento de calcio inducido por NMDA.

Para ello, se preincubaron neuronas con una concentración bloqueadora de RYR (50  $\mu$ M de RY) al menos una hora antes de la exposición a 50  $\mu$ M de NMDA. En neuronas pre-tratadas con RY fue posible detectar el influjo de calcio desde el medio extracelular (NMDA<sub>10min</sub> + RY =  $2,26 \pm 0,28$  F/F<sub>o</sub>); sin embargo, la liberación desde el RE fue completamente bloqueada, llegando al nivel basal rápidamente luego de lavar el NMDA del medio de perfusión (NMDA<sub>30min</sub> + RY =  $1,09 \pm 0,22$  F/F<sub>o</sub>) (Figura 9C y 9E), indicando que el aumento de la concentración de calcio inducido por entrada de calcio posee un componente importante sensible a RY.

Considerando que durante la activación de NMDAR se generan ROS como segundos mensajeros, y dada la alta sensibilidad de RYR a una serie de compuestos oxidantes, estudiamos si las ROS generadas por hierro pueden participar en la señal de calcio inducida por NMDA. Para ello preincubamos neuronas durante una hora con compuestos que pueden prevenir o neutralizar la reacción de Fenton: DFO 500  $\mu$ M o manitol 100 mM (Figura 9).

En neuronas cargadas con DFO y manitol, al estimular con 50  $\mu$ M de NMDA se pudo detectar la entrada de calcio (NMDA<sub>10min</sub> + DFO =  $1,65 \pm 0,32$  F/F<sub>o</sub>; NMDA<sub>10min</sub> + manitol =  $2,15 \pm 0,34$  F/F<sub>o</sub>) sin encontrar diferencias significativas entre cada grupo; sin embargo, la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares se encontró totalmente bloqueada (NMDA<sub>30min</sub> + DFO =  $1,09 \pm 0,22$  F/F<sub>o</sub>; NMDA<sub>30min</sub> + manitol =  $0,88 \pm 0,08$  F/F<sub>o</sub>, test de ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 9D y 9E), sugiriendo que las ROS generadas por hierro pueden modular la salida

de calcio posiblemente afectando la actividad de RYR sin afectar la entrada de calcio a través de NMDAR.

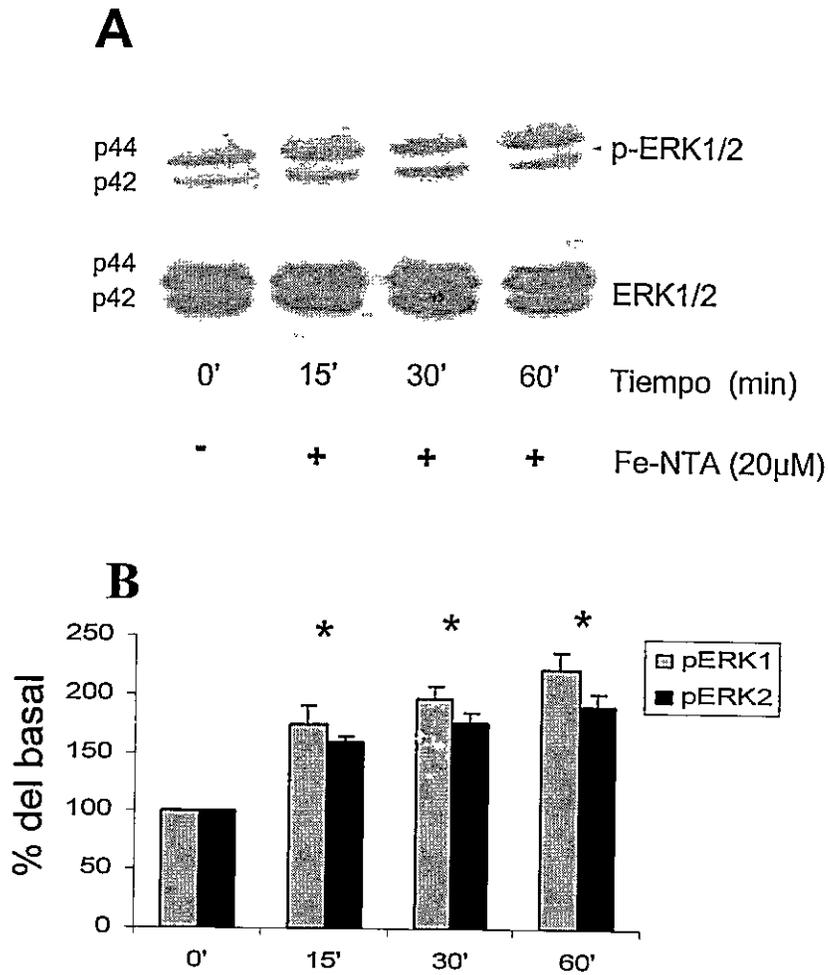
Usando la sonda sensible al radical hidroxilo, TEMPO 9, evaluamos si activación de NMDAR está asociada a producción de esta ROS, sin embargo, no logramos detectar cambios significativos en la fluorescencia basal, probablemente debido a que la concentración de las ROS generadas por hierro durante estimulación de NMDAR es más baja que el límite de detección de la técnica.

### ***3.2. Consecuencias celulares de la interacción entre ROS y señales de calcio.***

En la sección anterior hemos delineado un posible mecanismo mediante el cual las ROS generadas por hierro podrían modificar la señal de calcio en condiciones de reposo y durante la actividad neuronal. Pese a que existen estudios que indican que la participación de los radicales  $\text{OH}^{\bullet}$  como mensajeros intracelulares es compleja, debido a su alta reactividad y por lo tanto baja distancia de difusión (Svishchev and Plugatyr 2005), otros trabajos indican que no sólo el peróxido de hidrógeno ejerce una acción como mensajero intracelular redox sino que también el radical  $\text{OH}^{\bullet}$  podría jugar un papel importante en iniciar cascadas de señalización redox (Biondi et al. 2006; Posen et al. 2005; Simon et al. 2004; Crossthwaite et al. 2002; Griendling et al. 2000; Guyton et al. 1996).

### **3.2.1. Las ROS generadas por hierro inducen fosforilación de ERK.**

Considerando que la vía MAPK/ERK es crucial para fenómenos de PS, evaluamos la posible modulación por el hierro de la vía ERK1/2. Para esto, se expusieron las células PC12 a una concentración de hierro más alta que la normal del cultivo (aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ ). Usando un anticuerpo monoclonal que reconoce la forma activa, fosforilada, de ERK1/2, encontramos que una concentración de Fe-NTA de 20  $\mu\text{M}$  produce un progresivo aumento en la fosforilación y activación de ERK1/2 dependiente del tiempo, llegando a un máximo a los sesenta minutos (Figura 10).

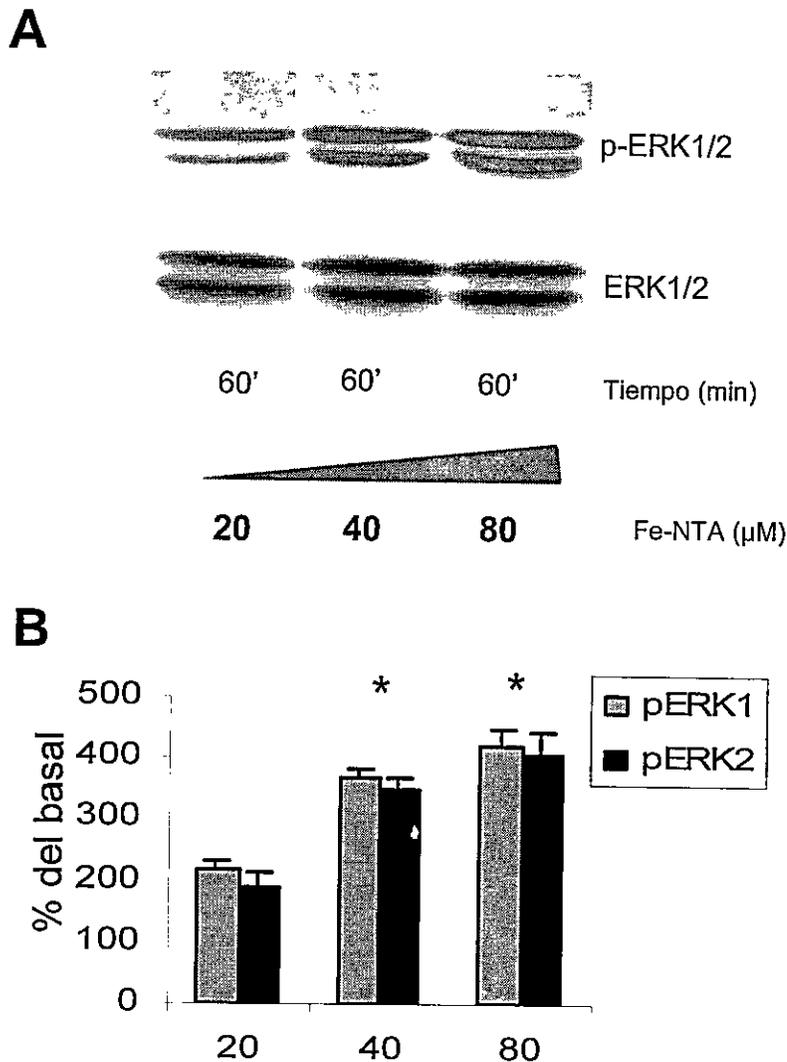


**Figura 10. El hierro induce fosforilación de ERK1/2, dependiente del tiempo.** A) Western blot representativo mostrando cambios en la inmunoreactividad para pERK usando un anticuerpo que detecta la forma fosforilada de ERK (pERK) en células PC12 expuestas a 20 μM de Fe-NTA durante una hora (panel superior). Las membranas fueron re-analizadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de ERK, independiente de su estado de fosforilación (panel inferior). P44 y P42 indican la migración de las ERK1/2 de 44 y 42 KDa, respectivamente. B) Cuantificación de la inmunoreactividad de pERK normalizada con respecto a los niveles de ERK total, a los distintos tiempos señalados. Se expresan los datos como porcentaje del basal (promedio ± SEM), n = 3. \*Indica diferencias significativas con respecto al control (p < 0.05) determinada usando el test de ANOVA seguido por un análisis de comparaciones múltiples Newman-Keuls.

Como control, para determinar que el tratamiento con hierro no alteró los niveles basales de la quinasa, se probó nuevamente la membrana de nitrocelulosa con un anticuerpo policlonal que detecta la forma total de ERK1/2, independiente

de su fosforilación, observándose igual cantidad de la proteína en todas las muestras. De lo anterior se desprende que el tratamiento con hierro no cambia los niveles basales de la quinasa; por lo tanto, las diferencias observadas se pueden atribuir a cambios en la fosforilación.

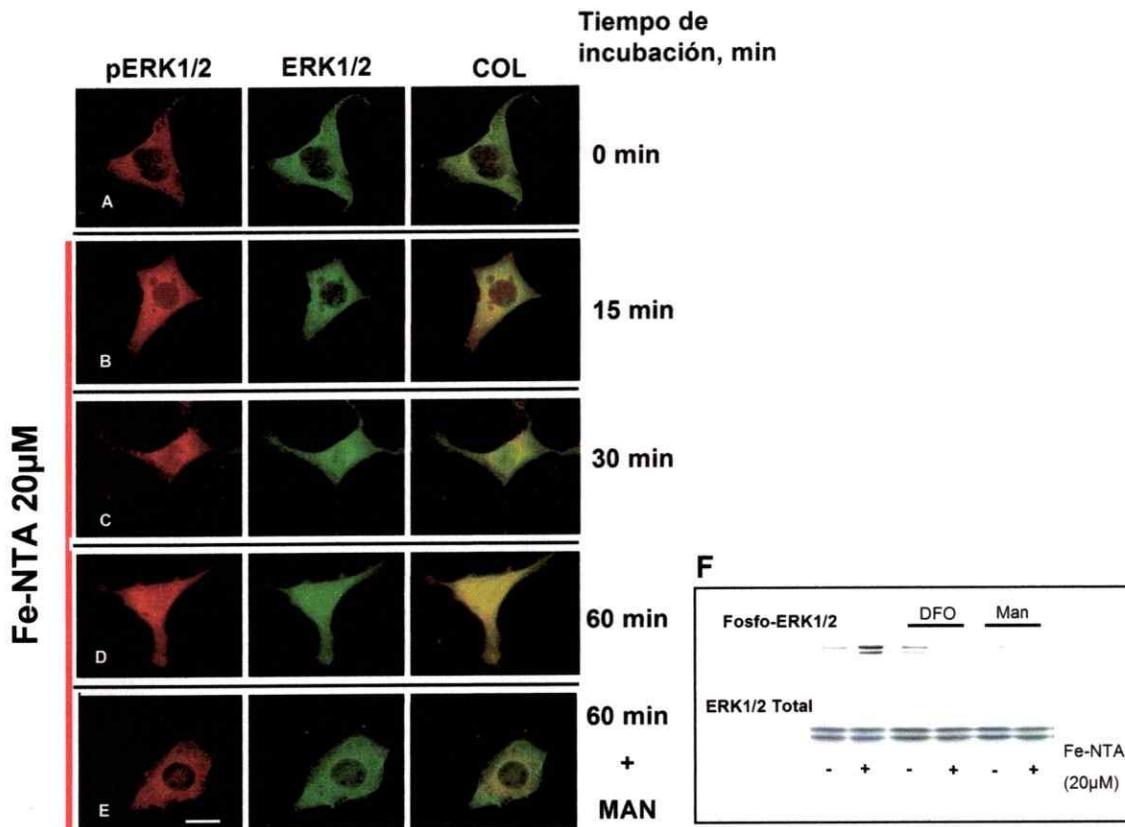
Además, cuando se incrementó la concentración de Fe-NTA en el medio de cultivo, aumentó la activación de ERK1/2, la que expresada como porcentaje del basal aumentó en  $215,2 \pm 14,5$ ;  $370,2 \pm 10,8$  y  $420,5 \pm 25,5$  para células PC12 tratadas con 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  de Fe-NTA, respectivamente (Figura 11). De esta forma, los datos están sugiriendo que el hierro induce una activación de ERK1/2 dependiente tanto del tiempo como de la concentración.



**Figura 11. El hierro induce fosforilación de ERK1/2 dependiente de la concentración.** A) Western blot representativo mostrando cambios en la inmunoreactividad para pERK usando un anticuerpo que detecta la forma fosforilada de ERK en células PC12 expuestas a 20, 40 u 80  $\mu\text{M}$  de Fe-NTA durante una hora (panel superior). Las membranas fueron re-ensayadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de ERK, independiente de su estado de fosforilación (panel inferior). P44 y P42 indican la migración de 44 y 42 KDa. Notar que en la imagen del Western blot la banda correspondiente a 20  $\mu\text{M}$  fue reubicada usando Adobe Photoshop (Adobe, Mountain View, CA, USA), lo que se hizo sólo para propósitos de la presentación de la figura. B) Cuantificación de la inmunoreactividad de pERK normalizada con respecto a los niveles de ERK total. Se expresan los datos como porcentaje del basal (promedio  $\pm$  SEM). \*Indica diferencias significativas con respecto al grupo tratado con 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) determinadas usando el test de ANOVA seguido por análisis de comparaciones múltiples Newman-Keuls.

ERK 1/2 en su forma inactiva es mantenida en la membrana celular por un complejo de proteínas de anclaje. Cuando se activa ERK por fosforilación, se transloca al núcleo donde activa la transcripción génica de genes dependientes del factor de transcripción CREB (Canon et al., 2004; Riccio et al., 2006; Suzuki et al., 2004; Willaime-Morawek et al., 2005). Se ha sugerido que esta migración de ERK desde el citoplasma al núcleo es importante en el proceso de activación de ERK1/2 que lleva a eventos de PS (Patterson et al., 2001).

Mediante inmunofluorescencia, estudiamos si la activación de ERK1/2 por hierro está asociada a una translocación nuclear. Usando anticuerpos que detectan la forma activa (en rojo) y la forma total (en verde) se siguió en el tiempo la localización subcelular de ERK1/2 en células PC12 tratadas con 20  $\mu$ M de Fe-NTA (Figura 12). Como era de esperar, en células control sin tratamiento con hierro se observa una activación basal baja y ERK está excluida del núcleo (Figura 12 A). A los quince minutos de agregar hierro, se puede ver una mayor activación de ERK1/2 en la zona perinuclear (Figura 11 B). A los treinta minutos es posible ver ERK1/2 activa en el núcleo (Figura 11 C), que se incrementa más a los sesenta minutos (Figura 12D). Al preincubar las células PC12 por una hora con 100 mM de manitol (Figuras 12E y 12F), 500  $\mu$ M de DFO (Figura 12F), previo al tratamiento con hierro, se encontró que 20  $\mu$ M Fe-NTA no aumentó ni la fosforilación ni la translocación de ERK.



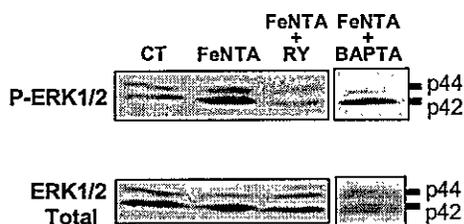
**Figura 12. El hierro induce activación y translocación nuclear de ERK, mediante un proceso que involucra radicales libres hidroxilo.** (A-E) Immunofluorescencia de células PC12 tratadas con un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de ERK (rojo) seguido por otro anticuerpo que reconoce ERK total independiente de su estado de fosforilación (verde). Células PC12 antes (A) y después de 15 minutos (B), 30 minutos (C), o 60 minutos (D) luego de la aplicación de 20 μM de Fe-NTA. Células pre-tratadas con manitol una hora antes de la aplicación de 20 μM de Fe-NTA (E). Barra de calibración: 10 μm. F) Western blot representativo mostrando cambios en la inmunoreactividad para pERK usando un anticuerpo que detecta la forma fosforilada de ERK en células PC12 expuestas a 20 μM de Fe-NTA durante una hora en ausencia o en presencia de un pretratamiento con DFO o MAN (panel superior). Las membranas fueron re-ensayadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de ERK, independiente de su estado de fosforilación (panel inferior). P44 y P42 indican la migración de las isoformas de 44 y 42 Kda, respectivamente.

Esto sugiere que el efecto de hierro sobre ERK es de tipo oxidativo, pues puede ser prevenido por un antioxidante como NAC o por manitol, un atrapador de OH<sup>·</sup>.

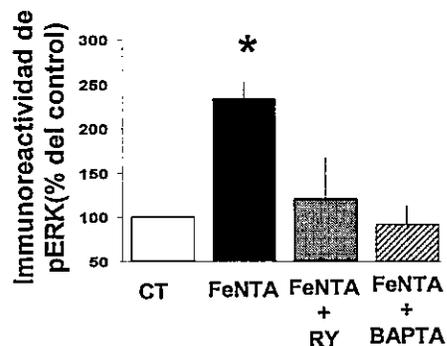
**3.2.2. La liberación de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY inducida por hierro es crucial para la activación de la vía MAPK/ERK.**

Aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual el hierro puede activar a ERK, nosotros postulamos que la liberación de calcio inducida por hierro (Figuras 5-8) podría mediar este proceso. Para evaluar esta hipótesis, se preincubaron células PC12 durante una hora con 20  $\mu$ M de RY o con 10  $\mu$ M de BAPTA-AM para prevenir o neutralizar, respectivamente, la salida de calcio desde el RE previo a la exposición con 20  $\mu$ M Fe-NTA. Como muestra el inmunoblot de la Figura 13, la fosforilación de ERK disminuyó significativamente en ambas condiciones, sugiriendo que la liberación de calcio desde compartimentos sensibles RY es crítica para la activación de la vía MAPK/ERK inducida por hierro.

**A**



**B**



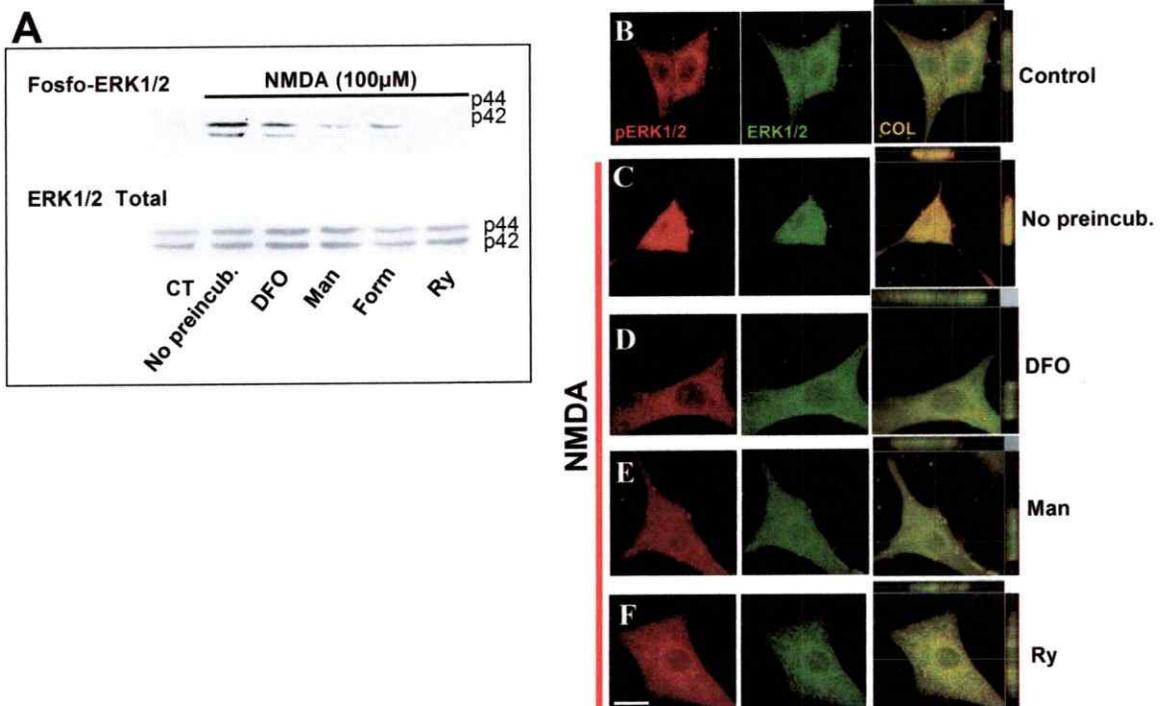
**Figura 13. La liberación de calcio desde compartimentos sensibles a RY es crítica para la fosforilación de ERK.** A) Western blot representativo mostrando cambios en la inmunoreactividad para pERK usando un anticuerpo que detecta la forma fosforilada de ERK en células PC12 expuestas a 20  $\mu$ M de Fe-NTA durante una hora en ausencia o en presencia de un pretratamiento con 20  $\mu$ M de RY o 10  $\mu$ M de BAPTA-AM (panel superior). Las membranas fueron re-ensayadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de ERK, independiente de su estado de fosforilación (panel inferior). P44 y P42 indican la migración de las isoformas de 44 y 42 KDa. Notar que en la imagen del Western blot, la banda correspondiente a BAPTA-AM fue reubicada usando Adobe Photoshop (Adobe, Mountain View, CA, USA) sólo para propósitos de la presentación de la figura. B) Cuantificación de la inmunoreactividad de pERK normalizada con respecto a los niveles de ERK total. Se expresan los datos como porcentaje del basal (promedio  $\pm$  SEM). \*Indica diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ) determinadas usando el test de ANOVA seguido por análisis de comparaciones múltiples Newman-Keuls.

