

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



"ESTUDIO DE UN ANTIOXIDANTE DE ORIGEN NATURAL EN LA PREVENCIÓN DE EFECTOS DAÑINOS DE LOS OLIGÓMEROS DEL PEPTIDO BETA-AMILOIDE"

Memoria presentada a la Universidad de Chile para optar al título de Químico Farmacéutico por:

Pedro Elizardo Lobos Zambrano

Directores de Tesis: Dra. Andrea Paula-Lima,

Dr. Pablo Muñoz

Profesor Patrocinante: Dr. Guillermo Díaz Araya

Santiago, Chile 2016

AGRADECIMIENTOS

-Empieza por el principio - dijo el Rey con gravedad - y sigue hasta llegar al final; allí te paras.

Gato de Cheshire, ¿podrías decirme, por favor, qué camino debo seguir para salir de aquí?

-Esto depende en gran parte del sitio al que quieras llegar - dijo el Gato.

-No me importa mucho el sitio... -dijo Alicia.

-Entonces tampoco importa mucho el camino que tomes - dijo el Gato.

- ... siempre que llegue a alguna parte - añadió Alicia como explicación.

- ¡Oh, siempre llegarás a alguna parte - aseguró el Gato - si caminas lo suficiente!

(Extracto de Alice's Adventures in Wonderland., Lewis Carrol 1865, pronunciado durante discurso del Dr. Tito Ureta en el marco del Congreso de estudiantes de Bioquímica, Santiago, 2011)

En las siguientes líneas quisiera agradecer a todos aquellos que, como el gato a Alicia en la novela de Lewis Carrol, me han ayudado a emprender este trabajo con valiosos consejos o simplemente una sonrisa...

A mis directores de Tesis, Dra. Andrea Paula-Lima y el Dr. Pablo Muñoz, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo y por sus valiosos consejos y confianza en el trabajo realizado.

A la Dra. Tatiana Adasme, por guiarme desde los primares pasos en la unidad de investigación y valiosos consejos.

A John Alex Córdova por los conocimientos, consejos y experiencias que logró compartirme durante este tiempo.

A la Dra. Cecilia Hidalgo, por la oportunidad de trabajar en su equipo y consejos necesarios para fortalecer mi formación .

A la comisión revisora, Dr. Guillermo Díaz, Dr. Mario Chiong y la Dra. María Antonieta Valenzuela por sus aportes, comentarios y correcciones de este escrito.

A mis padres María Cecilia Zambrano e Iván Lobos Zamorano por su apoyo y cariño durante todos estos años.

A Barbara Bruna y su familia , mi hermosa compañera y pareja de quién he aprendido y compartido en tantos momentos bonitos y maravillosos durante

toda esta etapa, quien me ha acompañado y brindado más de lo que puedo retribuir y que ha traído la verdadera felicidad a mi vida.

A todos los integrantes del laboratorio de Transducción de Señales Medidas por Calcio entre ellos; Dr. Genaro Barrientos, Dra. Paola Llanos, Dr. Jorge Hidalgo, Dra. Carol San Martín, Luis Mortecinos, José Galaz, Pablo Veloso, Mónica Silva, Daniela Ponce, Jamileth Moore, Alexander Riquelme, John López. Por los buenos momentos, enorme simpatía, ayudas y consejos.

A amigos, compañeros de movilizaciones y partidos de la gloriosa Universidad de Chile, por su invaluable apoyo durante todos estos años; Felipe Muñoz, Pablo Parra, Francisco Muñoz, Marcel, Rafael, Alonso, Felipe Tapia, Felipe Pérez, Claudio, Ariadna, Gonzalo, Rubén, Gustavo y aquellos que mi corta memoria y el espacio no me ha permitido citar en este lugar.