### **3.2.3. El calcio liberado desde reservorios intracelulares sensibles a RY es crítico en la activación de ERK dependiente de NMDAR.**

Estudios previos en diversos tipos celulares, han mostrado que la estimulación de NMDAR puede activar la vía MAPK/ERK. De forma similar, en nuestro estudio encontramos que la exposición de células PC12 a 100  $\mu$ M de NMDA, concentración que induce una sostenida señal de calcio (Figura 4), produjo un aumento tanto en la fosforilación como en la localización nuclear de ERK (Figuras 14A y 14C) comparado al control (Figuras 14A y 14B). La importancia de la salida de calcio desde compartimentos sensibles a RY en la activación de ERK mediada por NMDAR fue evaluada preincubando células PC12 con 50  $\mu$ M de RY previo a un pulso de NMDA. La RY inhibió la fosforilación de ERK inducida por NMDA y su translocación al núcleo (Figura 14A y 14F), indicando que en células PC12 el calcio liberado desde compartimentos intracelulares sensibles a RY es crítico en la activación de ERK dependiente de NMDAR.

### 3.2.4. La activación de ERK dependiente de NMDAR requiere un tono redox permisivo mediado por hierro.

Dado que la concentración de NMDA usada fue efectiva en producir un aumento de calcio y que también indujo la producción de ROS, medida como un aumento de la intensidad de fluorescencia de la sonda H<sub>2</sub>DCF (Figura 4), cabe preguntarse si las ROS producidas por NMDA juegan un papel como mensajeros intracelulares participando en la activación la vía ERK.



**Figura 14. La activación y la translocación nuclear de ERK dependiente de NMDAR en células PC 12 involucran un estado redox permisivo mediado por hierro y por liberación de  $Ca^{+2}$ -inducida por  $Ca^{+2}$  desde depósitos sensibles a RY.** A) Western blot representativo mostrando cambios en la inmunoreactividad para pERK usando un anticuerpo que detecta la forma fosforilada de ERK. Extractos de células PC12 fueron preparados diez minutos después de ser expuestas a un pulso de 100  $\mu$ M de NMDA durante cinco minutos, en ausencia y en presencia de un pretratamiento con DFO 500 $\mu$ M, MAN 100 mM, FORM 300  $\mu$ M o RY 50  $\mu$ M (panel superior). Las membranas fueron reanalizadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de ERK, independiente de su estado de fosforilación (panel inferior). P44 y P42 indican la migración de las isoformas de 44 y 42 KDa. B-F) Immunofluorescencias de células PC12 cultivadas en cubreobjetos de vidrio, usando un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de ERK (rojo) seguido por otro anticuerpo que reconoce ERK total independiente de su estado de fosforilación (verde). Células PC12 antes (B) y a los diez minutos del pulso de NMDA 100  $\mu$ M en ausencia (C) o presencia de pretratamientos con 500  $\mu$ M de DFO (D), 100 mM de MAN (E) o 50  $\mu$ M de RY (F). Calibración: 10  $\mu$ m. A la derecha de las imágenes se muestra el análisis ortogonal donde se aprecia la translocación nuclear.

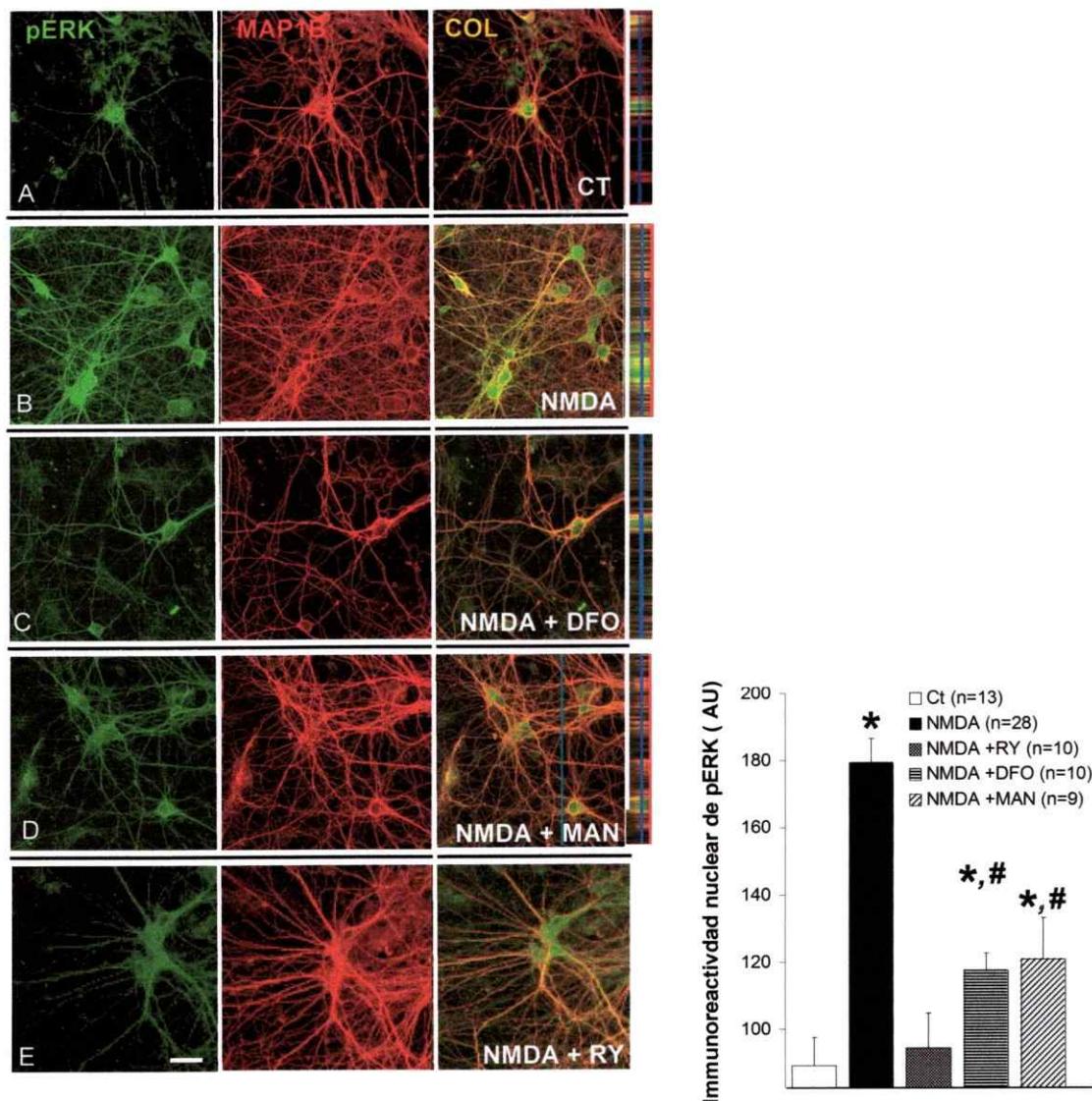
Para determinar si las ROS generadas por NMDA, y en particular si las ROS generadas por hierro, tienen una función en la activación de ERK antes de la exposición a NMDA, las células PC12 fueron incubadas con agentes que previenen la reacción de Fenton o bien que neutralizan sus productos. Encontramos que los cambios en la fosforilación y distribución nuclear de ERK fueron atenuados en todos los casos por pre-tratamiento con 500  $\mu$ M de DFO, 100 mM de manitol o 300  $\mu$ M de formato de sodio (este último también atrapador del radical  $OH^{\cdot}$ ) (Figura 14). Estos resultados sugieren que la activación de ERK dependiente de NMDAR requiere un estado redox permisivo mediado por hierro y  $OH^{\cdot}$ .

***NMDA induce activación de la vía MAPK/ERK/CREB en neuronas hipocampales, mediante un proceso que involucra ROS generadas por hierro y RYR.***

De especial relevancia para PS es el estudio de la localización de ERK en neuronas, debido a que su translocación está asociada a la activación de la transcripción de genes necesarios para PS. En orden a examinar un posible efecto transcripcional mediado por hierro durante actividad neuronal, se siguieron los cambios en la localización de ERK y activación de CREB, en neuronas hipocampales expuestas a un pulso de cinco minutos de 50  $\mu$ M NMDA, tratamiento que demostró producir un aumento en la concentración de calcio (Figura 9). Mediante estudios de inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos que detectan las proteínas fosforiladas, se pudo seguir la activación de ERK y de CREB. Se usó un anticuerpo contra MAP1B (rojo) como marcador neuronal, para asegurar que los efectos observados ocurran en neuronas. En verde se usó un anticuerpo contra ERK en su forma fosforilada y activa (Figura 15). La superposición nos da cuenta del grado de activación de ERK en los cultivos neuronales (amarillo). Como puede verse en la figura y en el análisis ortogonal al costado de esta (Figura 15C), en condiciones control en ausencia de estímulo la activación basal de ERK es baja. Pese a lo anterior, a diferencia de lo que observamos en células PC12, es posible apreciar que una pequeña cantidad de ERK activa se encuentra presente en el núcleo (Figura 15A). Cuando las neuronas son expuestas a 50  $\mu$ M NMDA se produce un fuerte aumento en la

activación de ERK en el citoplasma y en las zonas neuríticas, observándose claramente un aumento de ERK en el núcleo (Figura 15B).

Dado que en células PC12 obtuvimos evidencia que para la activación de ERK era necesario un estado redox mediado por hierro, condujimos experimentos similares para evaluar si en neuronas de hipocampo ocurría un fenómeno similar. Cuando preincubamos las neuronas durante una hora con DFO o manitol, agentes que previenen (Figura 15C) o neutralizan (Figura 15D) las ROS generadas por hierro, respectivamente, se puede observar una disminución tanto en la fosforilación como en la translocación de ERK sugiriendo que los cambios en la activación de ERK involucran radicales  $\text{OH}^{\bullet}$  generados por hierro (Figura 15F).

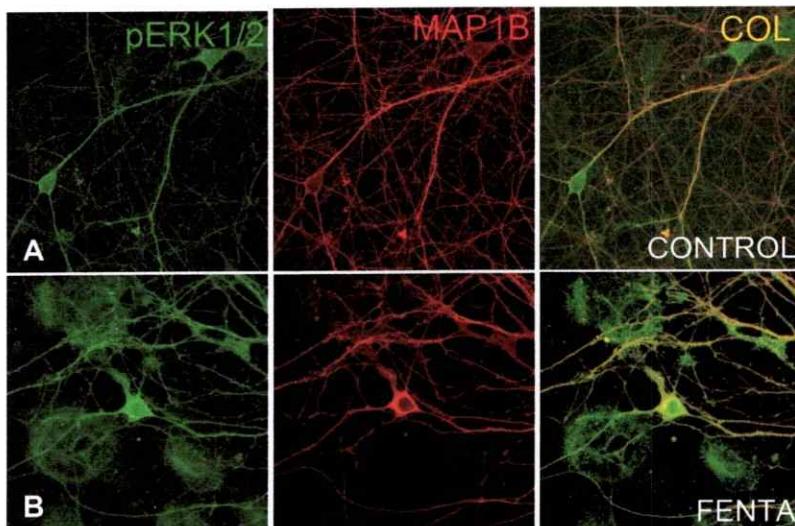


**Figura 15 La translocación nuclear de ERK dependiente de activación de NMDAR involucra un estado redox permisivo mediado por hierro y liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  desde depósitos sensibles a RY, en neuronas de hipocampo en cultivo.**

(A-E) Immunofluorescencias de neuronas hipocampales cultivadas en cubreobjetos de vidrio, teñidas usando un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de ERK (verde) seguido por otro anticuerpo que reconoce MAP1B (rojo). Neuronas hipocampales antes (A) y a los diez minutos del pulso de NMDA 50  $\mu$ M en ausencia (B) o presencia de pretratamientos con DFO 500  $\mu$ M (C), MAN 100 mM (D) o RY 50  $\mu$ M (E). Calibración: 10  $\mu$ m. A la derecha de las imágenes se muestra el análisis ortogonal donde se aprecia la translocación nuclear. F) Cuantificación de la activación de ERK medida como inmunoreactividad de pERK en el núcleo. Los datos son expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (promedio  $\pm$  SEM). \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control y # indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo NMDA + RY determinadas usando el test de ANOVA seguido por un análisis de comparaciones múltiples Newman-Keuls.

De la misma manera, incubando neuronas con 20  $\mu\text{M}$  de RY, concentración que ya sabíamos logra prevenir la salida de calcio desde el RE, se observa que tanto la activación como la localización nuclear de ERK es bloqueada (Figuras 15E y 15F), indicando que la liberación de calcio desde compartimentos sensibles a RY es un evento necesario para la activación de esta vía tras la activación de NMDAR.

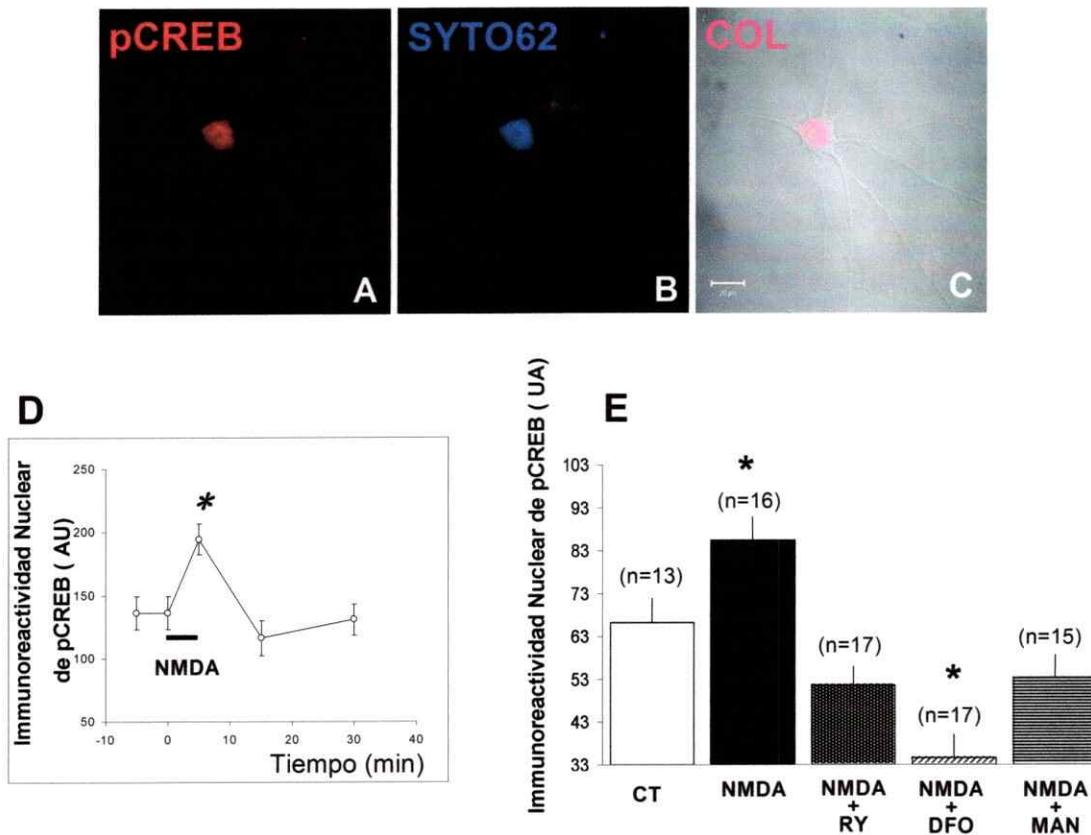
Al estudiar en neuronas hipocampales el efecto del hierro en la activación de ERK se encontró que tratamientos con 20  $\mu\text{M}$  de Fe-NTA aumentaban significativamente la translocación nuclear, comparado a la situación control en ausencia de hierro (Figura 16).



**Figura 16. Hierro induce activación y translocación nuclear de ERK en neuronas de hipocampo en cultivo.** (A y B) Immunofluorescencias de neuronas hipocampales cultivadas en cubreobjetos de vidrio, teñidas usando un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de ERK (verde) seguido por otro anticuerpo que reconoce MAP1B (roja). Neuronas hipocampales antes (A) y a los sesenta de incubación con 20  $\mu\text{M}$  Fe-NTA. Calibración: 20  $\mu\text{m}$ . Se puede observar que el hierro induce una robusta activación de ERK.

Para evaluar si la activación de ERK observada produce activación de genes dependientes del factor de transcripción CREB, usamos un anticuerpo contra CREB fosforilado en el residuo Ser-133 (Figura 17A). La fosforilación en el residuo Ser-133 es necesaria para que este factor se una a la secuencia promotora de ciertos genes involucrados en PS.

Como tinción nuclear se usó una sonda fluorescente que emite rojo lejano, que se une a ácidos nucleicos, SYTO62, la cual en condiciones en que los ARNs citoplasmáticos han sido degradados con  $ARN_{asas}$  reconoce principalmente el núcleo (Figuras 17B y 17C). En condiciones basales la fosforilación de CREB es baja, pudiéndose observar muy poco CREB activo en el núcleo (Figura 17D). No obstante, al exponer las neuronas a 50  $\mu M$  NMDA se produce un rápido y transitorio incremento en la fosforilación de CREB, alcanzando un máximo a los 5 minutos. Luego de diez minutos de remover el estímulo, los niveles de CREB activo disminuyen a niveles comparables al control (Figura 17D). En neuronas preincubadas durante una hora con 500  $\mu M$  de DFO, 100 mM de manitol, los agentes que previenen o neutralizan la reacción de Fenton, se observó que la fosforilación de CREB fue prevenida (Figura 17E), sugiriendo que los cambios en la activación de CREB involucran ROS generadas por hierro. De igual forma, encontramos que los cambios en la fosforilación y activación de CREB fueron completamente bloqueados por pre-tratamientos con 20  $\mu M$  de RY (Figura 17E). Sin embargo, es necesario mencionar que no se pudo cuantificar el CREB total por problemas de detección con los anticuerpos.



**Figura 17.** La activación de NMDAR induce fosforilación de CREB por un proceso que involucra radicales libres generados por hierro y liberación de  $Ca^{+2}$  inducida por  $Ca^{+2}$  desde depósitos sensibles a RY, en neuronas de hipocampo en cultivo. (A) Immunofluorescencia de neuronas hipocampales teñidas con un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de CREB (rojo). (B) Tinción nuclear con SYTO62 (azul) como tinción nuclear. (C) Sobreposición de la imagen de contraste de fases con A y B, indicando la localización nuclear de ambas marcas. (D) Curso temporal de la fosforilación de CREB inducida por un pulso de cinco minutos de  $50\mu M$  de NMDA. Promedio  $\pm$  SEM expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia de al menos diez células por tiempo. (E) Cuantificación de la fosforilación de CREB en neuronas hipocampales antes (Control) y a los cinco minutos de dar un pulso de  $50\mu M$  de NMDA en ausencia o presencia de pretratamientos con  $500\mu M$  de DFO,  $100\text{ mM}$  de manitol o  $50\mu M$  de RY. La fosforilación de CREB fue considerablemente reducida ya sea previniendo o neutralizando la reacción de Fenton, así como bloqueando la liberación de calcio de compartimentos intracelulares sensibles a RY. Los datos se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia (promedio  $\pm$  SEM) de al menos diez células por condición en tres experimentos independientes. \*Indica diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ) determinada usando el test de ANOVA seguido por un analisis de comparaciones múltiples Newman-Keuls.

Estos últimos datos sugieren que una posible consecuencia celular de la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY y estimulada por ROS podría ser la modulación de la vía MAPK/ERK. Por otro lado, sugieren que los radicales libres generados por hierro pueden jugar un papel importante en la cascada de señalización que relaciona causalmente la estimulación de NMDAR con la activación de ERK y la transcripción génica dependiente de CREB.

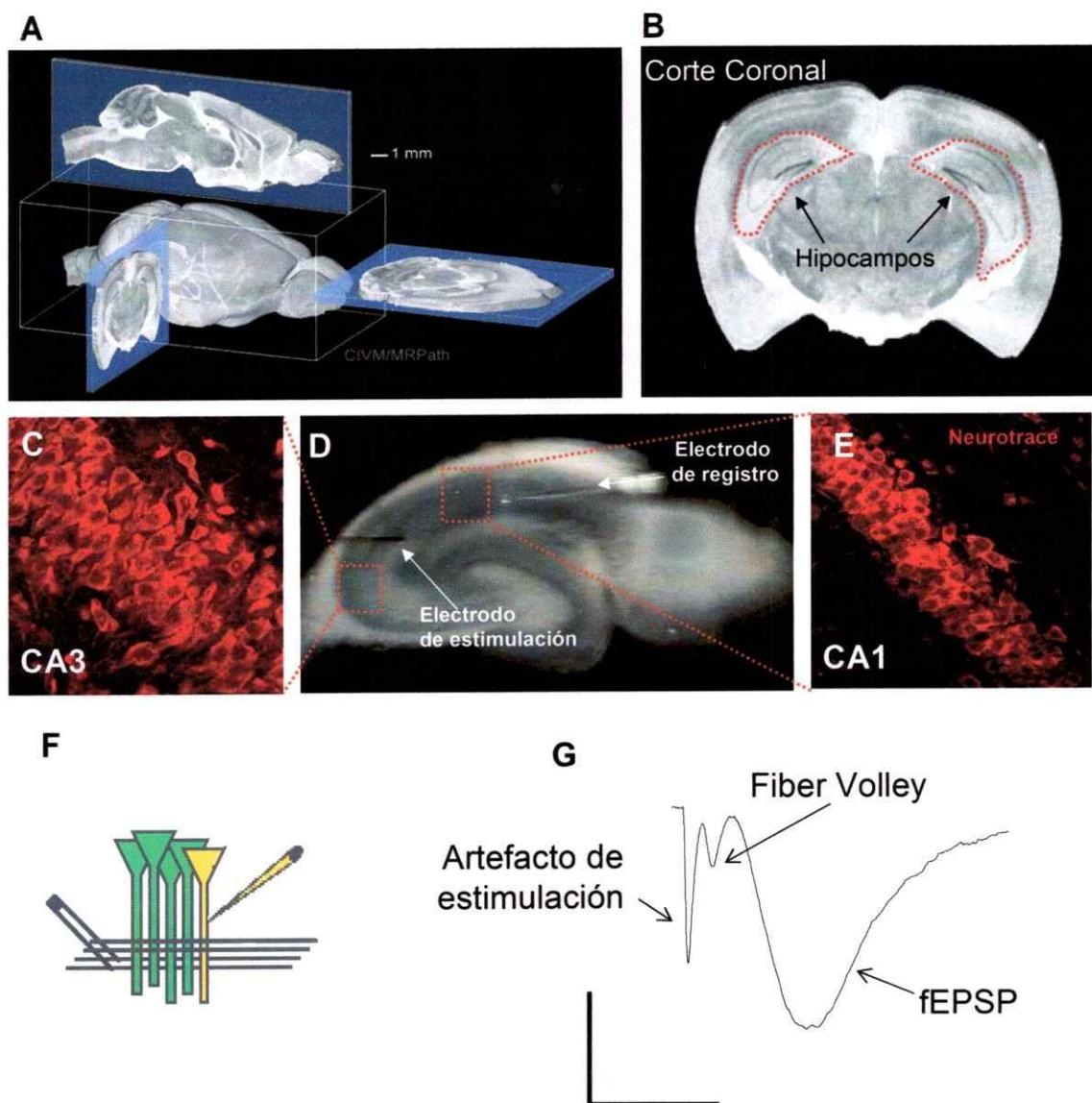
### ***3.3. Efectos del hierro en fenómenos de plasticidad sináptica (LTP o LTD).***

Luego de evaluar en células PC12 y en cultivo primario de neuronas hipocámpales la interrelación que existe entre ROS generadas por hierro y señales de calcio provenientes desde compartimentos intracelulares sensibles a RY, que conduce a la estimulación de la vía MAPK/ERK, y de analizar las posibles consecuencias celulares de esta interrelación durante actividad neuronal, en la siguiente sección analizaremos si esta interrelación tiene alguna relevancia fisiológica en PS, midiendo si cambia la eficiencia sináptica en rebanadas de hipocampo como resultado de cambiar la concentración de hierro, que en base a los datos anteriores puede inducir cambios en el estado redox celular.