ABREVIATURAS

A β : Péptido β -amiloide
A β Os: Oligómeros de péptido β -amiloide
APP: Proteína precursora de β -amiloide
ATX: Astaxantina
BACE: Enzima de clivaje de la APP en el sitio β
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro
CaN: Calcineurina
DIV: Días *in vitro*
DMSO: Dimetilsulfóxido
EA: Enfermedad de Alzheimer
GFP: Proteína fluorescente verde
GSH: Glutación
HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HO-1: Isoforma 1 de la hemo-oxigenasa
IP₃R: Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato
NAC: N-acetil-cisteína
NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleotido-Fosfato
NFAT (c1-c4): Isoforma c1-c4 del factor nuclear de células T activadas
Nfr2: Factor nuclear derivado eritroide 2
NMDAR: Receptor de N-metil-D-aspartato
NOX: NADPH-Oxidasa
PBS: Amortiguador salino de fosfatos
PKC: Proteína quinasa C
LTD: Depresión a largo plazo
LTP: Potenciación a largo plazo
RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero
RE: Retículo endoplasmático
ROI: Región de interés
ROS: Especies reactivas de oxígeno
Rya: Ryanodina
RyR (1, 2 o 3) : Isoforma 1, 2 o 3 del Receptor de ryanodina
XO: Xantina oxidasa

INDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	7
ABSTRACT:	8
Introducción	9
1.-El envejecimiento y la Enfermedad de Alzheimer	9
1.1.- <i>El cerebro y el envejecimiento patológico</i>	9
1.2.- <i>La enfermedad de Alzheimer (EA)</i>	9
2.- Bases celulares y moleculares involucradas en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer	11
2.1.- <i>Los oligómeros solubles del péptido β-amiloide (AβOs)</i>	11
2.2.- <i>La enfermedad de Alzheimer y fallas de las vías de señalización mediadas por Ca^{2+}; papel del receptor de ryanodina (RyR)</i>	12
2.3.- <i>Activación de la vía Calcineurina (CaN)/NFATc4 y la Enfermedad de Alzheimer</i>	13
2.4.- <i>El estrés oxidativo y la enfermedad de Alzheimer</i>	14
3. Estrategias farmacológicas contra la enfermedad de Alzheimer	16
3.1.- <i>Escenario actual de la terapéutica y problema actual</i>	16
3.2.- <i>Los antioxidantes y su posible relevancia en la enfermedad de Alzheimer</i> ..	18
3.3.- <i>Efectos antioxidantes de la astaxantina y su posible rol protector</i>	19
Figura 1: Estructura química de la astaxantina.	20
Hipótesis y objetivos	21
Hipótesis:	21
Objetivo general:	21
Objetivos específicos:	21
Materiales y Procedimientos Experimentales:	22
Materiales:	22
Preparación de oligómeros del péptido Aβ	22
Cultivo primario de hipocampo de rata .-	23
Ensayo de viabilidad celular .-.....	23
Determinación de peróxido de hidrógeno mitocondrial	24
Determinación de la translocación nuclear de NFATc4-eGFP	25
Extracción de RNA y análisis por PCR en tiempo real	25
Análisis estadístico:	26

RESULTADOS	27
1. La ATX ($\leq 10 \mu\text{M}$) no disminuye la viabilidad del cultivo primario de células hipocámpales.-	27
2.-La ATX previene el aumento en la producción de H_2O_2 mitocondrial inducida por los AβOs.	29
Figura 3. La ATX ($0,1 \mu\text{M}$) impide la generación de H_2O_2 mitocondrial inducida por los A β Os.....	30
3.La ATX previene la translocación nuclear de NFATc4-eGFP inducida por los AβOs.	31
Figura 4. La ATX previene la translocación nuclear de NFATc4-eGFP inducida por los A β Os.....	32
4.-La ATX previene la disminución de la expresión del RNAm de RyR2 inducida por los AβOs.	32
Conclusiones	34
Discusión	34
Proyecciones.	39
Bibliografía	40
Artículo científico publicado a partir de este trabajo	47

RESUMEN

"La Astaxantina protege a las neuronas de cultivo primario de hipocampo de los efectos dañinos de los oligómeros del péptido β -amiloide "

Introducción: El incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y la aparición de estrés oxidativo contribuyen en forma importante para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA). Los oligómeros del péptido β -amiloide (A β Os) son considerados como entidades moleculares centrales en la patogénesis de la EA. A concentraciones sub-letales, los A β Os producen señales aberrantes de Ca^{2+} y disminuyen la expresión de la isoforma 2 del receptor de ryanodina (RyR2), una proteína importante para los procesos de plasticidad y memoria asociados al hipocampo. En este trabajo, investigamos si el pre-tratamiento con el antioxidante astaxantina (ATX) protege a las neuronas de los efectos deletéreos inducidos por los A β Os, como el incremento en la producción de H_2O_2 mitocondrial, la activación de la isoforma c4 del factor nuclear de células T activadas (NFATc4), y la disminución del RNAm de RyR2 en un modelo de cultivo primario de células de hipocampo de rata. **Metodología:** Para estudiar los efectos de ATX sobre la viabilidad celular, se realizó una curva dosis respuesta con ATX y se determinó la viabilidad utilizando el kit Live/Dead®. Para determinar los niveles de producción de H_2O_2 mitocondrial y la activación de NFATc4, las neuronas se transfectadas con plasmidios codificantes para la proteína sensora de H_2O_2 , para HyperMito o para la proteína de fusión entre NFATc4 y la proteína fluorescente verde (GFP), (NFATc4-eGFP), respectivamente. Los niveles de RNAm de RyR2 se determinaron por qPCR. Los cultivos primarios de células hipocampales se pre-trataron con 0,1 μ M de ATX, 90 minutos antes de ser tratados con 0,5 μ M A β Os. **Resultados y Conclusiones:** El tratamiento con ATX ($\leq 10 \mu$ M) por ≤ 24 horas no evidenció cambios en la viabilidad del cultivo. La pre-incubación con ATX 0,1 μ M previno el incremento en la producción de H_2O_2 mitocondrial inducido por los A β Os. El tratamiento con A β Os por 6 horas indujo la translocación nuclear de NFATc4-eGFP y la disminución de los niveles de expresión del RNAm de RyR2. La pre-incubación con ATX 0,1 μ M previno ambos efectos. Estos resultados indican que la ATX protege a las neuronas del incremento en la producción de H_2O_2 mitocondrial, la activación de NFATc4, y la disminución del RNAm de RyR2, inducidos por los A β Os.

ABSTRACT:

"Astaxanthin protects primary hippocampal neurons against noxious effects of A β -Oligomers"

Introduction: Increased reactive oxygen species (ROS) generation and the ensuing oxidative stress contribute to Alzheimer's disease pathology. We reported previously that amyloid- β peptide oligomers (A β Os) produce aberrant Ca²⁺ signals at sub-lethal concentrations and decrease the expression of type-2 ryanodine receptors (RyR2), which are crucial for hippocampal synaptic plasticity and memory. Here, we investigated whether the antioxidant agent astaxanthin (ATX) protects neurons from A β Os-induced excessive mitochondrial ROS generation, NFATc4 activation and RyR2 RNAm down-regulation. **Methodology:** To study the effects of ATX on cell viability, we performed a dose response curve and quantified cells survival using the Live/Dead® kit. To determine mitochondrial H₂O₂ production or NFATc4 nuclear translocation, neurons were transfected with plasmids coding for HyperMito or NFATc4-eGFP, respectively, qPCR was employed to determine RyR2 RNAm expression levels. Primary hippocampal cultures were incubated with 0.1 μ M ATX for 1.5 h prior to 0.5 μ M A β Os addition. **Results and Conclusion:** We found that incubation with ATX (≤ 10 μ M) for ≤ 24 h was non-toxic to neurons. Pre-incubation with 0.1 μ M ATX also prevented the neuronal mitochondrial H₂O₂ generation induced within minutes of A β Os addition. Longer exposures to A β Os (6 h) promoted NFATc4-eGFP nuclear translocation and decreased RyR2 RNAm levels, evaluated by detection of the eGFP tagged fluorescent plasmid and qPCR, respectively. Pre-incubation with 0.1 μ M ATX prevented both effects. These results indicate that ATX protects neurons from the noxious effects of A β Os on mitochondrial ROS production, NFATc4 activation and RyR2 gene expression down-regulation

Introducción:

1.-El envejecimiento y la Enfermedad de Alzheimer.