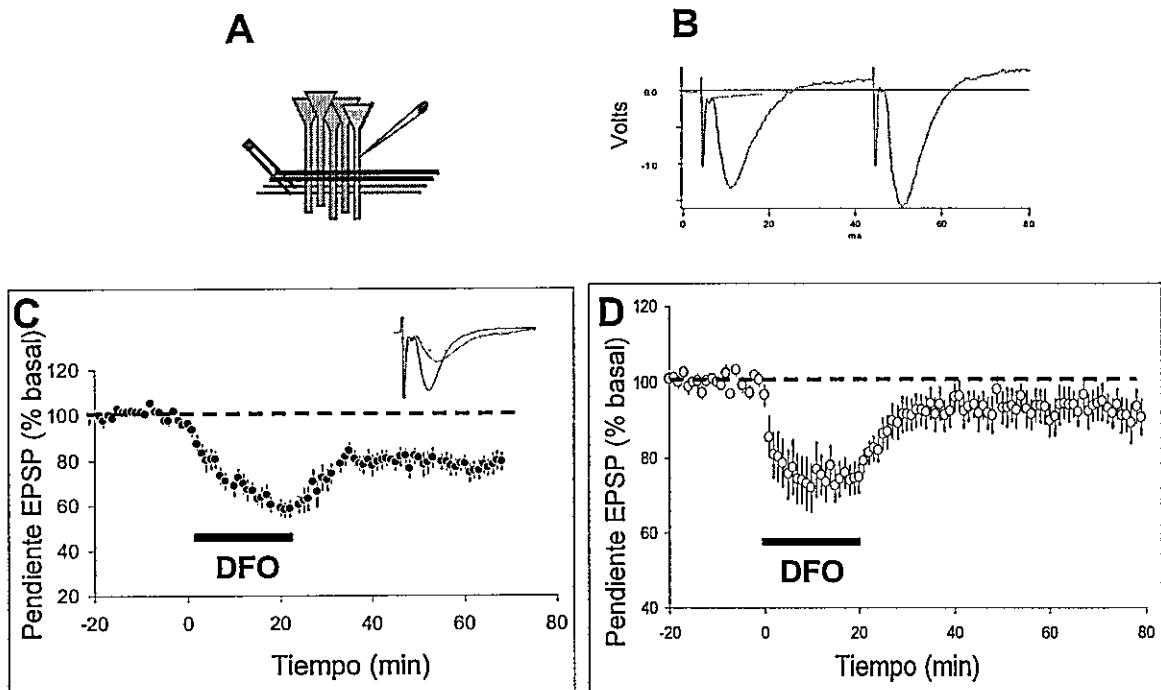
### **3.3.1. Desferroxamina induce depresión en la respuesta sináptica de la zona CA1 frente a estimulación en la zona CA3.**

El estado funcional del hipocampo (Figuras 18A y 18B) puede ser examinado midiendo la pendiente de los potenciales de campo (fEPSP) evocados en las dendritas de la zona CA1 del hipocampo (estrato radiata) (Figura 18E) en respuesta a la estimulación en los axones que proyectan desde la zona CA3 (Colateral de Schaffer) hacia la zona CA1 (Figura 18C). En la figura 18G se puede ver un típico registro de campo obtenido luego de dar un pulso despolarizante en las fibras aferentes (Figura 18D). Luego del artefacto de estimulación se puede ver el "Fiber Volley", que corresponde a un componente presináptico que da origen al potencial de campo (fEPSP), que es la respuesta postsináptica evocada por la estimulación.

Cuando se estimula la colateral de Schaffer con un protocolo de pulsos pareados separados por 40 ms en intervalos de 30 s, la pendiente del fEPSP en respuesta al segundo pulso es algo mayor que la pendiente del fEPSP evocado por el primer pulso (Figura 19B). Al graficar la pendiente obtenida debido al primer pulso, expresada como porcentaje del basal, podemos ver que la pendiente se mantiene estable durante 20 minutos (Figura 19C), lo que indica que el protocolo de estimulación por pulso pareado no altera la transmisión sináptica basal.



**Figura 18. Registro obtenido en el Stratum Radiatum de la zona CA1 de hipocampo de rata.** A) Reconstrucción 3D de un cerebro de rata, mostrando cortes en las distintas coordenadas. B) Corte coronal señalando la ubicación del hipocampo en cada hemisferio del cerebro. C) Proyección de las neuronas hipocámpales de la zona CA3, usando microscopía confocal y el marcador neuronal Neurotrace. D) Imagen de luz transmitida mostrando la disposición de los electrodos en una rebanada de hipocampo. El electrodo de estimulación fue ubicado en las fibras colaterales de Schaffer que corresponden a los axones que proyectan desde las neuronas CA3 hacia la región CA1, donde se ubicó el electrodo de registro. E) Proyección de neuronas hipocámpales de la zona CA1 visualizadas igual que en C. Nótese que las neuronas de CA1 poseen una disposición más compacta. F) Esquema de la configuración y ubicación de los electrodos. G) Registro típicos de un fEPSP mostrando la presencia del "Fiber Volley", componente presináptico obtenido inmediatamente después del artefacto de estimulación. Calibración: 0,5 mV; 10 ms.



**Figura 19. DFO induce una depresión persistente de la respuesta sináptica en neuronas CA1 por estimulación de pulsos pareados en CA3.** A) Esquema de la configuración y ubicación de los electrodos. B) Registros de campo inducidos por estimulación con pulsos pareados separados por 40 ms. Nótese que el segundo pulso tiene una pendiente inicial mayor que el primer pulso. C) Curso temporal del cambio en la pendiente del primer pulso, que se indujo en rebanadas de hipocampo de rata por la aplicación de DFO 1 mM al ACSF durante veinte minutos, como señala la barra negra. Inserto: Registros de campo antes, durante y después de la aplicación de DFO. D) Curso temporal del cambio en la pendiente del primer pulso inducido en rebanadas de hipocampo de ratón por la aplicación de DFO 1 mM al ACSF durante veinte minutos.

La exposición aguda de la rebanada de hipocampo de rata a 1 mM de DFO, una concentración que se ha usado en algunos modelos para estudiar efectos oxidativos (Peeters et al. 2003), produjo una disminución transitoria y reversible en la respuesta sináptica (Figura 19C). No obstante, pese a que la respuesta se recupera luego de lavar el DFO, los fEPSP evocados por la estimulación en pulsos pareados nunca alcanzaron los niveles basales. Luego de la recuperación parcial inicial, la respuesta alcanzó un nivel estable dentro de los 20 minutos y se mantuvo deprimida en comparación al basal, aun después de treinta minutos de la eliminación de DFO ( $79,69 \pm 3,97$  % del basal cincuenta minutos después de la aplicación de DFO, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 7$  animales, 11 rebanadas) (Figura 19C). El descenso en la eficiencia sináptica corresponde a una respuesta tipo LTD.

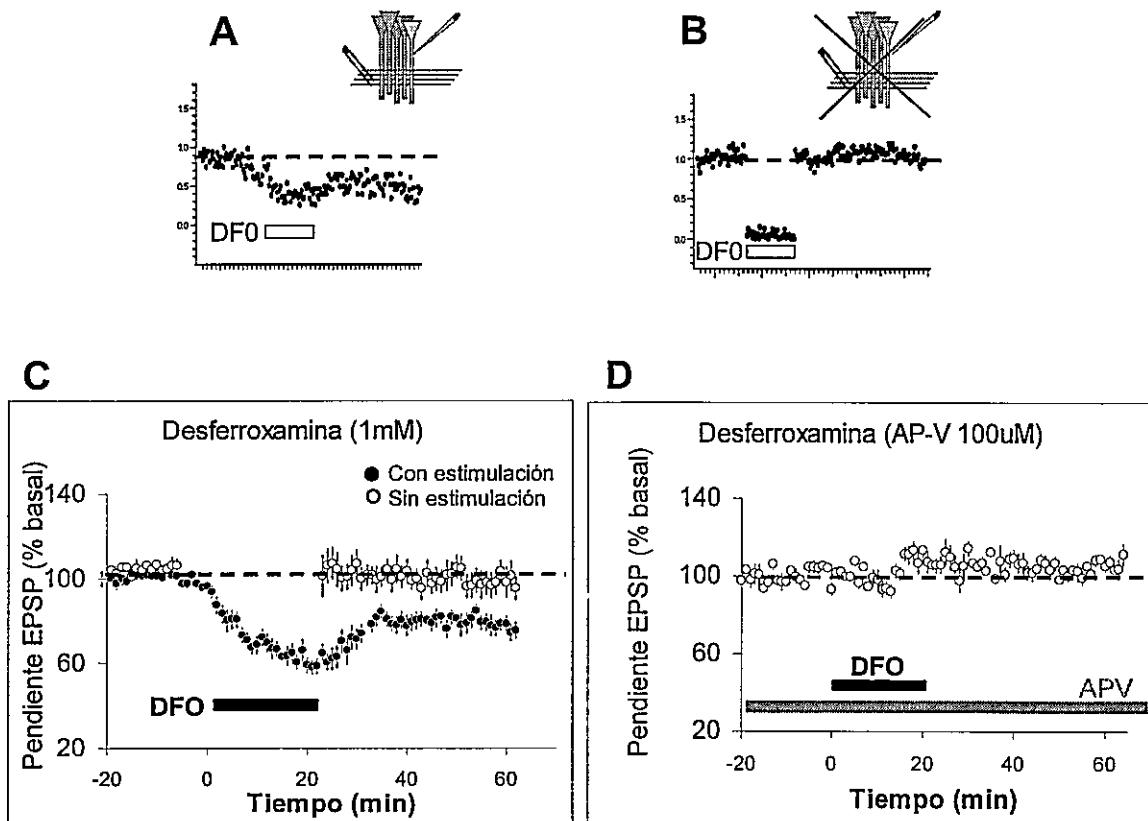
Estudios paralelos realizados en hipocampo de ratón mostraron que DFO induce una depresión similar a la observada en hipocampo de rata ( $90,7 \pm 4,7$  % del basal cincuenta minutos después de la aplicación de DFO, promedio  $\pm$  SEM;  $n = 3$  animales, 10 rebanadas) (Figura 19D).

Una importante pregunta que resulta de lo anterior es determinar si la actividad sináptica modifica el efecto de la incubación con DFO. Para contestar esta pregunta, incubamos dos rebanadas de hipocampo procedente de la misma rata con 1 mM de DFO durante veinte minutos, pero sólo una de ellas fue estimulada con pulsos pareados durante la aplicación del quelante de hierro (Figuras 20A y 20B). Encontramos que la depresión inducida por DFO no ocurrió

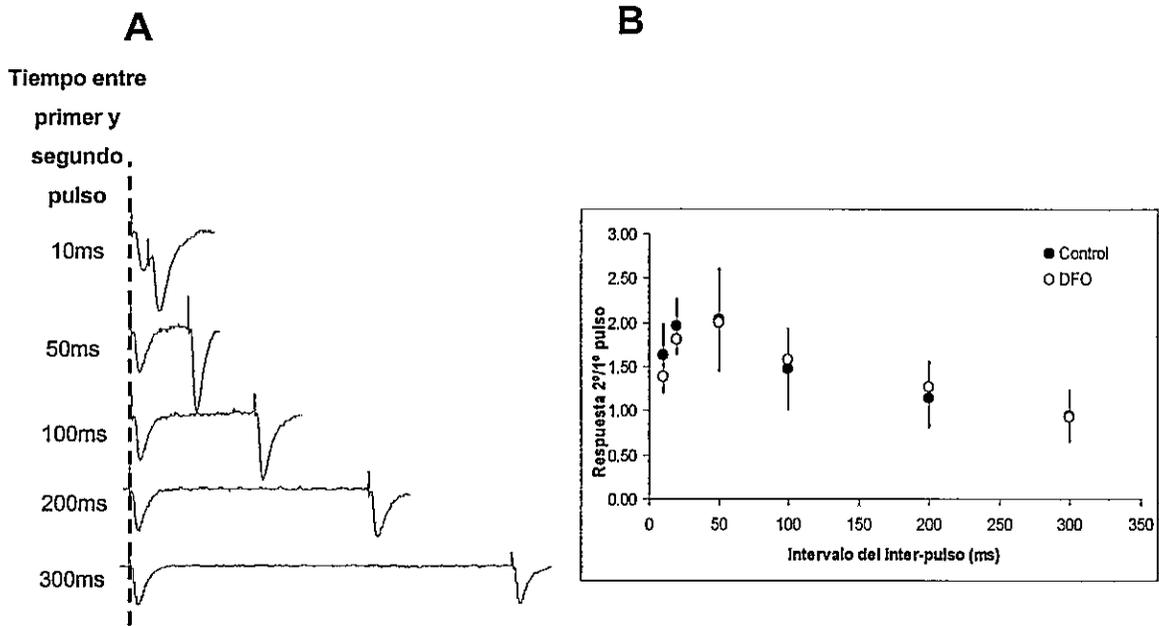
en la rebanada que no fue estimulada (cincuenta minutos después de la aplicación de DFO los valores fueron de  $101,34 \pm 6,91$  % del basal para rebanadas no estimuladas durante la aplicación de DFO, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 7$  animales, 7 rebanadas, y de  $79,69 \pm 3,97$  % del basal para rebanadas estimuladas durante la aplicación de DFO, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 7$  animales, 11 rebanadas;  $p < 0,05$  test de Student pareado), indicando que la depresión sináptica inducida por DFO es dependiente de la actividad sináptica (Figura 20C). Dado que distintos tipos de LTD requieren de la activación de receptores de NMDA lo siguiente a determinar fue si la depresión inducida por DFO era dependiente de este tipo de receptores. Para examinar si este era el caso, incubamos rebanadas con  $100 \mu\text{M}$  de ácido 2-amino-5-fosfovalérico, un antagonista selectivo de los receptores de NMDA, encontrándose que la depresión sináptica inducida por DFO fue completamente bloqueada (Figura 20D). Estos datos sugieren que en neuronas de hipocampo la depresión sináptica producida tras quelar el hierro con DFO requiere un mecanismo dependiente de la actividad sináptica mediada por NMDAR.

Para discriminar si los cambios en la eficiencia sináptica inducidos por DFO son consecuencia de cambios en la transmisión sináptica basal, analizamos la relación entre la primera y segunda respuesta en la estimulación de pulso pareado usando distintos tiempos entre el primer y el segundo pulso (Figuras 21A), en ausencia y en presencia de un pretratamiento de veinte minutos con  $1 \text{ mM}$  de DFO. No se encontró diferencias significativas en la facilitación por pulso pareado entre las respuestas obtenidas antes y después del tratamiento con DFO a los

distintos tiempos evaluados (Figura 21B), usando el test de Student, indicando que la depresión inducida por DFO no se debe a cambios en la transmisión sináptica basal. Además se puede observar que el componente presináptico del potencial de campo (fiber volley) no cambia, indicando que la depresión inducida por DFO no se debe a una alteración en la excitabilidad de las fibras aferentes.



**Figura 20.** La depresión sináptica inducida por estimulación de pulsos pareados en presencia de DFO requiere de actividad sináptica dependiente de activación de NMDAR. A) Experimento representativo de la respuesta sináptica en CA1 por estimulación de pulsos pareados en presencia de DFO. Inserto: Configuración utilizada. B) Experimento representativo del efecto del DFO en la respuesta sináptica en CA1 en ausencia de estimulación durante la aplicación del DFO. Inserto: Configuración utilizada. C) Curso temporal de los cambios en la pendiente del primer pulso inducidos en rebanada de hipocampo de rata por la aplicación de DFO 1 mM al ACSF durante veinte minutos, en presencia y en ausencia de estimulación durante la aplicación del DFO, como señala la barra blanca. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de 11 rebanadas de al menos cinco animales. D) Aplicación de un antagonista de NMDAR (100 $\mu$ M de APV) bloquea totalmente la depresión inducida por DFO.

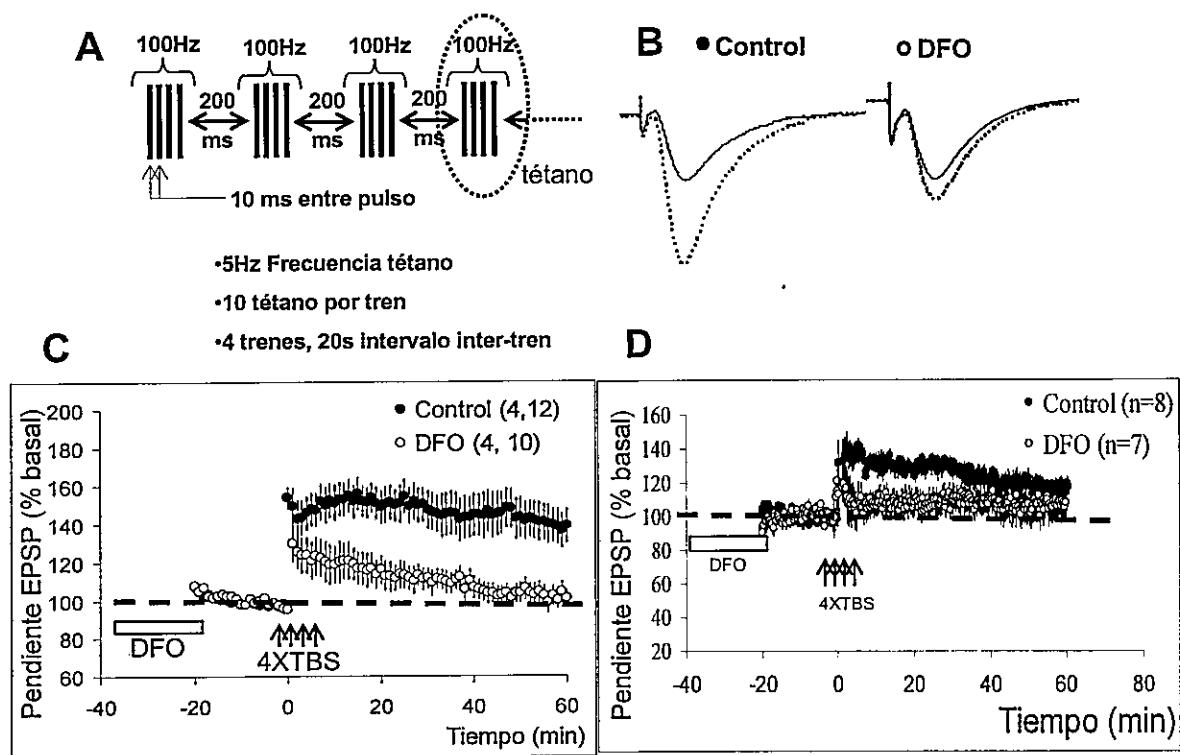


**Figura 21. DFO no altera la transmisión sináptica basal.** A) Trazos representativos de la respuesta sináptica en CA1 por estimulación de pulsos pareados a los tiempos indicados entre el primer y segundo pulso. B) La facilitación por pulso pareado no cambia significativamente antes o después de la aplicación de DFO. Los datos se expresan como la razón entre la pendiente del fEPSP evocado por el segundo estímulo y la pendiente del fEPSP evocado por el primer estímulo. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos.

Estos datos también sugieren que los efectos observados son consecuencia de cambios en la neurona postsináptica, pues al no haber diferencias en la facilitación por pulso pareado, se puede deducir que la liberación de neurotransmisores desde la neurona presináptica no cambia antes y después del tratamiento con DFO.

Para analizar si la ausencia de hierro produce alteraciones en la inducción y/o duración de LTP usamos un protocolo de estimulación tetánica. La figura 22A muestra en detalle el protocolo de los trenes de estimulación de alta frecuencia (TBS: Theta Burst Stimulation). Se ha descrito que entre tres a cinco trenes de

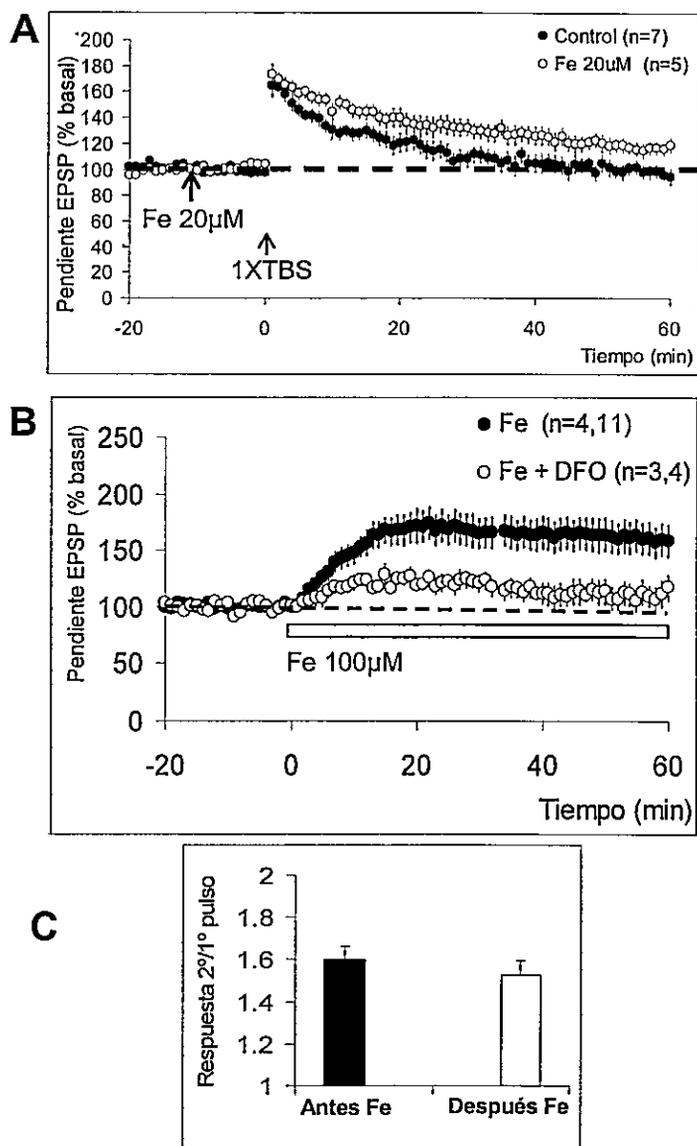
TBS separados por intervalos de veinte segundos inducen un aumento en la eficiencia sináptica, que se mantiene por algunas horas. Cuando se estimularon rebanadas de hipocampo de rata con cuatro trenes de TBS, se indujo una robusta LTP ( $139,2 \pm 9,1$  % del basal, sesenta minutos después del último tétano,  $n = 4$  animales, 12 rebanadas) (Figura 22C). Para evaluar la participación de hierro en esta LTP, se preincubaron rebanadas de hipocampo provenientes del mismo animal con 1 mM de DFO durante veinte minutos en ausencia de actividad eléctrica, condición en la cual no es afectada la transmisión sináptica basal. Se dejó estabilizar la respuesta basal de las rebanadas cargadas con DFO durante veinte minutos antes de aplicar los cuatro trenes de estimulación. Se encontró que la inducción de la LTP no fue afectada, sin embargo, su duración fue significativamente menor que en los controles, pues las rebanadas cargadas con DFO no exhibían LTP sesenta minutos después del último tétano ( $101,0 \pm 4,5$  % del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 4$  animales, 10 rebanadas, test de Student pareado,  $p < 0,05$ ) (Figura 22C), sugiriendo que el hierro es crítico para la completa expresión de la LTP. Usando rebanadas de hipocampo de ratón se encontró que DFO también inhibe la duración de la LTP inducida por cuatro trenes de TBS (LTP en rebanadas control =  $125,4 \pm 3,3$  % del basal, a los treinta minutos del último tétano, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3$  animales, 8 rebanadas, LTP en rebanadas tratadas con DFO =  $109,8 \pm 8,5$  % del basal, promedio  $\pm$  SEM, 3 animales, 10 rebanadas, test de Student pareado,  $p < 0,05$ ) (Figura 22D).