1.1.- El cerebro y el envejecimiento patológico

El envejecimiento es un proceso deletéreo multifactorial, en que la acumulación temporal de daño celular desencadena una progresiva pérdida de la integridad funcional fisiológica, lo que incrementa la vulnerabilidad del organismo a enfermedades y a la muerte (Phillip et al., 2015). Uno de los órganos más afectados por los daños asociados al envejecimiento es el cerebro. De hecho, la mayoría de las personas experimenta una creciente pérdida de funciones con el tiempo, lo que se refleja en cambios de la estructura y función de diferentes zonas del sistema nervioso, y desencadenan alteraciones en los procesos que participan en la memoria, aprendizaje, actividad motora, patrones del sueño y función neuroendocrina (Yankner et al., 2008). En general las células de todo el sistema nervioso son afectadas por el envejecimiento y las enfermedades que conlleva, los procesos que contribuyen a este daño incluyen incremento en el estrés oxidativo, perturbaciones en la homeostasis del metabolismo celular, acumulación de daño estructural y funcional en proteínas y ácidos nucleicos, entre otros. Estos cambios son exacerbados en poblaciones vulnerables de neuronas, que terminan explicando la amplitud de procesos alterados y forman parte de la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (Mattson and Magnus, 2006; Yankner et al., 2008). Ubicado en el lóbulo temporal, el hipocampo es esencial para a los procesos de aprendizaje y memoria, y es particularmente vulnerable a efectos neurotóxicos asociados a distintas enfermedades, como la obesidad, diabetes, hipertensión, etc. Se ha demostrado que la atrofia del hipocampo es un indicador para la conversión desde un proceso de envejecimiento normal, al desarrollo de daño cognitivo leve, demencias y enfermedades neurodegenerativas, y representa, por lo tanto, un foco importante en el estudio de estas enfermedades (Fotuhi et al., 2012; Leal and Yassa, 2015).

1.2.- La enfermedad de Alzheimer (EA).

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia en el mundo, es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y fatal, que se manifiesta principalmente por graves alteraciones en procesos de memoria y cognitivos. El envejecimiento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad: cerca del 10% de los individuos sobre los 65 años la sufren y la prevalencia alcanza al 32% de la población de individuos sobre los 85 años (Association, 2015). El aumento en la esperanza de vida en los países en desarrollo ha convertido a esta enfermedad

en uno de los más importantes problemas de salud pública de los tiempos actuales y futuros (Hurd et al., 2013). Otros factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad incluyen enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipertensión, antecedentes de trauma cerebral y alto consumo de alcohol, mientras que otros antecedentes son considerados protectores e incluyen el ejercicio regular, alto nivel de educación y dieta apropiada entre las cuales destaca el consumo de antioxidantes (Querfurth and Laferla, 2010).

Durante el desarrollo de la enfermedad se produce un extenso proceso neurodegenerativo que se inicia desde temprano en regiones específicas del cerebro (principalmente hipocampo y corteza entorrinal), el cual luego progresa afectando otras regiones del cerebro, quedando el individuo totalmente inhabilitado para realizar de manera independiente incluso las más simples actividades de su vida diaria. La enfermedad de Alzheimer puede clasificarse en dos tipos de diferente origen; una forma familiar hereditaria de aparición temprana, progresión rápida y síntomas severos (comienzo entre los 45-60 años), y otra esporádica mucho más prevalente, de aparición en edades avanzadas (generalmente a partir de 65 años) (Cummings, 2004). Los primeros avances en la búsqueda de mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, pusieron énfasis en la pérdida selectiva de neuronas colinérgicas en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Estas investigaciones produjeron las primeras terapias relativamente efectivas, basadas en restablecer la comunicación colinérgica mediante fármacos agonistas directos o indirectos de acción central, principalmente inhibidores de acetilcolinesterasas, medicamentos como la Rivastigmina, Donepezilo y Galantamina, que, sin embargo, tienen una eficacia limitada, siendo apenas efectivos en retrasar ligeramente el progreso en la etapa autovalente de la enfermedad (Birks, 2012). Sin embargo, la determinación y el aislamiento de proteínas amiloides agregadas desde placas seniles extracelulares (Masters et al., 1985) y de proteínas asociadas a microtúbulos (TAU) hiperfosforiladas desde de ovillos neurofibrilares (Grundke-Iqbal et al., 1986) en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down, convirtieron estos ovillos neurofibrilares y placas seniles en los marcadores más importantes de la patología y propiciaron los blancos para la búsqueda de los mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad (Iqbal et al., 2016; Villemagne et al., 2013).

2.- Bases celulares y moleculares involucradas en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer.

2.1.- Los oligómeros solubles del péptido β -amiloide (A β O s).

El β -amiloide (A β) es un péptido de 4 KDa que proviene de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP), realizado por la enzima β -secretasa y el complejo γ -secretasa, en contraposición al procesamiento no amiloidogénico realizado en conjunto por la α -secretasa y γ -secretasa, que no genera A β . Debido a la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en el fragmento inserto en la membrana que compone el péptido A β , en medio acuoso los monómeros de A β rápidamente se unen entre sí, dando lugar a varios tipos de agregados, que incluyen los oligómeros de A β (A β O), protofibrillas y fibrillas amiloides. Los A β O s son oligómeros solubles del péptido A β se distribuyen ampliamente en el cerebro y fluido cerebro espinal, por otro lado, las fibrillas amiloides son grandes e insolubles, y se agregan y depositan formando las placas seniles (Ahmed et al., 2010; Glabe, 2008; Gong et al., 2003). A través de la observación del cerebro de pacientes *postmortem*, surgió la hipótesis proponiendo que las placas seniles causan la neurodegeneración que se desarrollaba en la EA. Bajo estos preceptos, fue establecida la llamada hipótesis de la "cascada amiloide". Esta idea establece que la deposición y agregación del péptido A β en las placas seniles, conlleva a la muerte neuronal en las zonas del cerebro degeneradas en el Alzheimer (Selkoe, 1991). Sin embargo, varios estudios no mostraron una correlación directa entre la deposición de placas y la pérdida sináptica/neurítica en cerebros *postmortem* de EA (Katzman et al., 1988). De hecho los déficits cognitivos en ratones transgénicos de EA se desarrollan antes de la detección de las placas amiloides o agregados insolubles (Mucke et al., 2000). Estas observaciones fueron las primeras que indicaron una desconexión entre el daño funcional de la enfermedad y la presencia de las placas amiloides.

Más estudios establecieron que los pequeños agregados oligoméricos solubles de A β , los A β O s , eran las verdaderas neurotoxinas tanto en cultivos *in vitro* como en modelos *in vivo* y pueden generar el daño neuronal observado en la ausencia de fibrillas o otros agregados especies neurotóxicas (Forny-Germano et al., 2014; Jana et al., 2016). Por lo tanto, la hipótesis de la "cascada amiloide" tuvo que ser readecuada, y los A β O s , en vez de las fibrillas insolubles o las placas, fueron indicados como los agentes que desencadenan el daño sináptico y las fallas en los procesos de la memoria (Haass and Selkoe, 2007). Según estos antecedentes, la enfermedad de Alzheimer responde primeramente a una falla sináptica, desencadenada por los A β O s , que conlleva a la progresiva pérdida de los procesos de

memoria y la función cognitiva en la EA, la muerte neuronal explica solamente el daño a las funciones cerebrales en las últimas etapas de la enfermedad (Ferreira et al., 2015; Strooper and Karran, 2016). Los A β O se acumulan en el cerebro y fluido cerebro-espinal de pacientes y se han encontrado niveles incrementados de oligómeros asociados con sinapsis en el cerebro de pacientes con la EA (Handoko et al., 2013; Hong et al., 2014). Los A β O dañan la plasticidad sináptica inhibiendo la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) y facilitan la inducción de la depresión a largo plazo (LTD) (Li et al., 2009; Walsh et al., 2002). La interacción de los A β O con receptores de glutamato puede generar excitotoxicidad, afectando vías de señalización celular, desencadenando los efectos neurotóxicos y la pérdida de la estructura y función sináptica (Jarosz-Griffiths et al., 2016; Paula-Lima et al., 2013).