**Figura 22. DFO disminuye la duración de la LTP en neuronas CA1, inducida por trenes de estimulación de alta frecuencia en las fibras aferentes de la zona CA3 del hipocampo.** A) Esquema del protocolo de estimulación para inducir LTP. Cuatro trenes de estimulación de alta frecuencia (TBS) fueron aplicados cada 20 s (0,05 Hz). Cada tren estuvo compuesto de diez "bursts" separados por 200 ms (5 Hz). Cada "burst" estuvo compuesto de cuatro pulsos separados por 10 ms cada uno (100 Hz). Las rebanadas provenientes del mismo animal fueron separadas en cámaras paralelas y registradas simultáneamente. Las rebanadas control no recibieron ningún tratamiento excepto la suspensión de la estimulación basal mientras en la otra cámara las rebanadas son sometidas a un pretratamiento con DFO también en ausencia de estimulación basal, durante veinte minutos antes de la aplicación del protocolo de inducción de LTP (4XTBS). B) Trazas representativas de los fEPSP antes y después de los 4XTBS para rebanadas de hipocampo control y tratadas con DFO 1 mM. C) Curso temporal de los cambios en la pendiente del fEPSP para rebanadas de hipocampo de rata control y tratadas con DFO 1 mM. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de 12 rebanadas control y 10 tratadas con DFO provenientes de cuatro ratas. D) Curso temporal de los cambios en la pendiente del fEPSP para rebanadas de hipocampo de ratones control y tratadas con DFO 1 mM. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de 8 rebanadas control y 7 tratadas con DFO provenientes de tres ratones.

### ***3.3.2. El hierro favorece e induce un aumento de la transmisión sináptica en la zona CA1 del hipocampo.***

Para determinar si el hierro participa en el fortalecimiento sináptico e induce potenciación en la transmisión sináptica, se incubaron rebanadas con distintas concentraciones de hierro y se registró en la zona CA1 del hipocampo. Para inducir un tipo de potenciación de corta duración, usamos un protocolo de estimulación de alta frecuencia consistente en sólo un tren de TBS, que induce una potenciación transitoria de la transmisión sináptica decayendo hasta llegar a un valor comparable al basal a los sesenta minutos después de ser aplicado el tétano (Figura 23A). Luego de perfundir una rebanada con una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  en ACSF, no se observan cambios evidentes en la respuesta sináptica, sin embargo, luego de aplicar el tren de TBS se pudo ver que la potenciación inducida era significativamente mayor y más persistente que la inducida solo por el TBS en ausencia de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  (rebanadas control =  $94,9 \pm 5,4$  % del basal a los sesenta minutos del tétano, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 4$  animales, 7 rebanadas; rebanadas tratadas con hierro =  $119,2 \pm 5,8$  % del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3$  animales, 5 rebanadas, test de Student pareado,  $p < 0,05$ ) (Figura 23A ).



**Figura 23. El hierro convierte una potenciación de la transmisión sináptica transitoria en una más persistente y además facilita la inducción de un tipo de LTP en respuesta a estimulación por pulso pareado.** A) Curso temporal de los cambios en la pendiente del fEPSP para rebanadas de hipocampo de ratón control o tratadas con 20 µM de FeSO<sub>4</sub> desde diez minutos antes de la aplicación de 1XTBS. Las rebanadas control no recibieron ningún tratamiento previo a la aplicación de un TBS, induciéndose sólo una potenciación transitoria; mientras en la otra cámara, las rebanadas fueron perfundidas con una concentración de hierro que no induce cambios en la transmisión sináptica basal. Sin embargo, luego de la aplicación del tren de estimulación (1XTBS) se indujo una potenciación más persistente en el tiempo. Cada punto representa el promedio ± SEM para 7 rebanadas controles de 4 animales y para 5 rebanadas tratadas con hierro de 3 animales.  $p < 0,05$  calculado usando el test de Student pareado. B) Curso temporal de los cambios en la pendiente de los fEPSP del primer pulso en un protocolo de estimulación por pulsos pareados, inducidos en rebanadas de hipocampo de ratón por la aplicación de 100 µM de FeSO<sub>4</sub> durante el tiempo señalado por la barra blanca. En rebanadas preincubadas con DFO durante una

hora previa la aplicación de hierro, disminuye significativamente la potenciación inducida por hierro. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM para 11 rebanadas controles de 4 animales y para 4 rebanadas tratadas con hierro de 3 animales.  $p < 0,05$  calculado usando el test de Student pareado. C) La facilitación por pulso pareado (40 ms entre pulsos) no cambia significativamente antes o después de la aplicación de hierro. Se expresan los datos como la razón entre la pendiente del fEPSP evocado por el segundo estímulo y la pendiente del fEPSP evocado por el primer estímulo. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos. Test de Student pareado,  $p = 0,1996$

Junto con esto, observamos que al incubarse rebanadas con una concentración más alta de hierro ( $100 \mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$ ), se produce un aumento en la respuesta sináptica por estimulación con pulsos pareados de  $158,85 \pm 14,55$  (promedio  $\pm$  SEM,  $n = 4$  animales, 11 rebanadas) (Figura 23B). Preincubando la rebanada con DFO  $1 \text{ mM}$  durante una hora previa a la aplicación de hierro, la potenciación disminuyó significativamente a  $109,32 \pm 11,45$  (promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3$  animales, 4 rebanadas, test de Student pareado,  $p < 0,05$ ) (Figura 23B).

El análisis de la facilitación por pulsos pareados (PPF) no muestra cambios significativos (test de Student pareado,  $p = 0,1996$ ) entre la relación del primer y segundo pulso con valores de PPF antes del tratamiento con hierro de  $1,60 \pm 0,07$  (promedio  $\pm$  SEM,  $n = 4$  animales, 11 rebanadas) y PPF después del tratamiento con hierro de  $1,53 \pm 0,07$  (promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3$  animales, 4 rebanadas) (Figura 23C), indicando que los cambios en la transmisión sináptica son consecuencias de cambios en la neurona postsináptica como consecuencia de la alta concentración de hierro.

### ***3.3.3. Transmisión sináptica y la activación de ERK.***

Dada la importancia que tiene la activación de ERK en PS, en la última parte evaluamos si los cambios en la transmisión sináptica inducidos por hierro están asociados a activación de la vía MAPK/ERK. Para realizar estudios bioquímicos de esta vía, realizamos microdisecciones de la zona CA1 del hipocampo aislándola de las zonas CA3 y el giro dentado, asegurando de esta forma que los cambios ocurren en la zona CA1 del hipocampo. La desventaja de esta metodología es que muchas veces la cantidad de muestra es insuficiente para ser detectada por inmunoblots (WB). Se debe considerar, además, que al estimular eléctricamente las fibras aferentes de la zona CA3 se recluta un número bastante limitado de sinapsis involucradas en la respuesta sináptica de la zona CA1, por tanto se hace aun más difícil seguir los cambios bioquímicos que están ocurriendo. Debido a esta limitante, no se realizaron WB de rebanadas tetanizadas en las diferentes condiciones.

### ***3.3.4. Efecto oxidativo del hierro en la activación de ERK y CREB dependiente de NMDAR, en la zona CA1 del hipocampo.***

Para involucrar un mayor número de sinapsis que nos permitan estudiar la posible participación de ROS generadas por hierro en la activación de ERK mediada por NMDAR, se estimularon rebanadas de hipocampo farmacológicamente con 100  $\mu$ M de NMDA durante cinco minutos, realizando los

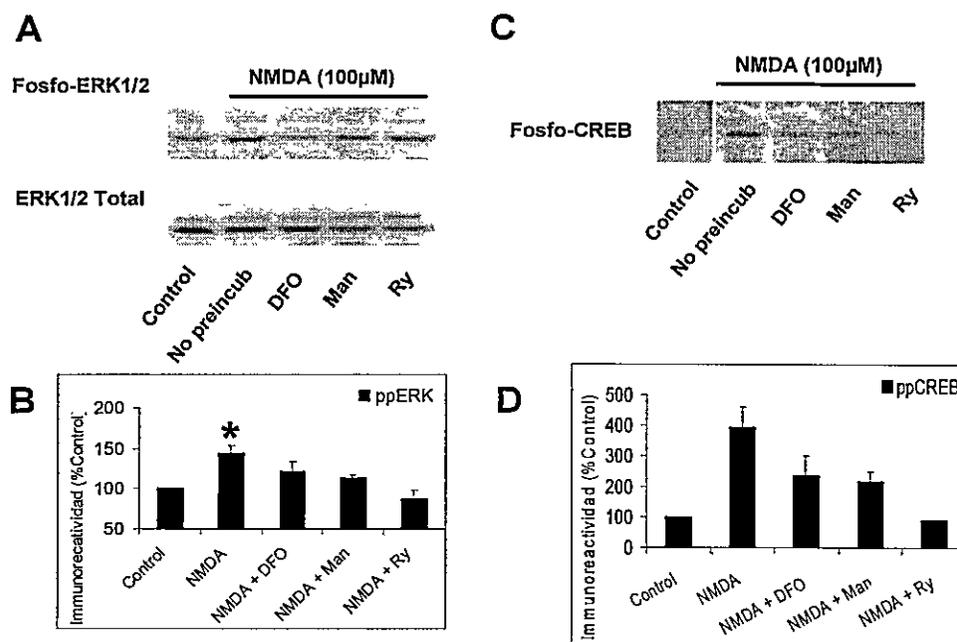
estudios de inmunodetección cinco minutos después de lavado el NMDA del medio de perfusión.

De manera similar a como se describió en cultivo primario en la segunda parte de este trabajo (Figuras 14 y 15), la activación de NMDAR con NMDA produce un aumento en la fosforilación de ERK (Rebanadas NMDA =  $143,3 \pm 9,8$  % del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 4$  animales) (Figuras 24A y 24B).

Los datos anteriores, obtenidos tanto en células PC12 como en cultivo primario de neuronas de hipocampo, sugieren también que la activación de ERK dependiente de NMDAR requiere un estado redox mediado por hierro. Para evaluar si en rebanadas es necesaria la participación oxidativa del hierro, preincubamos las rebanadas durante una hora con agentes que previenen o neutralizan las ROS generadas por hierro. En rebanadas pretratadas con DFO 1 mM o manitol 100 mM durante una hora antes de la aplicación de NMDA, no se observó el aumento en la fosforilación de ERK producido por NMDA (Rebanadas tratadas con NMDA + DFO =  $121,5 \pm 24,5$  % del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3$  animales; rebanadas tratadas con NMDA + Man =  $113,2 \pm 7,7$  % del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3$  animales). Esto sugiere que para la activación de ERK por NMDA no sólo se requiere hierro, si no, además, los radicales libres generados por hierro (Figuras 24A y 24B).

De la misma manera, tras incubar rebanadas con 20  $\mu$ M de RY,

concentración que inhibe la función de RYR, se observa que no ocurre la activación de ERK por NMDA (rebanadas tratadas con NMDA + RY =  $87,4 \pm 21,9$  % del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 2$  animales (Figuras 23A y 23B), indicando que también en rebanadas la liberación de calcio desde compartimentos sensibles a RY es un evento necesario para la activación de esta vía por NMDA.



**Figura 24. La fosforilación de ERK y de CREB, dependientes de la activación de NMDAR por NMDA en rebanadas de hipocampo, involucra un estado redox permisivo mediado por hierro, y además liberación de  $Ca^{+2}$  inducida por  $Ca^{+2}$  desde depósitos sensibles a RY.** A) Western blot mostrando cambios en la inmunoreactividad para pERK. Extractos de rebanadas de hipocampo de ratón obtenidos diez minutos después de ser expuestas a un pulso de  $100 \mu M$  de NMDA durante cinco minutos, en ausencia y en presencia de un pretratamiento con DFO  $500 \mu M$ , MAN  $100 mM$  o RY  $50 \mu M$ . Las membranas fueron re-ensayadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de ERK, independiente de su estado de fosforilación (ERK total). B) Cuantificación de la inmunoreactividad de pERK normalizada con respecto a los niveles de ERK total. Se expresan los datos como porcentaje del basal (promedio  $\pm$  SEM) \*Indica diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ) determinada usando el test de ANOVA seguido por un analisis de comparaciones múltiples Newman-Keuls. C) Western blot que muestra cambios en la inmunoreactividad para pCREB usando un anticuerpo que detecta la forma fosforilada de CREB en el residuo Ser133. Extractos de rebanadas de hipocampo de ratón fueron obtenidos diez minutos después de ser expuestas a un pulso de  $100 \mu M$  de NMDA durante cinco minutos, en ausencia y en presencia de un pretratamiento con DFO  $500 \mu M$ , MAN  $100 mM$  o RY  $50 \mu M$  (panel superior). D) La cuantificación de la inmunoreactividad de pCREB no fue normalizada con respecto a los niveles de CREB total, pues aunque las membranas fueron re-ensayadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de CREB, independiente de su estado de fosforilación, no pudo detectarse la proteína CREB total. Se expresan los datos como porcentaje del basal (promedio  $\pm$  SEM).

Las mismas membranas utilizadas para detectar ERK fosforilado fueron probadas usando un anticuerpo contra CREB fosforilado, para evaluar si la activación de ERK promueve la transcripción de genes dependientes del factor nuclear CREB en rebanadas estimuladas con NMDA. En ausencia de estimulación, la fosforilación de CREB es baja, condición que cambia al exponer las rebanadas a NMDA 100  $\mu$ M. Cinco minutos después del estímulo con NMDA se produce un incremento en la fosforilación de CREB (Rebanadas NMDA = 394,9  $\pm$  63,9% del basal, promedio  $\pm$  SEM, n = 3 animales) (Figuras 24C y 24D). Sin embargo, en rebanadas preincubadas durante una hora con 500  $\mu$ M de DFO o 100 mM de manitol, no se observó este aumento de la fosforilación de CREB (rebanadas tratadas con NMDA + DFO = 236,9  $\pm$  63,1% del basal, promedio  $\pm$  SEM, n = 3 animales; Rebanadas tratadas con NMDA + Man = 216,3  $\pm$  64,3 % del basal, promedio  $\pm$  SEM, n = 3 animales) (Figuras 24C y 24D), lo que sugiere que los cambios en la activación de CREB, involucran ROS generadas por hierro como se vio para ERK. De igual forma, encontramos que los cambios en la fosforilación de CREB fueron completamente bloqueados por pre-tratamientos con 50  $\mu$ M de RY (Rebanadas tratadas con NMDA + RY = 89,0  $\pm$  21,9 % del basal, promedio  $\pm$  SEM, n = 2 animales) (Figuras 24C y 24D).

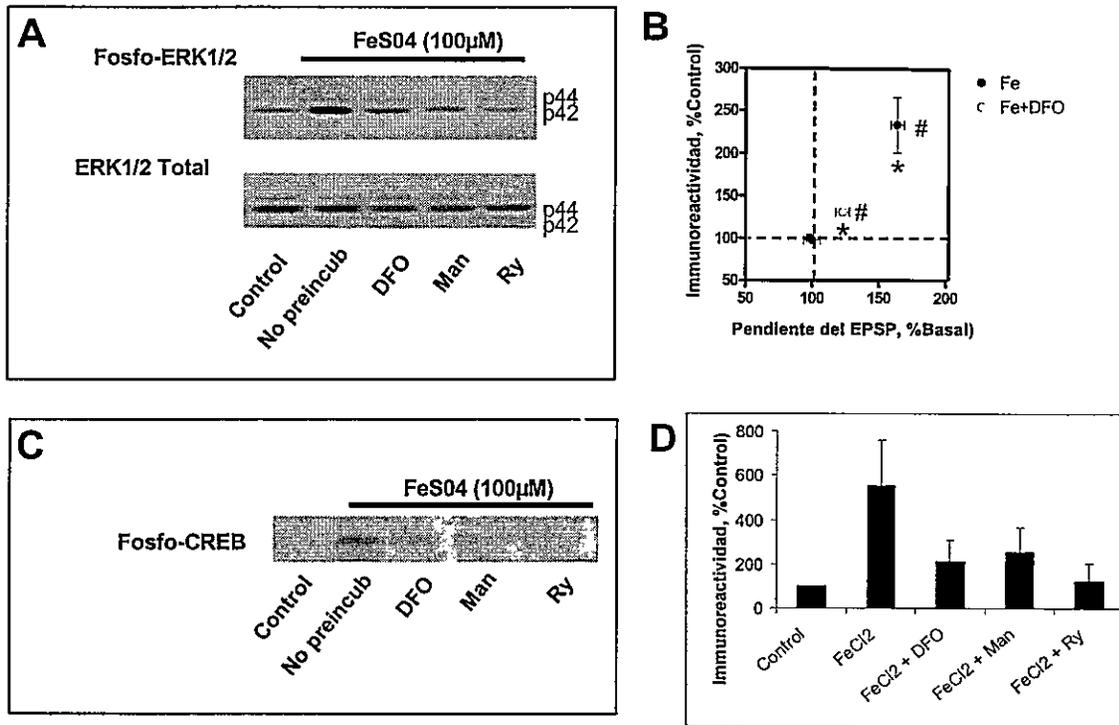
Estos resultados sugieren que la activación de ERK y de CREB inducida por NMDA requiere de un estado redóx adecuado para el funcionamiento neuronal, que se inhibe por DFO o manitol, y de liberación de calcio mediada por RYR. Los resultados sugieren, además, que las alteraciones observadas en la

LTP inducida por trenes de estimulación de alta frecuencia en ausencia de hierro pueden deberse a la carencia de un efecto oxidativo mediado por hierro sobre la actividad del RYR.

### ***3.3.5. ROS generadas por hierro inducen fosforilación de ERK y CREB en la zona CA1 del hipocampo.***

En la última parte de este trabajo se evaluó si los cambios en la transmisión sináptica promovidos por hierro se correlacionan con cambios en la activación de ERK y CREB. Al incubar rebanadas de hipocampo con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$ , concentración que induce una robusta potenciación de la transmisión sináptica (Figura 23B), se observó un aumento en la fosforilación de ERK en la zona CA1 del hipocampo (Rebanadas  $\text{FeSO}_4$  =  $141,6 \pm 19,7\%$  del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 4$  animales) (Figuras 25A y 25B). El efecto estimulante del hierro sobre la fosforilación de ERK disminuyó significativamente al preincubar con DFO o manitol (Rebanadas tratadas con  $\text{FeSO}_4$  + DFO =  $121,5 \pm 24,5\%$  del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3$  animales; Rebanadas tratadas con  $\text{FeSO}_4$  + Man =  $113,2 \pm 7,6\%$  del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 2$  animales,  $p < 0.05$ , test ANOVA) (Figuras 25A y 25B), indicando que las ROS generadas por hierro están involucradas en la activación de esta vía. Los cambios en la fosforilación de ERK inducidos por hierro también fueron bloqueados en rebanadas preincubadas con RY 50  $\mu\text{M}$  (rebanadas tratadas con  $\text{FeSO}_4$  + RY =  $87,4 \pm 21,8\%$  del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3$  animales) (Figura 25A), lo que sugiere que las ROS generadas por hierro

ejercen su efecto modulando la salida de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY.



**Figura 25. El hierro induce la fosforilación de ERK y de CREB por un proceso que involucra radicales libres y liberación de  $Ca^{+2}$  inducida por  $Ca^{+2}$  desde depósitos sensibles a RY, en rebanadas de hipocampo.** A) Western blot mostrando cambios en la inmunoreactividad para fosfo-ERK usando un anticuerpo que detecta la forma fosforilada de ERK. Extractos de rebanadas de hipocampo de ratón fueron preparados después de sesenta minutos de exposición a 100  $\mu$ M de  $FeSO_4$ , en ausencia y en presencia de un pretratamiento con 500  $\mu$ M de DFO, 100 mM de MAN o 50  $\mu$ M de RY (panel superior). Las membranas fueron reprobadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de ERK, independiente de su estado de fosforilación (panel inferior). B) Cambios en la fosforilación de ERK una hora después de la aplicación de 100  $\mu$ M de  $FeSO_4$  asociados a cambios en los potenciales de campo (fEPSP). Cuantificación de la inmunoreactividad de pERK normalizada con respecto a los niveles de ERK total. Se expresan los datos como porcentaje del basal (promedio  $\pm$  SEM). \*Indica diferencias significativas en la pendiente del EPSP y # indica diferencias significativas en la fosforilación de ERK, en ambos casos con respecto al control ( $p < 0.05$ ) determinada usando el test de ANOVA seguido por un análisis de comparaciones múltiples Newman-Keuls. C) Western blot representativo mostrando cambios en la inmunoreactividad para pCREB usando un anticuerpo que detecta la forma fosforilada de CREB en el residuo Ser133. Extractos de rebanadas de hipocampo de ratón fueron preparados a los sesenta minutos de exposición a 100  $\mu$ M de  $FeSO_4$ , en ausencia y en presencia de un pretratamiento con 500  $\mu$ M de DFO, 100 mM de MAN o 50  $\mu$ M de RY (panel superior). Las membranas fueron reensayadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de CREB, independiente de su estado de fosforilación, sin embargo, no pudo detectarse la proteína CREB total. D) Cuantificación de la inmunoreactividad de pCREB no normalizada con respecto a los niveles de CREB total. Se expresan los datos como porcentaje del basal (promedio  $\pm$  SEM).

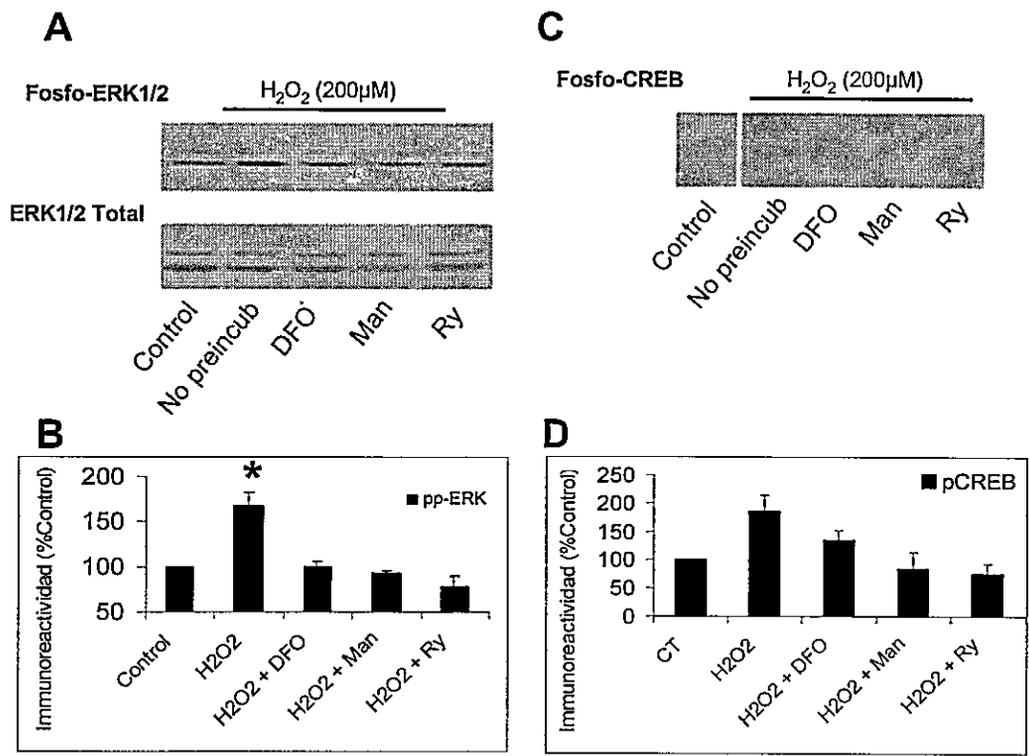
Reprobando las membranas con el anticuerpo que reconoce CREB fosforilado, se pudo observar que hierro induce también un aumento en el estado de fosforilación de CREB (rebanadas  $\text{FeSO}_4 = 552,3 \pm 206,1\%$  del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 4$  animales) (Figuras 25C y 25D).

La activación de CREB inducida por hierro fue bloqueada también en rebanadas preincubadas con DFO o manitol (rebanadas tratadas con  $\text{FeSO}_4 + \text{DFO} = 215,0 \pm 95,9\%$  del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 4$  animales; rebanadas tratadas con  $\text{FeSO}_4 + \text{Man} = 253,5 \pm 113 \%$  del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 4$  animales,  $p < 0.05$ , test de ANOVA) (Figuras 25C y 25D), indicando que las ROS generadas por hierro son responsables de esta activación. Los cambios en la fosforilación de CREB inducidos por hierro no ocurrieron en rebanadas preincubadas con RY  $50 \mu\text{M}$  (rebanadas tratadas con  $\text{FeSO}_4 + \text{RY} = 123,8 \pm 80,1 \%$  del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , animales,  $p < 0.05$ , test de ANOVA), lo que sugiere que las ROS generadas por hierro ejercen su efecto modulando la salida de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY.

Si los efectos observados con hierro son debidos a ROS generadas por hierro, es válido suponer que si aumentamos la concentración de peróxido de hidrógeno, que es otro participante en la reacción de Fenton, deberíamos esperar resultados similares a los obtenidos con hierro. Para evaluar esta posibilidad condujimos experimentos en rebanadas de hipocampo con  $\text{H}_2\text{O}_2$   $200 \mu\text{M}$ , concentración que evoca un aumento en la concentración de calcio en neuronas

en cultivo. Como era de esperar  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$  produjo un aumento en la fosforilación de ERK (rebanadas tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  =  $167,7 \pm 14,6$  % del basal, promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3$  animales en todos los grupos) (Figuras 26A y 26C) y de CREB (rebanadas tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  =  $185,2 \pm 28,3$  % del basal, promedio  $\pm$  SEM) (Figuras 26B y 26D). El efecto del peróxido en la fosforilación de ERK y de CREB, disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ , test de ANOVA) tras incubación con DFO (pERK =  $100,4 \pm 5,8\%$  del basal; pCREB =  $135,3 \pm 15,1\%$  del basal) o manitol (pERK =  $92,9 \pm 2,9\%$  del basal; pCREB =  $85,3 \pm 28,1\%$  del basal), sugiriendo que el peróxido en sí no media mayoritariamente este efecto, sino las ROS inducidas por hierro.

Finalmente, al incubación rebanadas de hipocampo con RY 50  $\mu\text{M}$  no se observó la activación de ERK (rebanadas tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  + RY =  $77,4 \pm 11,6$  % del basal) (Figuras 26A y 26C) y de CREB (rebanadas tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  + RY =  $75,9 \pm 18,5$  % del basal) (Figuras 25B y 25D), sugiriendo nuevamente que la liberación de calcio mediada por RYR es crítica para la activación de esta vía por peróxido.



**Figura 26.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la fosforilación de ERK y de CREB por un proceso que involucra radicales libres y liberación de Ca<sup>+2</sup> inducida por Ca<sup>+2</sup> desde depósitos sensibles a RY, en rebanadas de hipocampo. A) Western blot representativo mostrando cambios en la inmunoreactividad para pERK usando un anticuerpo que detecta la forma fosforilada de ERK. Extractos de rebanadas de hipocampo de ratón fueron preparados a los sesenta minutos de exposición a 200 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en ausencia y en presencia de un pretratamiento con DFO 500 μM, MAN 100 mM o RY 50 μM (panel superior). Las membranas fueron reensayadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de ERK, independiente de su estado de fosforilación (panel inferior). P44 y P42 indican la migración de las isoformas de 44 y 42 KDa. B) Cuantificación de la inmunoreactividad de pERK normalizada con respecto a los niveles de ERK total. Los datos se expresan como porcentaje del basal (promedio ± SEM). \*Indica diferencias significativas con respecto al control (p < 0.05) determinada usando el test de ANOVA seguido por un analisis de comparaciones múltiples Newman-Keuls. C) Western blot representativo mostrando cambios en la inmunoreactividad para pCREB usando un anticuerpo que detecta la forma fosforilada de CREB en el residuo Ser133. Extractos de rebanadas de hipocampo de ratón fueron preparados a los sesenta minutos de exposición a 100 μM de FeSO<sub>4</sub>, en ausencia y en presencia de un pretratamiento con 500 μM de DFO, 100 mM de MAN o 50 μM de RY (panel superior). Las membranas fueron reensayadas con un anticuerpo que reconoce la forma total de CREB, independiente de su estado de fosforilación, sin embargo, no pudo detectarse la proteína CREB total. D) Cuantificación de la inmunoreactividad de pCREB no normalizada con respecto a los niveles de CREB total. Los datos se expresan como porcentaje del basal (promedio ± SEM).

#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis indican que la incubación de las células PC12 o de neuronas de hipocampo en cultivo con DFO (quelante de hierro) o manitol (remueve hidroxilo) inhibe tanto la generación de señales de calcio sensibles a ryanodina como la estimulación de la fosforilación de ERK producidas por NMDA. Además, al incubar rebanadas de hipocampo con DFO se observa una clara inhibición de la estimulación de la fosforilación de ERK producida por NMDA. DFO también inhibe la transmisión sináptica en rebanadas de hipocampo, generando LTD; este efecto de DFO ocurre a nivel postsináptico y requiere de RNMDA funcionales, pues no ocurre en presencia de un bloqueador específico de RNMDA. DFO inhibe, además, la LTP inducida por trenes de estimulación de alta frecuencia. Por otra parte, al incubar las células PC12 o las neuronas de hipocampo con alto hierro, se observa que surgen señales de calcio sensibles a ryanodina y que se estimula la fosforilación de ERK; ambos efectos no ocurren tras preincubar con DFO. Más aun, el sólo hecho de incubar rebanadas de hipocampo con alto hierro produce LTP y estimula la fosforilación de ERK; ambos efectos no ocurren en rebanadas preincubadas con DFO, manitol o ryanodina.

Este conjunto de resultados sugiere que el hierro, a través de la generación del radical hidroxilo, media la eficiencia de la transmisión sináptica entre neuronas CA3 a CA1 del hipocampo. A su vez, el radical hidroxilo presumiblemente activa la liberación de calcio mediada por canales RYR, que son sensibles a inhibición por ryanodina.

En vista del trascendente papel que parece tener el hierro para la función neuronal, se presenta a continuación una breve reseña de los posibles mecanismos oxidativos asociados a las acciones celulares del hierro.

#### ***4.1. Hierro y efecto oxidativo asociado a radicales libres.***

Un número de reacciones enzimáticas que comprenden el intercambio de un electrón son dependientes de la presencia de hierro en un estado redox activo, por lo que este metal es relativamente abundante en el interior celular (Kakhlon & Cabantchik, 2002). Esta abundancia, sumado al ambiente celular reductor y la presencia de oxígeno molecular genera una abundante producción de ROS, lo que podría ser una condición aparentemente dañina para la célula. De particular importancia en el contexto de esta tesis es el papel del hierro en la formación de  $\text{OH}^\cdot$  vía la reacción de Fenton. La posible participación del  $\text{OH}^\cdot$  en el proceso de liberación de calcio y en la plasticidad sináptica encontrada en esta tesis fue completamente inesperada y puede ser, además, muy controvertida, dado que la noción más aceptada señala que las ROS que median la regulación redox celular son  $\text{O}_2^\cdot$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y no  $\text{OH}^\cdot$ . El  $\text{OH}^\cdot$  es una especie poco específica pues es altamente reactiva, y por lo tanto de baja difusión efectiva. Esto plantea el desafío de entender cómo el radical libre  $\text{OH}^\cdot$  puede estar involucrado en la mediación de efectos redox específicos y reversibles.

En nuestros experimentos, usamos el atrapador fluorogénico TEMPO 9

para detectar la generación de  $\text{OH}^\cdot$  (Figura 1). Las propiedades paramagnéticas del grupo nitróxido presente en TEMPO 9, hacen que la fluorescencia de esta molécula por si sola sea muy baja, presumiblemente por un mecanismo de intercambio electrónico intermolecular. La reacción de TEMPO 9 con el radical  $\text{OH}^\cdot$  conduce a la formación de un producto diamagnético, lo que elimina su apagamiento intermolecular y resulta en un aumento de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de  $\text{OH}^\cdot$  generado (Yang et al. 2001). Usando TEMPO 9, determinamos que la adición de FeNTA al medio de cultivo produce radicales  $\text{OH}^\cdot$  tanto en células PC12 (Figura 1). Lo más probable es que estos  $\text{OH}^\cdot$  sean generados por hierro, ya que al neutralizar con manitol (Figura 1) se observa una disminución de la fluorescencia de TEMPO 9.

Además, exploramos cambios en el estado oxidativo celular asociados a ROS usando  $\text{H}_2\text{DCF}$  en su forma esterificada (permeable) que permite su paso a través de la membrana celular; tras entrar a la célula la sonda es hidrolizada enzimáticamente por esterasas intracelulares, permitiendo su uso para estudios celulares. Independiente del efecto oxidativo que pueda tener el hierro mediante su participación en las distintas reacciones ya descritas, se ha demostrado en estudios anteriores que la activación de NMDAR induce la producción de ROS en rebanadas de hipocampo (Bindokas et al., 1996). Por otro lado, el uso de atrapadores específicos para cada ROS ha permitido determinar que tanto superóxido como peróxido de hidrógeno participan en LTP dependiente de NMDAR (Kamsler et al., 2004; Klann, 1998; Klann et al., 1999; Knapp et al.,

2002) y en la activación de la vía ERK/MAPK (Kemmerling et al., 2006; Kishida et al., 2005; Muñoz et al., 2006). Consistente con esto, al explorar si la actividad neuronal está asociada a generación de ROS usando  $H_2DCF$  encontramos que en células PC12 la estimulación de NMDAR produjo un aumento de ROS. Nuestros datos muestran, además, que la producción de ROS se asocia específicamente a la actividad de NMDAR, puesto que la activación de canales de calcio voltaje-dependientes inducida por despolarización con soluciones externas de alto potasio, no provocó cambios en la fluorescencia de  $H_2DCF$ , indicando que la concentración de ROS no varía bajo estas condiciones. Esta última observación ha sido corroborada por otros autores usando dihidrorodamina 123 (otra sonda para determinar ROS), encontrando que un protocolo de despolarización por alto potasio, similar al usado por nosotros, no tiene efecto en la producción de ROS (Yermolaieva et al., 2000).

Lo anterior abre una interrogante acerca de cuales, entre los distintos tipos de plasticidad que ocurren en el hipocampo, podrían ser dependientes de las ROS. Es necesario profundizar este punto, pues es sabido que algunos tipos de plasticidad pueden ser inducidos por mecanismos independientes de la activación de NMDAR y en estos casos pueden no estar involucradas las ROS.

Al evaluar si el aumento en la concentración de ROS observado luego de activación de NMDAR está asociado a la generación de  $OH^\cdot$ , usando la sonda TEMPO 9, no logramos detectar cambios significativos en la producción de  $OH^\cdot$

durante actividad neuronal mediada por NMDAR (Dato no mostrado). Aunque los datos obtenidos con TEMPO 9 nos indican aparentemente que la concentración de  $\text{OH}^\cdot$  no varía, es probable que los cambios sean tan exiguos y localizados que estén bajo el límite de detección de la técnica que mide el derivado fluorescente de TEMPO 9. Esto contrasta con lo que ocurre con hierro, que genera gran cantidad de  $\text{OH}^\cdot$  que son rápidamente detectados debido a una rápida acumulación del aducto de la molécula atrapadora. Por lo tanto, se hace necesario abordar este aspecto usando técnicas más sensibles que permitan detectar los radicales libres generados por hierro durante un evento de actividad neuronal, puesto que nosotros y otros autores, usando distintos atrapadores de  $\text{OH}^\cdot$ , hemos mostrado que este radical tiene un fuerte impacto en la señalización celular luego de la activación de NMDAR.

#### ***4.2. Hierro y estimulación de la señal de calcio mediada por RYR.***

Nuestros datos sugieren que el radical libre  $\text{OH}^\cdot$  juega un papel importante en la activación de la salida de calcio mediada por RYR desde depósitos intracelulares, pues encontramos que el hierro, a través de la generación de ROS, induce señales de calcio sensibles a RY. En particular, la exposición de las neuronas a concentraciones elevadas de hierro aumentó la frecuencia de las señales de calcio altamente localizadas y sensibles a inhibición por RY. Se han observado señales de calcio en una amplia variedad de tejidos, incluyendo células de músculo liso, cardíaco y esquelético además de otras células no excitables

(Berridge, 1997; Bootman & Berridge, 1995). Se han descrito estas señales como eventos elementales con los cuales se construye una señal de calcio global, como ondas u oscilaciones de calcio. Este tipo de eventos dependientes de RYR se ha observado con anterioridad en neuronas (Ouyang et al., 2005) y en células PC12 (Koizumi et al., 1999). Tal es así, que la estimulación sub-máxima del RYR con bajas concentraciones de cafeína aumenta la frecuencia de estos eventos de calcio en tanto que altas concentraciones de cafeína provocan un aumento global en la concentración de calcio (Koizumi, et al, 1999; Ouyang et al., 2005).

Las señales de calcio inducidas por hierro presentan características similares a las descritas en los trabajos de estimulación con cafeína. Un estímulo oxidativo moderado, asociado a bajas concentraciones de hierro (FeNTA 20  $\mu$ M), activa los sitios más sensibles evocando sólo un aumento en el número de eventos con respecto a la situación control. En cambio un mayor estímulo oxidativo (FeNTA 100  $\mu$ M) probablemente activa todos los sitios de liberación transformando una respuesta local en una respuesta global de calcio. Este comportamiento dependiente del estímulo ha sido reportado para RYR en otros tipos celulares (Berridge, 1997; Bootman & Berridge, 1995). Luego de la aplicación de bajas concentraciones de hierro observamos que los aumentos de calcio, que ocurren en varios sitios a lo largo de la línea de muestreo, no ocurren en todas las ROIs, pues encontramos que en células PC12 solamente el >80% de las ROIs respondían y en células hipocampales, un porcentaje menor (~40%). Si bien este tipo de respuesta ha sido reportada con anterioridad (Koizumi et al.,

1999), las razones para las diferencias entre ambos modelos no están del todo clara. Las células PC12 son una línea celular que ha sido ampliamente usada como modelo neuronal, ya que poseen características similares a las neuronas simpáticas del sistema nervioso periférico. Sin embargo, estas pueden ser funcional y morfológicamente distintas a las neuronas del sistema nervioso central (SNC). Por ejemplo, las neuronas del SNC están embebidas en una densa matriz, ambiente en el cual las conectividades son muy diferentes a las que existen en células PC12 o en un ganglio simpático. Otra posible explicación para el hallazgo de que en células PC12 los eventos de calcio son mucho más frecuentes que en neuronas hipocampales, es que las células PC12 poseen una entrada capacitativa de calcio muy pronunciada, mecanismo que permite mantener una sustancial carga del RE aun en ausencia de despolarización (Bennett et al., 1998). En contraste, las neuronas de hipocampo parecen no expresar esta entrada capacitativa de calcio, al menos en un grado detectable (Garaschuk et al., 1997). Se ha descrito que cuando el RE se encuentra más cargado con calcio se favorecen los eventos espontáneos y también los inducidos por la unión de agonistas de RYR (Koizumi et al., 1999).

Las neuronas hipocampales presentan espinas dendríticas, especializaciones morfológicas a nivel sináptico que presentan todos los elementos necesarios para la transducción de la señal que se genera en respuesta a la estimulación sináptica. No obstante, algunos estudios morfológicos en neuronas hipocampales han mostrado que no todas las espinas dendríticas

poseen retículo endoplasmático, y por otro lado, se observó que el RE es un organelo altamente dinámico en las espinas (Toresson & Grant, 2005). Esta última observación tiene mucha relevancia al momento de interpretar nuestros resultados en neuronas hipocampales, pues es posible que la menor o nula capacidad de respuesta en algunos ROIs pueda deberse a que en esas secciones no hubiera RE, y por tanto tampoco existiría RYR como para responder al estímulo oxidativo. Se hace necesario demostrar que RE está presente en todas las ROIs monitoreados.

Aunque no se ha explorado en un contexto celular si los radicales hidroxilo promueven la generación de señales de calcio, algunos autores han mostrado que la formación de los radicales hidroxilo catalizada por metales pesados mediante la reacción de Fenton, puede inducir *in vitro* la salida de calcio desde compartimentos sensibles a RY (Anzai et al., 1998; Stoyanovsky et al., 1994). Estos estudios fueron realizados en vesículas de retículo aisladas o bien en membranas artificiales reconstituidas con RYR purificados, existiendo a la fecha muy pocos estudios en células vivas que analizan la participación de radicales OH<sup>·</sup> en la regulación del calcio (Burlando & Viarengo, 2005). Al respecto, un trabajo realizado en células de hepatoma (RTH-149) mostró que los radicales OH<sup>·</sup> eran responsables de la movilización de calcio observada en sus experimentos; además, usando el sistema generador de superóxido Xantina/Xantina oxidasa (X/XO) estos autores probaron que el anión superóxido tiene un menor efecto que cuando se induce la reacción de Fenton por bajas dosis de peróxido en presencia

de metales pesados. Combinando X/XO + peróxido +  $\text{Cu}^+$  lograron un máximo en la concentración de calcio, indicando que la mezcla más eficiente fue la que favorece la reacción de Fenton. La señal de calcio inducida por ROS fue considerablemente inhibida por atrapadores del radical  $\text{OH}^\cdot$  pero no por los de anion superóxido indicando que la especie efectora es el radical  $\text{OH}^\cdot$  (Burlando & Viarengo, 2005).

La generación localizada y transitoria de ROS por sistemas intracelulares puede ser considerada como un aporte de los procesos redox a la señalización celular, siendo los ROS más estudiados el anion superóxido y el peróxido de hidrogeno (Thannickal et al., 2000). Sin embargo, en algunos estudios del efecto de ROS en señalización celular ha sido posible verificar que no son estas dos especies las efectoras finales, sino más bien que ejercen su acción a través del radical hidroxilo. Este mismo tipo de análisis puede hacerse extensivo para tratar de entender los posibles mecanismos moleculares que involucran al hierro en la regulación de la salida de calcio desde depósitos internos en neuronas y otros tipos celulares. Al respecto, en células endoteliales humanas, altas concentraciones de superóxido produjeron un aumento de calcio que fue inhibido por o-fenantrolina, un quelante de hierro, indicando que los radicales  $\text{OH}^\cdot$  generados en presencia de hierro son responsables del efecto observado (Dreher & Junod, 1995). En otro estudio realizado en vesículas de retículo sarcoplásmico de músculo de *Pecten jacobaeus*, se encontró que el  $\text{OH}^\cdot$  generado durante el ciclo redox del hierro gatilla la apertura de RYR, mientras que

el superóxido ejerce un efecto bastante más limitado (Burlando et al., 1997). El efecto del hierro fue inhibido significativamente por el ácido acetometilbutírico, un compuesto que atrapa  $\text{OH}^\cdot$ , o por rojo de rutenio, un bloqueador no totalmente específico de RYR, mostrando que las ROS generadas por hierro provocaron una apertura de RYR dependiente de radicales libres (Burlando et al., 1997).

Nuestros datos en células neuronales apoyan esta misma idea, puesto que los aumentos en la concentración de calcio inducidos por hierro (Figuras 6-9) no ocurren al prevenir o neutralizar la reacción de Fenton con DFO o manitol, respectivamente, o bien usando RY (Figuras 7 y 9). Nuestros estudios sugieren que el radical  $\text{OH}^\cdot$  generado por hierro contribuye a la estimulación de RYR como consecuencia de una modificación oxidativa, sin embargo, se desconocen los residuos aminoacídicos que estarían involucrados en estas modificaciones. En particular, muchos estudios han reportado modificaciones de Cys reactivas del RYR por compuestos redox no fisiológicos (Hidalgo et al., 2002). Estos estudios han contribuido a entender cómo ciertas modificaciones en Cys reactivas cambian la función de RYR, afectando la liberación de calcio. Las propiedades redox de algunas de las Cys de RYR le confieren la capacidad de reaccionar a cambios en el estado oxidativo, comportándose como un detector redox celular (Feng et al., 2000; Xia et al., 2000).

### **4.3. Estimulación redox de la liberación de calcio mediada por RYR.**

Se han identificado modificaciones redox por agentes endógenos de algunos residuos de Cys de RYR, como S-nitrosilación y S-glutationilación. Por ejemplo, la Cys<sup>3635</sup> es susceptible de ser nitrosilada por óxido nítrico (Sun et al., 2001) y además puede formar puentes disulfuros con otra subunidad vecina de RYR en respuesta a oxidantes (Moore et al., 1999; Zhang et al., 2003). Además, se ha propuesto que los residuos Cys<sup>4958</sup> y C<sup>4961</sup> forman un puente disulfuro (Hurne et al., 2005). La S-nitrosilación de residuos de cis incrementa la activación del RYR por calcio mientras que la S-glutationilación disminuye la inhibición del RYR por magnesio (Aracena et al., 2003); ambas modificaciones provocan una disminución de la afinidad de calmodulina (Aracena-Parks et al., 2006). En conjunto, estas modificaciones activan la liberación de calcio mediada por RYR. Por otro lado, usando espectroscopia de masa ha sido posible identificar a los residuos 1040, 1303, 2436, 2565, 2606, 2611 y 3635 como un grupo de cisteínas susceptibles a S-alquilación por derivados de coumarin maleimida (Voss et al., 2004), en tanto otros residuos se encuentran modificados en forma endógena o se modifican por S-nitrosilación o S-glutationilación (Aracena-Parks et al., 2006).

El radical OH<sup>•</sup> es una especie extremadamente reactiva que difunde sólo unos pocos Å antes de reaccionar (Symons & Gutteridge, 1998). Un posible mecanismo selectivo de activación de RYR podría ser que esta proteína tenga sitios de unión a hierro redox-activo, donde se produzca con peróxido de

hidrógeno una reacción de Fenton localizada que modifique por hidroxilación amino ácidos en la inmediata vecindad de este probable sitio de unión a hierro. Este tipo de mecanismo ha sido recientemente reportado para la activación de PerR (Lee & Helmann, 2006), un factor de transcripción que detecta peróxido y que regula los genes inducibles de defensa contra peróxido (Mongkolsuk & Helmann, 2002). El  $Fe^{2+}$  coordinado a los residuos de H35, D85, H91, H93 y D104 de la proteína PerR a través de la reacción de Fenton reacciona con el peróxido generado en el ambiente; el radical hidroxilo producido reacciona con H37 o H91 causando la activación, presumiblemente reversible, de PerR. La búsqueda de posibles sitios de unión a hierro en RYR determinará si es posible que ocurran tales mecanismos. Un análisis preliminar de la secuencia de RYR indica que esta proteína posee abundantes sitios con secuencias de unión para hierro del tipo encontrado en ferritina (Granier et al., 2003). Alternativamente, el hierro podría modificar químicamente a RYR, estimulando su actividad, a través de rutas más intrincadas, tales como estimulando la producción de óxido nítrico (Galleano et al. 2004; Xu et al. 2005) o la peroxidación lipídica (Lee et al., 2005; Yoshida et al., 2000).

#### ***4.4. Participación del RyR en funciones neuronales.***

Varias funciones neuronales requieren de un aumento transitorio de calcio (Berridge, 1998; Berridge et al., 2000); estas funciones incluyen respuestas de corto término como secreción de vesículas, así como también respuestas de mas largo término tales como PS y expresión de los genes necesarios para la

adquisición de memoria y aprendizaje (Berridge et al., 2003). Estos aumentos son iniciados por influjos de calcio a través de canales de calcio de la membrana plasmática, activados por ligandos o bien por voltaje luego de estimulación neuronal. Esta entrada de calcio estimula la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares vía CICR. Diferentes autores han reportado que CICR permite diversas respuestas neuronales (Bouchard et al., 2003; Chameau et al., 2001; Gafni et al., 2004, Meldolesi, 2001; Ouardouz et al., 2003; Pape et al., 2004; Simpson et al., 1995; Verkhratsky & Petersen, 2002;). Las neuronas ocupan este mecanismo para amplificar y propagar la señal inicial de calcio generada a nivel sináptico hacia el núcleo, activando factores de transcripción nucleares sensibles a calcio (Berridge 1998). En particular, la liberación de calcio mediada por RYR puede tener un papel importante en PS y expresión génica dependiente del factor de transcripción CREB en neuronas (Berridge, 1998; Berridge et al., 2000; Carafoli, 2002; Carrasco et al., 2004; Futatsugi et al., 1999; Verkhratsky, 2004).

A pesar de la creciente importancia para los procesos neuronales de la liberación de calcio mediada por RYR, hay limitada información sobre cómo las diferentes isoformas de RYR contribuyen a la generación y/o regulación de la señal de calcio en diversas funciones neuronales dependientes de calcio. A diferencia de lo que ocurre con las isoformas de RYR musculares, las propiedades y la regulación de RYR en cerebro han sido menos estudiadas. De las tres isoformas expresadas en diferentes regiones del cerebro, RYR2 es la más abundante (Furuichi et al., 1994; Giannini et al., 1995; Mori et al., 2000). Es

importante destacar que en CICR los RYR son activados por un aumento de la concentración citoplasmática de calcio que ocurre en presencia de concentraciones libres de ATP y magnesio en el rango sub-mM. La activación inducida por calcio y ATP de formas nativas y oxidadas del RYR de vesículas de retículo endoplasmático de cerebro de rata ha sido estudiada a nivel de canal único. Los RYR nativos de corteza de cerebros incorporados en bicapas lipídicas muestran tres diferentes dependencias por calcio (Marengo et al., 1996), que pueden ser intercambiadas a través de modificaciones del estado redox del receptor (Hidalgo et al., 2004; Marengo et al.; 1998). Estos estudios han mostrado además que el canal altamente reducido, condición en la cual muchos residuos de RYR tienen grupos sulfidrilos libres, responde pobremente a la activación por calcio. En contraste, un aumento en la oxidación/alquilación de Cys favorece la activación del receptor por calcio, pudiendo ser activados por concentraciones micromolares de calcio, además de disminuir los efectos inhibitorios en altas concentración de calcio, que se une al sitio inhibitorio de magnesio. Los agentes reductores revierten todos los cambios inducidos por oxidantes. Más aun, un canal más oxidado responde mas a la activación por ATP que un canal mas reducido (Bull et al., 2003), en tanto la activación por calcio del canal RYR en presencia de ATP y magnesio a concentraciones fisiológicas muestra aun más claramente que solamente los canales mas oxidados pueden ser activados efectivamente por una subida de calcio a concentraciones menores de 0.1 mM (Bull et al., manuscrito en preparación).

#### ***4.5. Liberación de calcio mediado por RYR en procesos sinápticos***

Nuestros datos con hierro indican que las ROS generadas por hierro estimulan la señalización de calcio mediada por RYR. Más aún, determinamos que esto también ocurre para la señal de calcio inducida por activación farmacológica de NMDAR con NMDA en neuronas hipocampales.

Además, nuestros resultados en neuronas de hipocampo en cultivo, que indican que NMDA induce señales originadas por liberación de calcio a través de RYR, son consistentes con trabajos realizados en rebanadas de hipocampo, en los cuales se ha demostrado que la estimulación eléctrica de las fibras aferentes (colaterales de Schaffer) provoca aumentos de calcio en la zona dendrítica (estrato radiata) de las neuronas CA1, que son inhibidos por antagonistas de AMPAR o NMDAR (Emptage et al., 1999). Al igual que en nuestras condiciones, estos autores evitaron la inhibición por Mg del NMDAR removiendo el Mg extracelular, y observaron que los aumentos de calcio se producían aún en presencia de antagonistas de AMPAR. Esto confirma que la función que tienen los AMPAR es inducir despolarización postsináptica, y así liberar la inhibición voltaje-dependiente que ejerce el Mg sobre los NMDAR. Estos autores también mostraron que la señal de calcio inducida por estimulación eléctrica presenta una componente importante sensible a RY, concluyendo que la entrada a través de NMDAR (componente rápida) evoca una sustancial liberación de calcio desde

depósitos internos dependientes de RYR en regiones sinápticas (Emptage et al., 2001).

Dado que las ROS se producen durante activación de NMDAR y considerando que la modulación oxidativa de RYR mediada por hierro permite la ocurrencia de señales localizadas de calcio a nivel sináptico, evaluamos si este tipo de modulación también ocurría durante actividad neuronal dependiente de NMDAR. Al preincubar neuronas hipocampales en cultivo con DFO y manitol, agentes que previenen o neutralizan la reacción de Fenton, encontramos que el segundo componente de la respuesta de calcio se vio drásticamente inhibido, observándose una respuesta similar a la obtenida en presencia de RY, lo que nos indica que los radicales libres  $\text{OH}^{\cdot}$  generados por hierro tienen un fuerte impacto en la estimulación de la liberación de calcio desde depósitos intracelulares.

La explicación a estos hechos la podemos encontrar en trabajos anteriores que muestran que al favorecer los estados reducidos de las Cys sensibles en el RYR, lo que podría suceder cuando se usa DFO o manitol, este presenta una pobre respuesta a la estimulación por calcio (Marengo et al., 1998). Probablemente, las ROS generadas por hierro permiten un entorno oxidativo favorable para que RYR pueda responder al calcio que entra a través de NMDAR. Sin embargo, para poder comprobar esta hipótesis se requiere investigar si manitol o DFO inducen cambios en el estado redox de RYR, promoviendo la reducción de estas cisteínas.

La participación de la liberación de calcio desde depósitos intracelulares en la inducción y mantención de LTP ha sido descrita por varios autores (Auerbach & Segal, 1994; Lauri et al., 2003; Lu & Hawkins, 2002; Lynch, 2004; Matias, et al., 2003; Reyes-Harde et al., 1999; Wang et al., 1996). Las modificaciones de las conexiones sinápticas dependientes de la experiencia delimitan importantes procesos neurales como aprendizaje y memoria. Estudios en distintas especies desde la mosca hasta el ratón han mostrado que la PS y la memoria poseen al menos dos fases: la PS de corto término, una fase temprana que involucra generalmente rápidas modificaciones de proteínas ya existentes, y la PS de largo término o fase tardía, que a diferencia de la anterior necesariamente requiere transcripción de genes y síntesis proteica e involucra también el desarrollo de nuevas sinapsis (Bailey & Kandel, 1993; Bayley et al., 1996). De esta forma los eventos sinápticos requeridos para la fase temprana de LTP podrían estar relacionados con los eventos sinápticos de la fase tardía de LTP por complejos sistemas de transducción de señales que convergen en el núcleo, activando la transcripción de genes involucrados en PS y que son dependientes de CREB, lo cual contribuye a la persistencia de los cambios inducidos por actividad neuronal. En otras palabras, los eventos sinápticos locales que se producen tempranamente como consecuencia de la actividad neuronal pueden tener un fuerte impacto y condicionar los eventos tardíos. Consistente con esto, usando una combinación de técnicas bioquímicas y electrofisiológicas mostramos que al interferir eventos tempranos, como prevenir la salida de calcio desde compartimentos sensibles a

RY ya sea con concentraciones inhibitorias de RY o bien cambiando el entorno oxidativo del canal previniendo o neutralizando la reacción de Fenton, fue posible observar alteraciones tanto en la activación de la vía ERK / MAPK como en LTP.

En particular, en células PC12 encontramos que el hierro produce una activación de ERK en una forma dependiente tanto de la concentración como del tiempo (Figuras 11 y 12; Muñoz et al. 2006). Además, usando una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de FeNTA, concentración que evoca aumentos en el número de eventos localizados de calcio, pudimos observar cambios en la fosforilación de ERK. Junto con esto, mostramos que estos cambios indujeron la localización nuclear de ERK, lo cual podría tener un impacto en expresión génica. Tanto la fosforilación de ERK como la translocación nuclear inducida por hierro fueron bloqueadas por DFO y manitol (Figura 13), al igual que ocurre con los eventos de calcio evocados por hierro (Figuras 6 y 7). Estos resultados indican que los radicales  $\text{OH}^\cdot$  generados por hierro están involucrados en la activación de ERK, probablemente por un mecanismo que involucra incrementos en la concentración de calcio. Más aún, la liberación de calcio desde depósitos intracelulares, mediada por RYR, quedó de manifiesto cuando RY (usada en concentraciones inhibitorias) inhibió la fosforilación de ERK inducida por hierro (Figura 14). La sensibilidad de la fosforilación de ERK a cambios en la frecuencia y amplitud de la señal de calcio había sido reportada con anterioridad, sin embargo es necesario más trabajo para entender completamente los mecanismos por los que un aumento en la concentración de calcio se transducen en la activación de ERK.

Nosotros proponemos un efecto oxidativo importante en producir los aumentos localizados de calcio mediados por RYR, que traen como consecuencia cambios en la fosforilación de ERK. Consistente con una participación de los aumentos de calcio inducidos por ROS, mostramos que favoreciendo la oxidación de RYR, por aumentos del hierro celular o por activación de los NMDAR, se produce una robusta activación de la vía ERK / MAPK. En ambos casos, al prevenir con DFO o manitol los cambios en el entorno redox de RYR producidos por ROS generados por hierro, no se detectó ni la fosforilación ni la translocación de ERK en células PC12 (Figuras 13 y 15).

Dado que se conoce que la mantención de LTP requiere expresión de genes y síntesis proteica *de novo*, condujimos experimentos en neuronas hipocampales para determinar si las ROS generadas por hierro tienen efectos a nivel transcripcional. Para esto, analizamos la activación de CREB, un factor de transcripción cuya fosforilación en su residuo Ser<sup>133</sup> se considera un evento crucial para la inducción de genes tempranos agrupados en factores inducibles como c-fos y otras proteínas efectoras como BDNF (Bitto et al., 1996; Hardingham, 2001; Xing et al., 1996). El descubrimiento que el hierro a concentraciones relativamente altas induce la fosforilación de CREB en la zona CA1 del hipocampo (Figura 24), fosforilación que fue inhibida por DFO, manitol y RY, establece una línea causal *hierro* → *OH·* → *calcio* → *ERK* → *CREB* → *regulación génica*. Estos experimentos deberán ser complementados con la identificación de los genes que responden a

esta ruta redox, ya que surge la pregunta de si son genes de respuesta a estrés o genes necesarios para la función neuronal.

Consistente con trabajos anteriores que muestran que MAPK es importante para la fosforilación tardía de CREB (Wu et al., 2001), nosotros encontramos que la activación de NMDAR produce un incremento en la fosforilación de CREB (Figura 18) que se correlacionó con un robusto aumento en la fosforilación y translocación nuclear de ERK (Figura 16). Bloqueando con RY la salida de calcio desde compartimentos sensibles a RY, o bien modificando el entorno redox, pudimos inhibir tanto la fosforilación de ERK como la de CREB indicando que ambos eventos están relacionados. Estos experimentos nos indican que CICR juega un papel muy importante en la amplificación y propagación de la señal de calcio y que el calcio que entra desde el espacio extracelular no es suficiente para activar esta vía. Este hecho es consistente con trabajos en neuronas de hipocampo de la zona CA1 que muestran que al inhibir los RYR tanto la fosforilación de CREB inducida por LTP como la LTP tardía se ven considerablemente reducidas (Lu & Hawkins, 2002).

#### ***4.6. Hierro en Plasticidad sináptica.***

El hierro es un elemento traza esencial que necesita estar presente en la dieta humana para mantener funciones fisiológicas normales. El hierro es esencial para el normal funcionamiento neuronal. La necesidad de cantidades óptimas de

hierro para el desarrollo cognitivo ha sido bien establecida (Beard & Connor, 2003). En humanos, una deficiencia de hierro (DH) durante la infancia se asocia a un bajo puntaje en tareas de aprendizaje tales como pruebas motoras y/o conductuales (Grantham-McGregor & Ani, 2001; Lozoff et al., 1991). No obstante esta esencialidad, los mecanismos por los que el hierro promueve una normal función neuronal, y los blancos moleculares involucrados en este proceso, son prácticamente desconocidos.

Nosotros encontramos que rebanadas de hipocampo provenientes de ratas y ratones con niveles normales de hierro durante su estado embrionario y postnatal, incubadas con el quelante de hierro DFO, fueron afectadas en la plasticidad de largo término (LTP) pero no en la plasticidad de corto término como PPF. Estos descubrimientos suministran una comprobación funcional a las anomalías estructurales y bioquímicas encontradas en hipocampos de ratas con DH (Jorgenson et al., 2005) y además permiten explicar los déficit de aprendizaje y memoria encontradas en humanos y animales expuestos a DH fetal y postnatal (Felt et al., 2006). Al respecto, se ha mostrado que la DH en el periodo perinatal produce alteraciones en un paradigma de aprendizaje dependiente del hipocampo en ratas (McEchron & Paronish, 2005).

Usando una estimulación basal por pulsos pareados, que no genera un efecto por sí sola en la transmisión sináptica basal, logramos mostrar que la depleción aguda de hierro disminuye la respuesta basal. Al lavar el quelante de

hierro se observó una recuperación parcial de la respuesta, sin embargo esta permaneció atenuada en el tiempo. La razón para esta falta de recuperación total es desconocida, pero podría deberse a la depleción de un pool de hierro necesario para la respuesta basal. El efecto de disminución no fue observado cuando la aplicación de DFO fue realizada en ausencia de actividad eléctrica, o bien cuando se aplicó en presencia de actividad eléctrica y de un antagonista de NMDAR (APV). Estos resultados son difíciles de interpretar. En su forma más general indican que la depresión inducida por DFO no es debida a la molécula de DFO en sí, si no más bien a una alteración en la funcionalidad de la sinapsis durante la actividad neuronal. Considerando que DFO inhibió la liberación de calcio inducida por activación de NMDAR en neuronas hipocampales en cultivo, podemos suponer que DFO puede ejercer una acción similar en rebanadas, de tal forma que la componente lenta de la señal de calcio inducida durante el pulso pareado puede estar inhibida en presencia de DFO. La consecuencia bioquímica de esta inhibición para las señales de calcio a nivel sináptico probablemente sea que las concentraciones de calcio alcanzadas solamente por entrada de calcio no alcancen los niveles requeridos para activar la vía ERK, y debido a que el aumento de calcio en estas condiciones es transitorio y no sostenido, se activan sólo proteínas con alta sensibilidad por calcio, como son las proteínas fosfatasas (Bradshaw et al., 2003; Lisman, 1989). En este contexto se ha descrito que la sola activación de fosfatasas está asociada a una depresión sináptica (Bear & Abraham, 1996; Klann, 1999).

En otro grupo de experimentos, usando similar estimulación por pulsos pareados pero en presencia de una alta concentración de hierro, observamos inducción de una potenciación tipo LTP de la respuesta sináptica en el *estratum radiatum* de la región de CA1, que fue evocada solamente por estimulación con pulsos pareados en las colaterales de Schaffer. El efecto de altas concentraciones de hierro fue inhibido en rebanadas cargadas con DFO, indicando que este es un efecto específico del hierro. Mas aún, mostramos que el hierro junto con inducir aumentos en los fEPSP, aumentó la fosforilación de ERK en la zona CA1 del hipocampo, lo cual indica que el estímulo oxidativo mediado por hierro provocó cambios postsinápticos en vías claves para la inducción y mantención de LTP. De hecho, encontramos una fuerte correlación entre la activación de ERK y los cambios en los fEPSP en ausencia o presencia de DFO, indicando que las ROS generadas por hierro podrían jugar un papel importante a nivel sináptico, favoreciendo la instauración de fenómenos plásticos. Además, el uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente inductor agudo nos permitió confirmar la regulación redox de esta vía de señalización en rebanadas, por un mecanismo que probablemente involucra la salida de calcio desde depósitos sensibles a RY. Nuestros resultados concuerdan con otros trabajos que muestran que un estímulo oxidativo, como la aplicación de sistema generadores de superóxido, por sí solo es capaz de inducir una potenciación de la transmisión sináptica dependiente de la activación de cascadas de señalización, como PKC (Knapp & Klann, 2002).

Con los experimentos anteriores y los realizados en cultivo celular, se ha demostrado que el hierro tiene un fuerte impacto en la activación de vías de señalización importantes para PS, como la vía ERK / MAPK. Al explorar si la ausencia de hierro puede tener impacto en PS que dependen de la activación de ERK, como la LTP inducida por un clásico protocolo de estimulación de alta frecuencia, encontramos que rebanadas cargadas previamente con DFO (en ausencia de actividad eléctrica) no cambiaban su transmisión sináptica basal (PPF) pero la LTP inducida por cuatro TBS decaía rápidamente hacia valores basales. Al igual que el aumento de la transmisión sináptica inducida por hierro que involucra activación de ERK, nuestros resultados estimulando farmacológicamente los NMDAR con NMDA sugieren fuertemente que el hierro puede participar en la activación de ERK por un posible mecanismo oxidativo sobre el RYR, activación que resulta crucial para la inducción, expresión y mantención de LTP. Por otro lado, ha quedado demostrado que el aumento en la fosforilación de ERK y CREB inducido por hierro se debió a un efecto oxidativo mediado por la reacción de Fenton. Consistente con una posible modulación redox del RYR en la región de CA1 del hipocampo, bloqueando RYR durante la estimulación tetánica se reduce significativamente la LTP inducida por oxido nítrico, junto con disminuir la fosforilación de CREB en rebanadas de hipocampo (Lu & Hawkins, 2002). Si bien es necesario demostrar que bloqueando la activación de ERK, ya sea por concentraciones inhibitorias de RY o cambiando el entorno redox del canal, la potenciación inducida por hierro es también bloqueada, los datos obtenidos en neuronas cultivadas apuntan hacia esa posibilidad.

Nuestros resultados apuntan a un posible mecanismo de regulación postsináptico de la inducción de LTP, no obstante, se ha reportado también un efecto presináptico en la misma región del hipocampo (Reyes-Harde et al., 1999). En este caso, se sugiere la contribución del calcio proveniente desde compartimentos sensibles a RY debido a la inhibición observada en presencia de concentraciones inhibitorias de RY. Además, es posible observar un desplazamiento desde LTD hacia LTP cuando se usan bajas concentraciones (estimuladoras) de RY en el giro dentado, indicando la importancia que juega la liberación de calcio desde estos depósitos durante LTP (Wang et al. 1996). La activación presináptica de RYR contribuye también a la generación de LTP cuando se estimulan las fibras musgosas del hipocampo. Esta forma de LTP es independiente de NMDAR y es generada a través de la interacción de cafeína con receptores purinérgicos y RYR, resultando en un aumento del calcio en el terminal presináptico, lo que aumenta la liberación de neurotransmisores (Lauri et al., 2003).

En síntesis, demostramos que la transmisión sináptica de la región CA1 del hipocampo es significativamente modulada por hierro. Este descubrimiento agrega a la compleja relación existente entre hierro y ROS, debido a la capacidad que tiene el hierro de participar en reacciones pro-oxidantes. Nosotros junto a otros autores (Núñez et al., 2004; Price et al., 2003) hemos establecido que se requiere un estado redox celular óptimo para el normal funcionamiento celular. De hecho,

en nuestro laboratorio hemos encontrado que disminuyendo el contenido de hierro en células SHSY5Y el potencial de membrana decae, así como también la amplitud de las corrientes evocadas por pulsos despolarizantes (Mura et al., 2006). De esta forma, aunque hemos mostrado que el hierro es esencial para el funcionamiento neuronal normal, una acumulación de hierro puede generar daño. La respuesta inicial a una sobrecarga de hierro es un aumento de los niveles de ROS y una disminución del contenido de GSH, lo cual resulta en una caída del potencial de reducción dado por el par GSH/GSSG (Núñez et al., 2004). Los cambios resultantes en el potencial de reducción, a valores de -300 mV, producen una masiva muerte celular aunque una fracción de las neuronas logra adaptarse cambiando sus niveles de GSH intracelular (Aguirre et al., 2006).

## 5. CONCLUSIONES FINALES

En este trabajo hemos entregado evidencias que demuestran que en células PC12 y en cultivo primario de neuronas de hipocampo existe una *interacción entre ROS mediadas por hierro y las señales de calcio* de tal forma que:

- La activación de NMDAR induce entrada de calcio y se asocia a la producción de ROS.
- La señal de calcio evocada por activación de NMDAR, es modulada por ROS generadas por hierro.
- Las ROS generadas por hierro inducen la salida de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY.

Por otro lado, demostramos que esta interacción entre ROS mediada por hierro y las señales de calcio tienen una consecuencia celular, que condiciona la actividad de la vía sensible a calcio MAPK/ERK/CREB, puesto que:

- Las ROS generadas por hierro inducen fosforilación de ERK, siendo la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares sensibles a RY inducida por hierro crucial para la activación de la vía MAPK/ERK.

- El calcio liberado desde reservorios intracelulares sensibles a RY es crítico en la activación de ERK dependiente de NMDAR.
- La activación de ERK dependiente de NMDAR requiere un tono redox permisivo mediado por hierro.
- NMDA induce activación de la vía MAPK/ERK/CREB en neuronas hipocampales, mediante un proceso que involucra ROS generadas por hierro y RYR.

Finalmente, demostramos que en rebanadas de hipocampo, hierro es un elemento importante en eventos relacionados con PS (LTP o LTD), modulando la dirección de la eficiencia sináptica, donde incubaciones con hierro favorece la instauración de LTP mientras que su déficit favorece LTD:

- Desferroxamina induce depresión en la respuesta sináptica de la zona CA1 frente a estimulación en la zona CA3.
- El hierro favorece e induce un aumento de la transmisión sináptica en la zona CA1 del hipocampo.

- Efecto oxidativo del hierro en la activación de ERK y CREB dependiente de NMDAR, en la zona CA1 del hipocampo.
- ROS generadas por hierro inducen fosforilación de ERK y CREB en la zona CA1 del hipocampo.

## REFERENCIAS.

Adams, J., and Sweatt, D. (2002) Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase in Memory. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**: 135-63.

Akopian, G., and Walsh, J.P. (2006) Pre- and postsynaptic contributions to age-related alterations in corticostriatal synaptic plasticity. *Synapse.* **60(3)**:223-238

Aguirre, P., Mena, N., Tapia, V., Rojas, A., Arredondo, M., and Núñez, M.T. (2006) Antioxidant responses of cortex neurons to iron loading. *Biol Res.* **39**: 103-104.

Ali, F.E., Leung, A., Cherny, R.A., Mavros, C., Barnham, K.J., Separovic, F., and Barrow, C.J. (2006) Dimerisation of N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester and Abeta peptides via formation of dityrosine . *Free Radic. Res.* **40(1)**:1-9.

Anzai, K., Ogawa, K., Kuniyasu, A., Ozawa, T., Yamamoto, H., and Nakayama, H. (1998) Effects of Hydroxyl Radical and Sulfhydryl Reagents on the Open Probability of the Purified Cardiac Ryanodine Receptor Channel Incorporated into Planar Lipid Bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**:938–942.

Aracena, P., Sánchez, G., Donoso, P., Hamilton, S. and Hidalgo, C. (2003). S-Glutathionylation Decreases  $Mg^{2+}$  Inhibition and S-Nitrosylation Enhances  $Ca^{2+}$  Activation of RyR1 Channels. *J. Biol. Chem.* **278**: 42927 – 42935.

Aracena-Parks, P., Goonasekera, S.A., Gilman, C., Dirksen, R.T., Hidalgo, C., and Hamilton, S.L. (2006) Identification of cysteines Involved in S-nitrosylation, S-glutathionylation, and oxidation to disulfides in RyR1. *J Biol Chem.* Oct 27; [Epub ahead of print].

Atkins, C.M., Selcher, J.C., Petraitis, J.J., Trzaskos, J.M., and Sweatt, J.D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat. Neurosci.* **1**: 602–609.

Babior, B.M. (2004) NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* **16**: 42– 47.

Baker, K.B., and Kim, J.J. (2002) Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn Mem.* **9(2)**:58-65.

Banci, L., Bertini, I., Cabelli, D.E., Getzoff, E.D., Hallewel, R.A. & Viezzoli, M.S. (1993). An essential role for the conserved Glu-133 in the anion interaction with superoxide dismutase. *J. Inorg. Biochem.* **50**:89-100.

Banko, J.L., Hou, L., and Klann, E. (2004) NMDA receptor activation results in PKA- and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1. *J Neurochem.* **2**:462-470.

- Bardo, S., Cavazzini, M.G., and Emptage, N. (2006) The role of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  store in the plasticity of central neurons. *Trends Pharmacol Sci.* **27**(2):78-84.
- Bear, M.F., and Abraham, W.C. (1996) Long-term depression in hippocampus. *Annu Rev Neurosci.* **19**:437-62.
- Beard, J.L. and Connor, J.R. (2003) Iron status and neural functioning. *Ann Rev Nutr.* **23**: 41-58.
- Bender, V.A., Bender, K.J., Brasier, D.J., and Feldman, D.E. (2006) Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J Neurosci.* **26**(16):4166-77.
- Bennett, D.L., Bootman, M.D., Berridge, M.J., and Cheek, T.R. (1998).  $Ca^{2+}$  entry into PC12 cells initiated by ryanodine receptors or inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochem. J.* **329**:349-357.
- Berg, D, Gerlach, M., Youdim, M.B., Double, K.L., Zecca, L., Riederer, P., and Becker, G. (2001) Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.* **79**:225-36.
- Berridge, M.J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signaling. *J. Physiol.* **499**:291-306.
- Berridge, M. J. (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**:13-26.
- Berridge, M., Lipp, P., and Bootman, M. (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nature Reviews* **1**:11-21.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2003) Calcium signaling; dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:517-529.
- Bielski, B.H. and Allen, A.O. (1977) Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals. *J.Phys. Chem.* **81**: 1048-1050.
- Bielski, B.H. and Cabelli, D.E. (1991) Highlights of current research involving superoxide and perhydroxyl radicals in aqueous solution. *Int. J. Radiat. Biol.* **59**:291-319.
- Bielski, B.H., Cabelli, D.E., Arudi, R.L., and Ross, A.B. (1985) Reactivity of  $HO^2/O^{2-}$  radicals in aqueous solution. *J.Phys. Chem.Ref.Data.* **14**: 1041-1100.
- Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C., and Miller, R.J. (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J*

*Neurosci.* **16**:1324–1336.

Biondi, R., Ambrosio, G., Liebgott, T., Cardounel, A.J., Bettini, M., Tritto, I., and Zweier, J.L. (2006) Hydroxylation of D-phenylalanine as a novel approach to detect hydroxyl radicals: application to cardiac pathophysiology. *Cardiovasc. Res.* **71**(2):322-30.

Blum, S., Moore, A., Adams, F., and Dash, P. (1999) A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *J.Neurosci.* **19**(9):3535-3544.

Bolann, B.J., Henriksen, H., and Ulvik, R.J. (1992) Decay kinetics of O<sub>2</sub><sup>-</sup> studied by direct spectrophotometry. Interaction with catalytic and non-catalytic substances. *Biochim. Biophys.Acta.* **1156**: 27-33.

Bootman, M.D., and Berridge, M.J. (1995). The elemental principles of calcium signaling. *Cell.* **83**:675–678.

Bornfeldt, K. (2000) Stressing Rac, Ras, and Downstream Heat Shock Protein 70. *Circ. Res.* **86**:1101-1103.

Botreau, F., and Gisquet-Verrier, P. (2006) Memory reactivation, dissociated from behavioural expression, decreases ERK phosphorylation in the rat prefrontal cortex and amygdala. *Behav Brain Res.* **169**(1):176-80.

Bouchard, R., Pattarini, R., and Geiger, J.D. (2003) Presence and functional significance of presynaptic ryanodine receptors. *Prog. Neurobiol.* **69**:391–418.

Bradford, M.M. (1976) A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

Bradshaw, J.M., Kubota, Y., Meyer, T., and Schulman, H. (2003) An ultrasensitive Ca<sup>2+</sup> / calmodulin-dependent protein kinase II- protein phosphatase 1 switch facilitates specificity in postsynaptic calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**(18): 10512-10517.

Brambilla, R., Gnesutta, N., Minichiello, L., White, G., Roylance, A.J., Herron, C.E., Ramsey, M., Wolfer, D.P., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Grant, S.G., Chapman, P.F., Lipp, H.P., Sturani, E., and Klein, R. (1997). A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory. *Nature.* **390**:281–286.

Brewer, G. (2000) Neuronal Plasticity and stressor toxicity during aging. *Exp.Gerontol.* **35**:1165-83.

Brini, M., and Carafoli, E. (2000) Calcium signaling: a historical account, recent

developments and future perspectives. *Cell. Mol.Life.Sci.* **57**:354-370.

Bull, C., and Fee, J.A. (1985). Steady-state kinetic studies of superoxide dismutases: Properties of the iron containing protein from *Escherichia coli*. *J.Am.Chem.Soc.* **107**:3295-3304.

Bull, R., Marengo, J.J., Finkelstein, J.P., Behrens, M. I. and 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.

Burlando, B., Panfoli, I., Viarengo, A. and Marchi, B. (2001) Free Radical-Dependent Ca<sup>2+</sup> Signaling: Role of Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release. *Antioxid. Redox Signal.* **3**:525–530.

Burlando, B., Viarengo, A., Pertica, M., Ponzano, E., and Orunesu, M. (1997) Effects of free oxygen radicals on Ca<sup>2+</sup> release mechanisms in the sarcoplasmic reticulum of scallop (*Pecten jacobaeus*) adductor muscle. *Cell Calcium.* **22**: 83–90.

Calabrese, V., Lodi, R., Tonon, C., D'Agata, V., Sapienza, M., Scapagnini, G., Mangiameli, A., Pennisi, G., Stella, A.M., and Butterfield, D.A. (2005) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci.* **233**(1-2):145-62.

Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, F.J., Pozo, M.J., and Camello, P. (2006) Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* **291**(5):C1082-1088.

Cannich, A., Wotjak, C.T., Kamprath, K., Hermann, H., Lutz, B., and Marsicano, G. (2004) CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem.* **11**(5):625-32.

Canon, E., Cosgaya, J.M., Scsucova, S., Aranda, A. (2004) Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell.* **15**(12):5583-92.

Carafoli, E. (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **99**:1115–1122.

Carrasco, M.A., Jaimovich, E., Kemmerling, U. and Hidalgo, C. (2004) Signal transduction and gene expression regulated by calcium release from internal stores in excitable cells. *Biol. Res.* **37**:701–712.

Castagne, V., Gautschi, M., Lefevre, K., Posada, A., and Clarke, G. (1999) Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. *Prog. Neurobiol.* **59**:397-423.

Chameau, U.P., Van, D.V., Fossier, P., and Baux, G. (2001) Ryanodine-, IP3- and NAADP-dependent calcium stores control acetylcholine release. *Pflugers Arch.* **443**:289–296.

Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **59**(3):527-605.

Chavis, P., Fagni, L., Lansman, J.B. and Bockaert, J. (1996) Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature.* **382**:719–722.

Chen, C., and Tonegawa, S. (1997) Molecular Genetic Analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**:157–84.

Cheng, H., Song, L.S., Shirokova, N., Gonzalez, A., Lakatta, E.G., Rios, E., and Stern, M.D. (1999) Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. *Biophys J.* **76**(2):606-617.

Chiarugi, P. (2003) Reactive oxygen species as mediators of cell adhesion. *Ital.J Biochem.* **52**(1):28-32.

Chignell, C.F., and Sik, R.H. (2003) A photochemical study of cells loaded with 2V,7V-dichlorofluorescein: implications for the detection of reactive oxygen species generated during UVA irradiation. *Free Radic Biol Med.* **34**: 1029– 34.

Chwang, W.B., O'riordan, K.J., Levenson, J.M., Sweatt, J.D. (2006) ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem.* **13**(3):322-8.

Collingridge, G., and Bliss, T. (1995) Memory of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci.* **18**: 54-56.

Coelho, S.M., Taylor, A.R., Ryan, K.P., Sousa-Pinto, I., Brown, M.T., and Brownlee, C. (2002) Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca(2+) wave propagation in fucus rhizoid cells. *Plant Cell* **14**(10):2369-81.

Coyle, J.T., and Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* **262**(5134):689-95.

Cross, A.R., and Segal, A.W. (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim. Biophys. Acta.* **1627**: 1 – 22.

Crossthwaite, A., Hasan, S., and Williams, R. (2002) Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK I/II, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca<sup>2+</sup> and PI3-kinase. *J.Neurochem.* **80**: 24-35.

Crow, J.P. (1997) Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide.* **1**:145 – 57.

De Crescenzo, V., ZhuGe, R., Velazquez-Marrero, C., Lifshitz, L.M., Custer, E., Carmichael, J., Lai, F.A., Tuft, R.A., Fogarty, K.E., Lemos, J.R., and Walsh, J.V. (2004) Ca<sup>2+</sup> syntillas, miniature Ca<sup>2+</sup> release events in terminals of hypothalamic neurons, are increased in frequency by depolarization in the absence of Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Neurosci.* **24(5)**:1226–1235.

Dajas-Bailador, F., Soliakov, L., and Wonnacott, S. (2002) Nicotine activates the extracellular signal-regulated kinase 1/2 via the  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor and protein kinase A, in PC-12 cells and hippocampal neurones. *J Neurochem.* **80**: 520-30.

Dalton, T., Shetzer, H. and Puga, A. (1999) Regulation of gene expression by Reactive oxygen. *Annu.Rev. Pharmacol.Toxicol.* **39**: 67-101.

Deisseroth, K., and Tsien, R. (2002) Dynamic Multiphosphorylation Password for Activity-dependent Gene expression. *Neuron.* **34**:179-182.

Deora, A., Win, T., Vanhaesebroeck, B., and Lander, H. (1998) A redox-triggered Ras- Effector Interaction. *J.Biol.Chem.* **273**: 29923-29928.

Dreher, D., and Junod, A.F. (1995) Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **162**: 147–153.

Droge, W. (2001) Free radical in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol.Rev.* **82**: 47-95.

Duguid, I., and Sjostrom, P.J. (2006) Novel presynaptic mechanisms for coincidence detection in synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* **16(3)**:312-22.

Dugan, L., Creedon, D., Johnson, E and Holtzman, D. (1997) Rapid suppression of free radical formation by nerve growth factor involves the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad.Sci.* **94**: 4087-4091.

Eden, A.N. (2005) Iron deficiency and impaired cognition in toddlers: an underestimated and undertreated problem. *Paediatr Drugs* **7**: 347-52.

Egaña, J.T., Zambrano, C., Nunez, M.T., Gonzalez-Billault, C., and Maccioni,

R.B. (2003) Iron-induced oxidative stress modify tau phosphorylation patterns in hippocampal cell cultures. *Biometals*. **16(1)**:215-23.

Ekinci, F., Malik, K., and Shea, T. (1999) Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to  $\beta$ -amyloid. *J. Biol. Chem.* **274**: 30322-327.

Ellerby, L.M., Cabelli, D.E., Graden, J.A., and Valentine, J.S. (1996) Copper-zinc superoxide dismutase: Why not pH-dependent? *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 6556-6561.

Emptage, N.J., Reid, C.A., and Fine, A. (2001) Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron*. **29(1)**:197-208.

Emptage, N., Bliss, T., and Fine, A. (1999) Single Synaptic Events Evoke NMDA Receptor-Mediated Release of Calcium from Internal Stores in Hippocampal Dendritic Spines. *Neuron*. **22**:115-124.

English, J., and Sweatt, D. (1997) A requirement for the mitogen -activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.* **272**: 19103-19106.

Eu, J.P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J.S., and Meissner, G. (2000) The skeletal muscle calcium release channel: coupled O<sub>2</sub> sensor and NO signaling functions. *Cell* **102**: 499-509.

Fanselow, M.S., Kim, J.J., Yipp, J., and De Oca, B. (1994) Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. *Behav. Neurosci.* **108**: 235-240.

Felt, B.T., Beard, J.L., Schallert, T., Shao, J., Aldridge, J.W., Connor, J.R., Georgieff, M.K., Lozoff, B. (2006) Persistent neurochemical and behavioral abnormalities in adulthood despite early iron supplementation for perinatal iron deficiency anemia in rats. *Behav Brain Res.* **171(2)**:261-70.

Feng, W., Liu, G., Allen, P.D., and Pessah, I. N. (2000) Transmembrane redox sensor of ryanodine receptor complex. *J. Biol. Chem.* **275**:35902-35907.

Fernaesus, S., Reis, K., Bedecs, K., and Land, T. (2005) Increased susceptibility to oxidative stress in scrapie-infected neuroblastoma cells is associated with intracellular iron status. *Neurosci Lett.* **389(3)**:133-6.

Finkbeiner, S., and Greenberg, M. (1996)  $\text{Ca}^{+2}$  -dependent routes to ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? *Neuron*. **16**:

233-236.

Fill, M., and Copello, J.A. (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* **82**(4):893-922.

Franks, K.M., and Sejnowski, T.J. (2002) Complexity of calcium signaling in synaptic spines. *BioEssays.* **24**:1130-1144.

Furuichi, T., Furutama, D., Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H. & Mikoshiba, K. (1994) Multiple types of ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J. Neurosci.* **14**: 4794-4805.

Futatsugi, A., Kato, K., Ogura, H., Li, S. T., Nagata, E., Kuwajima, G., Tanaka, K., Itohara, S., and Mikoshiba, K. (1999) Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *Neuron.* **24**: 701-713.

Gafni, J., Wong, P.W., and Pessah, I.N. (2004) Non-coplanar 2,20,3,50,6-pentachlorobiphenyl (PCB 95) amplifies ionotropic glutamate receptor signaling in embryonic cerebellar granule neurons by a mechanism involving ryanodine receptors. *Toxicol. Sci.* **77**: 72-82.

Gall, D., Prestori, F., Sola, E., D'Errico, A., Roussel, C., Forti, L., Rossi, P. and D'Angelo, E. (2005) Intracellular Calcium Regulation by Burst Discharge Determines Bidirectional Long-Term Synaptic Plasticity at the Cerebellum Input Stage. *J. Neuroscience.* **25**(19):4813- 4822

Galleano, M., Simontacchi, M., and Puntarulo, S. (2004) Nitric oxide and iron: effect of iron overload on nitric oxide production in endotoxemia. *Mol Aspects Med.* **25**: 141-154.

Garaschuk, O., Yaari, Y., and Konnerth, A. (1997). Release and sequestration of calcium by ryanodine-sensitive stores in rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* **502**: 3-30.

Getzoff, E.D., Cabelli, D.E., Fisher, C.L., Parge, H.E., Viezzoli, M.S., Banci, L., and Hallewell, R.A. (1992). Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature.* **358**: 347-351.

Giannini, G., Conti, A., Mammarella, S., Scrobogna, M. and Sorrentino, V. (1995) The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J. Cell Biol.* **128**: 893-904.

Gould, T.J., and Lewis, M.C. (2005) Coantagonism of glutamate receptors and

nicotinic acetylcholinergic receptors disrupts fear conditioning and latent inhibition of fear conditioning. *Learn Mem.* **12(4)**:389-98.

Granier, T., Langlois d'Estaintot, B., Gallois, B., Chevalier, J.M., Precigoux, G., Santambrogio, P., and Arosio, P. (2003) Structural description of the active sites of mouse L-chain ferritin at 1.2 Å resolution. *J Biol Inorg Chem.* **8(1-2)**:105-11.

Grantham-McGregor, S., and Ani, C. (2001) A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J Nutr.* **131**:649S–668S.

Green, K. And Peers, C. (2000) Divergent pathways account for two distinct effects of amyloid  $\beta$  peptides on exocytosis and  $\text{Ca}^{+2}$  currents: involvement of ROS and NF- $\kappa$ B. *J. Neurochem.* **81**:1043-1051.

Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **73(7)**:2424-2428.

Griendling, K., Sorescu, D., Lassegue, B and Ushio-Fukai, M. (2000) Modulation of Protein Kinase Activity and Gene Expression by Reactive Oxygen Species and Their Role in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20(10)**: 2175-2183.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440–450.

Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* **899**: 136-147.

Guyton, K., Liu, Y., Gorospe, M., and Holbrook, N. (1996) Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . *J. Biol. Chem.* **271**:4138-4142.

Hauptmann, N., and Cadenas, E. (1997) The oxygen paradox: Biochemistry of active oxygen. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, edited by Scandalios JG. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 1-20.

Hamilton, S.L. (2005) Ryanodine receptors. *Cell Calcium.* **38(3-4)**:253-60.

Hentze, M.W., and Kühn, L.C. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8175-8182.

Hidalgo, C. (2005) Cross talk between  $\text{Ca}^{2+}$  and redox signalling cascades in

muscle and neurons through the combined activation of ryanodine receptors/Ca<sup>2+</sup> release channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **360(1464)**:2237-46.

Hidalgo, C., Bull, R., Carrasco, M.A. and Donoso, P. (2004) Redox regulation of RYR-mediated Ca<sup>2+</sup> release in muscle and neurons. *Biol. Res.* **37**: 539–552.

Hidalgo, C., Carrasco, M.A., Muñoz, P., and Núñez, M.T. (2006) Role for reactive oxygen/nitrogen species and iron on neuronal synaptic plasticity. *Antioxid. Redox Signaling*, in Press.

Hidalgo, C., Donoso, P., and Carrasco, M.A. (2005) The ryanodine receptors Ca<sup>2+</sup> release channels: cellular redox sensors? *IUBMB Life.* **57(4-5)**:315-22.

Hu, D., Serrano, F., Oury, T.D., and Klann, E. (2006) Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J Neurosci.* **26(15)**:3933-41.

Hu, Q., Yu, Z., Ferrans, V., Takeda, K., Irani, K., and Ziegelstein, R. (2002) Critical Role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in Generating Ca<sup>+2</sup> oscillations in Human aortic Endothelial Cells stimulated by Histamine. *J. Biol.Chem.* **277**: 32546-51.

Hubert, N., and Hentze, M.W. (2002) Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 12345-12350.

Hugues, S., Chessel, A., Lena, I., Marsault, R., and Garcia, R. (2006) Prefrontal infusion of PD098059 immediately after fear extinction training blocks extinction-associated prefrontal synaptic plasticity and decreases prefrontal ERK2 phosphorylation. *Synapse.* **60(4)**:280-287.

Hurne, A., O'Brien, J., Wingrove, D., Cherednichenko, G., Allen, P., Beam, K., and Pessah, I. (2005). Ryanodine Receptor Type 1 (RYR1) Mutations C4958S and C4961S Reveal Excitation-coupled Calcium Entry (ECCE) Is Independent of Sarcoplasmic Reticulum Store Depletion. *J. Biol. Chem.* **280**: 36994 – 37004.

Impey, S., Obrietan, K. and Storm, D. (1999) Making New Connections: Role of Role of ERK/MAP Kinase Signaling in Neuronal Plasticity. *Neuron.* **23**:11-14.

Impey, S and Goodman, R. (2001) CREB signaling-Timing is everything. *Sci STKE.* **2001(82)**:PE1.

Irani, K. (2000) Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. *Circ. Res.* **87**: 179-183.

Ischiropoulos, H. (2001) Reactive Species and signal transduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **280**: L583-584.

Ismailov, I., Kalikulov, D., Inoue, T., and Friedlander, M.J. (2004) The Kinetic Profile of Intracellular Calcium Predicts Long-Term Potentiation and Long-Term Depression. *J.Neurosci.* **24(44)**:9847-9861.

Jellinger, K.A. (1999) The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging.* **14(2)**:115-40.

Jia, Z., Lu, Y., Henderson, J., Taverna, F., Romano, C., Abramow-Newerly, W., Wojtowicz, J.M., and Roder, J. (1998) Selective abolition of the NMDA component of long-term potentiation in mice lacking mGluR5. *Learn. Mem.* **5(4)**:331-43.

Johnston, D., Christie, B.R., Frick, A., Gray, R., Hoffman, D.A., Schexnayder, L.K., Watanabe, S., and Yuan, L.L. (2003) Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.* **B358**: 667-674.

Jorgenson, L.A., Sun, M., O'Connor, M., and Georgieff, M.K. (2005) Fetal iron deficiency disrupts the maturation of synaptic function and efficacy in area CA1 of the developing rat hippocampus. *Hippocampus.* **15(8)**:1094-102.

Jung, T., Engels, M., Kaiser, B., and Grune, T. (2005) Distribution of oxidized and HNE-modified proteins in U87 cells. *Biofactors.* **24(1-4)**:165-70.

Kakhlon, O.R., and Cabantchik, Z.I. (2002) The labile iron pool: Characterization, measurement and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol.Med.* **33(8)**:1037-1046.

Kamsler, A., and Segal, M. (2004) Hydrogen peroxide as a diffusible signal molecule in synaptic plasticity. *Mol Neurobiol.* **29(2)**:167-78.

Kamsler, A., and Segal, M. (2003a) Hydrogen Peroxide Modulation of Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* **23**: 269-276.

Kamsler, A., and Segal, M. (2003b) Paradoxical actions of hydrogen peroxide on long-term potentiation in transgenic superoxide dismutase-1 mice. *J Neurosci.* **23(32)**:10359-67.

Kandel, E.R., and Schwartz, J.H. (1982) Molecular biology of learning: modulation of trans-mitter release. *Science.* **218**:433-43.

Kanterewicz, B.I., Knapp, L.T., and Klann, E. (1998) Stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases by reactive oxygen species and nitric oxide in hippocampus. *J.Neurochem.* **70**:1009 -1016.

- Kelleher, R.J., Govindarajan, A., Jung, H.Y., Kang, H., and Tonegawa, S. (2004) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*. **116**(3):467-79.
- Kemmerling, U., Muñoz, P., Muller, M., Sanchez, G., Aylwin, M.L., Klann, E., Carrasco, M.A., Hidalgo, C. (2006) Ryanodine receptors mediate hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2A cells and hippocampal neurons. *Cell Calcium*, Oct 28; [Epub ahead of print].
- Kim, H.S., Jang, H.J., Cho, K.H., June Hahn, S., Kim, M.J., Hee Yoon, S., Jo, Y.H., Kim, M.S., and Rhie, D.J. (2006) Serotonin inhibits the induction of NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the rat primary visual cortex. *Brain Res*. **1103**(1):49-55.
- Kirkwood, A., Rioult, M.C., and Bear, M.F. (1996) Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex. *Nature*. **381**(6582):526-528.
- Kirkwood, A., Rozas, C., Kirkwood, J., Perez, F., and Bear, M.F. (1999) Modulation of long-term depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. *J Neurosci* **19**:1599–1609.
- Kishida, K.T., Pao, M., Holland, S.M., and 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. (1998) Cell-permeable scavengers of superoxide prevent long term potentiation in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol*. **80**: 452–457.
- Klug, D., Fridovich, I., and Rabani, J. (1972) A direct demonstration of the catalytic action of superoxide through the use of pulse radiolysis. *J.Biol.Chem*. **247**: 4839- 4842.
- Knapp, L. and Klann, E. (2002) Potentiation of Hippocampal Synaptic Transmission by Superoxide Requires the Oxidative activation of Protein Kinase C. *J. Neurosc*. **22**: 674-683.
- Koizumi, S., Bootman, M., Bobanovic, L., Schell, M., Berridge, M., and Lipp, P. (1999) Characterization of Elementary Ca<sup>2+</sup> Release Signals in NGF-Differentiated PC12 Cells and Hippocampal Neurons. *Neuron*. **22**: 125–137.
- Korkotian, E., and Segal, M. (1999) Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**(21):12068-72.
- Korkotian, E., Segal, M. (2006) Spatially confined diffusion of calcium in

dendrites of hippocampal neurons revealed by flash photolysis of caged calcium. *Cell Calcium*. **40(5-6)**:441-9.

Kornhauser, J., Cowan, C., Shaywitz, A., Griffith, E., Dolmetsch, E., Hu, L., Haddad, C., Xia, Z. and Greenberg, M. (2002) CREB transcriptional activity in Neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron*. **4**: 221-233.

Kubota, M., Narita, K., Murayama, T., Suzuki, S., Soga, S., Usukura, J., Ogawa, Y., and Kuba, K. (2005) Type-3 ryanodine receptor involved in  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release and transmitter exocytosis at frog motor nerve terminals. *Cell Calcium*. **38(6)**:557-67.

Kuperstein, F., and Yavin, E. (2002) ERK activation and nuclear translocation in amyloid- $\beta$ -peptide- and iron- stressed neuronal cell cultures. *Euro. J. Neurosc.* **16**: 44-54.

Kushner, S.A., Elgersma, Y., Murphy, G.G., Jaarsma, D., van Woerden, G.M., Hojjati, M.R., Cui, Y., LeBoutillier, J.C., Marrone, D.F., Choi, E.S., De Zeeuw, C.I., Petit, T.L., Pozzo-Miller, L., and Silva, A.J. (2005) Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. *J Neurosci.* **25(42)**:9721-34.

Lander, H., Jacovina, A., Davis, SD and Tauras, J. (1996) Differential activation of Mitogen-activated Protein Kinases by Nitric Oxide-related species. *J. Biol. Chem.* **271**: 19705-19709.

Landers, H., Ogiste, J., Teng, K., and Novogrodsky, A. (1995) p21ras as a common signaling Target of reactive Free Radicals and Cellular Redox Stress. *J. Biol. Chem.* **270**: 21195-198.

Lauri, S.E., Bortolotto, Z.A., Nistico, R., Bleakman, D., Ornstein, P.L., Lodge, D., Isaac, J.T., and Collingridge, G.L. (2003). A role for  $Ca^{2+}$  stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron*. **39(2)**:327-341.

Lauri, S.E., Vesikansa, A., Segerstrale, M., Collingridge, G.L., Isaac, J.T., and Taira, T. (2006) Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. *Neuron*. **50(3)**:415-29.

Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F. and Huganir, R.L. (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*. **405**:955-959.

Lee, K., and Esselman, W. (2002) Inhibition of PTPS by  $H_2O_2$  regulates the

activation of distinct MAPK pathways. *Free Rad.Biol.Med.* **33**: 1121-1132.

Lee, J.W., and Helmann, J.D. (2006) The PerR transcription factor senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature.* **440**: 363-367.

Lee, S.H., Oe, T., Arora, J.S., and Blair, I.A. (2005) Analysis of F<sub>2</sub>-mediated decomposition of a linoleic acid-derived lipid hydroperoxide by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **40**: 661-668.

Liu, S.L., Lin, X., Shi, D.Y., Cheng, J., Wu, C.Q., and Zhang, Y.D. (2002) Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways. *Arch Biochem Biophys.* **406(2)**:173-182.

Lisman, L. (1989) A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86(23)**:9574-9578.

Lozoff, B., Jimenez, E. and Wolf, A.W. (1991) Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *N Engl J Med.* **325**: 687-694.

Lynch, G., and Baudry, M. (1984) The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science.* **224**:1057-63

Malinow, R., Schulman, H. and Tsien, R. W. (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science.* **245**: 862-866.

Mandel, S.A., Avramovich-Tirosh, Y., Reznichenko, L., Zheng, H., Weinreb, O., Amit, T., and Youdim, M.B. (2005) Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *Neurosignals.* **14(1-2)**:46-60.

Mangelus, M., Kroyter, A., Galron, R., and Sokolovsky, M. (2001) Reactive Oxygen species regulate signaling pathways induced by M1 muscarinic receptor in PC12 M1 Cells. *J. Neurochem.* **76**: 1701-1711.

Mao, Y., Zang, S., Zhang, J., and Sun, X. (2006) Early chronic blockade of NR2B subunits and transient activation of NMDA receptors modulate LTP in mouse auditory cortex. *Brain Res.* **131 (8)**: 1073-1074.

Marengo, J.J., Bull, R. and Hidalgo, C. (1996) Calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels from brain cortex endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **383**: 59-62.

Marengo, J.J., Hidalgo, C., and Bull, R. (1998) Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodinesensitive calcium channels of excitable cells.

*Biophys. J.* **74**: 1263–1277.

Martindale, J., and Holbrook, N. (2002) Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. *J. Cell. Physiol.* **192**:1-15.

Mattson, M.P., Duan, W., Pedersen, W.A., and Culmsee, C. (2001) Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis* **6**:69-81.

Mattson, M.P., and Liu, D. (2002) Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* **2(2)**:215-31.

McEchron, M.D., and Paronish, M.D. (2005) Perinatal nutritional iron deficiency reduces hippocampal synaptic transmission but does not impair short- or long-term synaptic plasticity. *Nutr Neurosci.* **8(5-6)**:277-85.

McGahan, M.C., Harned, J., Mukunnemkeril, M., Goralska, M., Fleisher, L., and Ferrell, J.B. (2005) Iron alters glutamate secretion by regulating cytosolic aconitase activity. *Am J Physiol* **288**: C1117-C1124.

McNaughton, B.L., and Morris, R.G. (1987) Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci.* **10**:408–15.

Meldolesi, J. (2001) Rapidly exchanging Ca<sup>2+</sup> stores in neurons: molecular, structural and functional properties. *Prog. Neurobiol.* **65**: 309–338.

Mongkolsuk, S., and Helmann, J.D. (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol Microbiol* **45**: 9-15.

Moore, P., Zhang, J., and Hamilton, S. (1999) A Role for Cysteine 3635 of RYR1 in Redox Modulation and Calmodulin Binding. *J. Biol. Chem.* **274**: 36831–36834.

Mori, F., Fukaya, M., Abe, H., Wakabayashi, K., and Watanabe, M. (2000) Developmental changes in expression of the three ryanodine receptor mRNAs in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* **285**: 57–60.

Morris, R.G., and Frey, U. (1997) Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos. Trans. R. Soc. London Ser.B.* **352**:1489–503.

Mouton, J., Marty, I., Villaz, M., Feltz, A., and Maulet, Y. (2001) Molecular interaction of dihydropyridine receptors with type-1 ryanodine receptors in rat brain. *Biochem. J.* **354**: 597–603.

Mundy, W.R., Freudenrich, T.M., and Kodavanti, P.R. (1997) Aluminum

potentiates glutamate-induced calcium accumulation and iron-induced oxygen free radical formation in primary neuronal cultures. *Mol Chem Neuropathol.* **32(1-3):**41-57.

Mura, C.V., Delgado, R., Aguirre, P., Bacigalupo, J., and Núñez, M.T. (2006) Quiescence induced by iron challenge protects neuroblastoma cells from oxidative stress. *J Neurochem, in press.*

Nakamichi, N., Ohno, H., Nakamura, Y., Hirai, T., and Yoneda, Y. (2002) Blockade by ferrous iron of Calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptor channels in immature cultured rat cortical neurons. *J. Neurochem.* **83:** 1-11.

Nakayama, H., Numakawa, T., Ikeuchi, T., and Hatanaka, H. (2001) Nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase and CREB in PC12h cells. *J. Neurochem.* **79:** 489-98.

Nicholls, R.E., Zhang, X.L., Bailey, C.P., Conklin, B.R., Kandel, E.R., Stanton, P.K. (2006) mGluR2 acts through inhibitory G<sub>alpha</sub> subunits to regulate transmission and long-term plasticity at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103(16):**6380-5.

Núñez, M.T., Gallardo, V., Muñoz, P., Tapia, V., Esparza, A., Salazar, J., and Speisky, H. (2004) Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med.* **37:** 953-960.

Núñez-Millacura, C., Tapia, V., Muñoz, P., Maccioni, R.B., and Núñez, M.T. (2002) An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells. *J. Neurochem.* **82:** 240-248.

Núñez, M.T., Núñez-Millacura, C., Tapia, V., Muñoz, P., Mazariegos, D., Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C., and Maccioni, R.B. (2003) Iron-activated iron uptake: a positive feedback loop mediated by iron regulatory protein 1. *Biometals* **16:** 83-90.

Oshiro, S., Kawahara, M., Kuroda, Y., Zhang, C., Cai, Y., Kitajima, S., Shirao, M. (2000) Glial cells contribute more to iron and aluminum accumulation but are more resistant to oxidative stress than neuronal cells. *Biochim Biophys Acta.* **1502(3):**405-14.

Ouardouz, M., Nikolaeva, M.A., Coderre, E., Zamponi, G.W., McRory, J.E., Trapp, B.D., Yin, X., Wang, W., Woulfe, J., and Stys, P.K. (2003) Depolarization-induced Ca<sup>2+</sup> release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca<sup>2+</sup> channel activation of ryanodine receptors. *Neuron.* **40:** 53-63.

Ouyang, K., Zheng, H., Qin, X., Zhang, C., Yang, D., Wang, X., Wu, C., Zhou, Z. and Cheng, H. (2005) Ca<sup>2+</sup> sparks and secretion in dorsal root ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102(34)**:12259–12264.

Pape, H.C., Munsch, T., and Budde, T. (2004) Novel vistas of calcium-mediated signalling in the thalamus. *Pflugers Arch.* **448**: 131–138.

Patterson, S.L., Pittenger, C., Morozov, A., Martin, K.C., Scanlin, H., Drake, C., Kandel, E.R. (2001) Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron.* **32(1)**:123-40.

Perkinton, M., Gemma, L., Crossthwaite, A., and Williams, R. (2002) Phosphatidylinositol 3-Kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase(ERK1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones. *J. Neurochem.* **80**: 239-254.

Pessah, I.N., Kim, K.H., and Feng, W. (2002) Redox sensing properties of the ryanodine receptor complex. *Frontiers in Bioscience.* **7**: 72-79.

Petrozzino, J.J., and Pozzo Miller, L.D. (1995). Micromolar Ca<sup>2+</sup> transients in dendritic spines of hippocampal pyramidal neurons in brain slice. *Neuron.* **14**: 1223–1231.

Posen, Y., Kalchenko, V., Seger, R., Brandis, A., Scherz, A., and Salomon, Y. (2005) Manipulation of redox signaling in mammalian cells enabled by controlled photogeneration of reactive oxygen species. *J Cell Sci.***118(Pt 9)**:1957-69.

Price, M., Atkinson, S., Knaus, U., and Dinauer, M. (2002) Rac Activation Induces NADPH Oxidase Activity in Transgenic COSphox Cells, and the levels of Superoxide Production is Exchange factor- dependent. *J. Biol. Chem.* **277**: 19220-228.

Riccio, A., Alvania, R.S., Lonze, B.E., Ramanan, N., Kim, T., Huang, Y., Dawson, T.M., Snyder, S.H., and Ginty, D.D. (2006) A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Mol Cell.* **21(2)**:283-94.

Regan, R., Wang, Y., Ma, X., Chong, A., and Guo, Y. (2001) Activation of extracellular signal-regulated kinases potentiates hemin toxicity in astrocytes cultures. *J.Neurochem.* **79**: 545-555.

Rothstein, E., Byron, K., Reed, R., Fliegel, L. and Lucchesi, P. (2002) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Calcium overload in NRVM involves ERK ½ MAP kinases: role for an

NHE-1-dependent pathway. *Am.J. Physiol Heart Circ Physiol.* **283**: H598-605.

Sasaki, M., Gonzalez-Zulueta, M., Huang, H., Herring, W.J., Ahn, S., Ginty, D.D., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2000). Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 8617–8622.

Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, W. (2001) Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers during Cell Growth and Differentiation. *Cell Physiol Biochem.* **11**:173-186.

Sayre, L.M., Moreira, P.I., Smith, M.A., and Perry, G. (2005) Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann IST Super Sanita.* **41(2)**:143-64.

Serrano, F., and Klann, E. (2004) Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev.* **3(4)**:431-43.

Seidler, N.W., Jona, I., Vegh, M., and Martonosi, A. (1989). Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **264**: 17816–17823.

Shimuta, M., Yoshikawa, M., Fukaya, M., Watanabe, M., Takeshima, H., and Manabe, T. (2001) Postsynaptic modulation of AMPA receptor-mediated synaptic responses and LTP by the type 3 ryanodine receptor. *Mol Cell Neurosci.* **17(5)**:921-30.

Shoham, S., and Youdim, M.B. (2000) Iron involvement in neural damage and microgliosis in models of neurodegenerative diseases. *Cell Mol Biol* **46**:743-60.

Schiller, J., Schiller, Y., and Clapham, D.E. (1998). NMDA receptors amplify calcium influx into dendritic spines during associative pre-and postsynaptic activation. *Nat. Neurosci.* **1**: 114–118.

Shalin, S.C., Zirrgiebel, U., Honsa, K.J., Julien, J.P., Miller, F.D., Kaplan, D.R., and Sweatt, J.D. (2004) Neuronal MEK is important for normal fear conditioning in mice. *J Neurosci Res.* **75(6)**:760-70.

Shalin, S.C., Hernandez, C.M., Dougherty, M.K., Morrison, D.K., and Sweatt, J.D. (2006) Kinase suppressor of Ras1 compartmentalizes hippocampal signal transduction and subserves synaptic plasticity and memory formation. *Neuron.* **50(5)**:765-79.

Shoham, S., and Youdim, M.B. (2002) The effects of iron deficiency and iron and zinc supplementation on rat hippocampus ferritin. *J Neural Transm.* **109**: 1241-56.

Silva, A., Jeffrey, H., Kogan, P., and Kida, S. (1998) CREB and Memory. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**: 127-48.

Simon, F., Varela, D., Eguiguren, A.L., Diaz, L.F., Sala, F., and Stutzin, A. (2004) Hydroxyl radical activation of a Ca<sup>2+</sup>-sensitive nonselective cation channel involved in epithelial cell necrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* **287(4)**:C963-70.

Simpson, P.B., Challiss, R.A., and Nahorski, S.R. (1995) Neuronal Ca<sup>2+</sup> stores: activation and function. *Trends Neurosci.* **18**: 299-306.

Skoulakis, E.M., and Davis, R.L. (1996) Olfactory learning deficits in mutants for leonardo, a Drosophila gene encoding a 14-3-3 protein. *Neuron.* **17(5)**: 931-944.

Squier, T. (2001) Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp. Gerontol.* **36**: 1539-50.

Stanciu, M., Wang, Y., Kentor, R., Burke, N., Watkins, S., Kress, G., Reynolds, I., Klann, E., Angiolieri, M., Johnson, J., and DeFranco, D. (2000) Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J. Biol. Chem.* **275**: 12200-206.

Stoyanovsky, D., Salama, G., and Kagan, V. (1994) Ascorbate/Iron Activates Ca<sup>2+</sup>-Release Channels of Skeletal Sarcoplasmic Reticulum Vesicles Reconstituted in Lipid Bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* **308 (1)**: 214-221.

Sun, J., Xin, C., Eu, J., Stamler, J., and Meissner, G. (2001) Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **98**: 11158-62.

Sun, J., Xu, L., Eu, J.P., Stamler, J.S., and Meissner, G. (2001) Classes of Thiols That Influence the Activity of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel. *J Biol Chem.* **276(19)**:15625-15630.

Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J., Resau, J., Kunitaka, H., Cristal, R., and Kamata, T. (2000) Nerve Growth Factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* **275**: 13175-178.

Suzuki, S., al-Noori, S., Butt, S.A. and Pham, T.A. (2004) Regulation of the CREB signaling cascade in the visual cortex by visual experience and neuronal activity. *J Comp Neurol.* **479(1)**:70-83.

Svishchev, I.M. and Plugatyr, A.Y. (2005) Hydroxyl Radical in Aqueous Solution: Computer Simulation. *J. Phys. Chem. B.* **109** (9):4123-4128.

Sweatt, J. (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* **76**: 1-10.

Sweatt, J.D. (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol.* **3**:311-7.

Symons, M.C., and Gutteridge, J.M. (Eds). Free Radicals and Iron: Chemistry, Biology and Medicine. New York, NY: Oxford University Press, 1998, p 40.

Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J. And Herman, B. (1999) Measurement of Intracellular Calcium. *Physiol. Rev.* **79**: 1089-1125.

Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D., Shaywitz, A., and Greenberg, M. (1998) Calcium Influx Regulates BDNF Transcription by a CREB Family Transcription Factor-dependent Mechanism. *Neuron.* **20**: 709-726.

Tejada-Simon, M., Serrano, F., Villasana, L., Kanterewicz, B., Wu, G.Y., Quinn, M.T., and Klann, E. (2005) Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* **29**: 97-106.

Thannickal, V., Day, D., Klinz, S., Bastien, M., Larios, J., and Fanburg, B. (2000) Ras-dependent and - independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF- $\beta$ 1. *FASEB J.* **14**:1741-48.

Thannickal, V., and Fanburg, B. (2000) Reactive Oxygen Species in cell Signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **279**: L1005-1028.

Thiels, E., Kanterewicz, B., Norman, E., Trzaakos, J., and Klann, E. (2002) Long-Term Depression in the adult Hippocampus In Vivo Involves Activation of Extracellular Signal- Regulated Kinase and Phosphorylation of Elk-1. *J. Neurosci.* **22**: 2054-62.

Thiels, E., Urban, N., Gonzalez, G., Kanterewicz, B., Barrionuevo, G., Chu, C., and Klann, E. (2000) Impairment of Long-term Potentiation and associative Memory in Mice that Overexpress Extracellular Superoxide Dismutase. *J. Neurosci.* **20**: 7631-7639.

Toresson, H. and Grant, S.G. (2005) Dynamic distribution of endoplasmic reticulum in hippocampal neuron dendritic spines. *Eur J Neurosci.* **22**(7): 1793-8.

Torrás-García, M., Lelong, J., Tronel, S., and Sara, S.J. (2005) Reconsolidation

after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. *Learn Mem.* **12(1)**:18-22.

Touyz, R.M. (2005) Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal.* **7(9-10)**:1302-14.

Toyoda, H., Zhao, M.G. and Zhuo, M. (2005) Roles of NMDA receptor NR2A and NR2B subtypes for long-term depression in the anterior cingulate cortex. *Eur J Neurosci.* **22(2)**:485-94.

Traver, S., Salthun-Lassalle, B., Marien, M., Hirsch, E.C., Colpaert, F., and Michel, P.P. (2005) The neurotransmitter noradrenaline rescues septal cholinergic neurons in culture from degeneration caused by low-level oxidative stress. *Mol Pharmacol.* **6**:1882-91.

Trifilieff P, Herry C, Vanhoutte P, Caboche J, Desmedt A, Riedel G, Mons N, Micheau J. (2006) Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learn Mem.* **13(3)**:349-58.

van Montfort, R.L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R., and Jhoti, H. (2003) Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase-1B. *Nature.* **23(6941)**:773-7.

Verkhatsky, A., and Petersen, O.H. (2002) The endoplasmic reticulum as an integrating signalling organelle: from neuronal signalling to neuronal death. *Eur. J. Pharmacol.* **447**: 141–154.

Villarreal, J.S., Barea-Rodriguez, E.J. (2006) ERK phosphorylation is required for retention of trace fear memory. *Neurobiol Learn Mem.* **85(1)**:44-57.

Voss, A., Lango, J., Ernst-Russell, M., Morin, D. and Pessah, I. (2004) Identification of Hyperreactive Cysteines within Ryanodine Receptor Type 1 by Mass Spectrometry. *J. Biol. Chem.* **279**: 34514 – 34520.

Wang, H., and Joseph, J.A. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*; **27**: 612– 6.

Watson, J.B., Khorasani, H., Persson, A., Huang, K.P., Huang, F.L., and O'Dell, T.J. (2002) Age-related deficits in long-term potentiation are insensitive to hydrogen peroxide: coincidence with enhanced autophosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci Res.* **70(3)**:298-308

West, A., Chen, W., Matthew, D., Dolmetsch, R., Kornhauser, J., Tao, X., and

- Greenberg, M. (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 11024-31.
- Wibrand, K., Messaoudi, E., Havik, B., Steenslid, V., Lovlie, R., Steen, V.M., and Bramham, C.R. (2006) Identification of genes co-upregulated with Arc during BDNF-induced long-term potentiation in adult rat dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci.* **23(6)**:1501-11.
- Willaime-Morawek S, Arbez N, Mariani J, Brugg B. (2005) IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis via activation of the PI-3K/Akt and ERK pathways; is this protection independent of CREB and Bcl-2? *Brain Res Mol Brain Res.* **42(2)**:97-106.
- Wolin, M.S., Ahmad, M., and Gupte, S.A. (2005) Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. *Am. J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **289(2)**:L159-73.
- Xia, R., Stangler, T., and Abramson, J.J. (2000) Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators. *J. Biol. Chem.* **275**: 36556–36561.
- Xu, M., Wai-Cheong, Y.G., Gan, L.T., and Ng YK. (2005) Distinct roles of oxidative stress and antioxidants in the nucleus dorsalis and red nucleus following spinal cord hemisection. *Brain Res.* **1055**: 137-142.
- Yan, Y., Wei, C.L., Zhang, W.R., Cheng, H.P., and Liu, J. (2006) Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin.* **27(7)**:821-6.
- Yermolaieva, O., Broty, N., Weissbach, H., Heinemann, S., and Hoshi, T. (2000) Reactive Oxygen Species and Nitric oxide mediate plasticity and neuronal calcium signaling. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **97**: 448-453.
- Yoshida, K., Kaneko, K., Miyajima, H., Tokuda, T., Nakamura, A., Kato, M., and Ikeda, S. (2000) Increased lipid peroxidation in the brains of aceruloplasminemia patients. *J Neurol Sci.* **175**: 91-95.
- Zecca, L., Tampellini, D., Gatti, A., Crippa, R., Eisner, M., Sulzer, D., Ito, S., Fariello, R., and Gallorini, M. (2002) The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals. *J Neural Transm.* **109**: 663-72.
- Zhang, H., Zhang, J., Danila, C., and Hamilton, S. (2003). A Noncontiguous, Intersubunit Binding Site for Calmodulin on the Skeletal Muscle Ca<sup>2+</sup> Release Channel. *J. Biol. Chem.* **278**: 8348 – 8355.

Zhang, J.Z., Wu, Y., Williams, B.Y., Rodney, G., Mandel, F., Strasburg, G.M., and Hamilton, S.L. (1999) Oxidation of the skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel alters calmodulin binding. *Am J Physiol Cell Physiol.* **276**: 46-53.