2.2.- La enfermedad de Alzheimer y fallas de las vías de señalización mediadas por Ca²⁺; papel del receptor de ryanodina (RyR).

Las neuronas y todas las células eucariontes poseen elementos y sensores específicos que regulan la concentración de Ca²⁺ libre en el citoplasma. Estos se pueden clasificar en sistemas de entrada y salida de Ca²⁺ e incluyen canales y bombas de extrusión, presentes en la membrana plasmática y en organelos como el retículo endoplásmico y las mitocondrias, que en conjunto regulan la frecuencia, localización celular y duración de la concentración de Ca²⁺ libre citosólico, modulando distintas funciones celulares como la plasticidad sináptica, exocitosis de vesículas, metabolismo y dinámica mitocondrial, etc. (Berridge, 2006; Carrasco and Hidalgo, 2006). Existen en mamíferos tres isoformas del receptor de ryanodina (RyR1, RyR2 y RyR3) y todas están presentes en el cerebro, siendo la isoforma 2 la más abundante en neuronas, seguida de la isoforma RyR3. Este receptor es un mediador de la liberación de Ca²⁺ desde el lumen del retículo endoplásmico al citoplasma en respuesta a Ca²⁺ (su agonista fisiológico), papel que desempeña junto el receptor de IP3 (IP3R), para amplificar y transmitir las señales de Ca²⁺ originadas a través de la entrada de Ca²⁺ por canales de membrana plasmática (Fill and Copello, 2002; Zhao et al., 2000).

Existen estudios donde se ha relacionado el desarrollo de la EA con un aumento sostenido de los niveles de Ca²⁺ intracelular, lo que sería un evento temprano en la patogénesis que incluso antecede a eventos como la acumulación de β -amiloide en las placas extracelulares y la muerte neuronal (Berridge, 2010; LaFerla, 2002). En muestras *postmortem* de pacientes con EA, la expresión de RyR2 se encuentra significativamente reducida desde temprano en el desarrollo de la enfermedad.

Además se observó una disminución significativa de los niveles de unión de [^3H] ryanodina en los estadios tardíos de la enfermedad (Kelliher et al., 1999).

Datos previos del laboratorio muestran que la incubación de cultivo de neuronas hipocámpales con A β Os disminuyen el contenido de proteína y la expresión del RNAm de RyR2, aunque, se desconocen los mecanismos y vías de señalización que participan en esta disminución en su expresión. Nuestro laboratorio aportó la idea de que los A β Os generan un aumento de la entrada de Ca^{2+} al citoplasma neuronal, que es dependiente de la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y de la liberación intracelular de Ca^{2+} a través de los RyR (Paula-Lima et al., 2011). Esta señal sostenida de Ca^{2+} es evitada con la pre-incubación con el antioxidante NAC (N-Acetilcisteína, precursor de glutatión), lo que pone en relieve la participación del estado oxidativo en el mantenimiento de la señal de Ca^{2+} inducida por los A β Os (SanMartin et al., 2012), ya que el RyR es altamente sensible a la modulación redox (Marengo et al., 1998). Inversamente, quelantes de Ca^{2+} intracelular bloquean la generación de especies reactivas de oxígeno inducida por los A β Os, poniendo de manifiesto la estrecha relación entre las ROS y las señales de Ca^{2+} (De Felice et al., 2007). Existe entonces interdependencia cruzada entre estas vías de señalización, en donde los A β Os inducen señales de Ca^{2+} dependientes de ROS, y también la generación de ROS depende de las señales de Ca^{2+} . En este contexto, el RyR surge naturalmente como un actor clave ya que pueden funcionar como detectores coincidentes del aumento de Ca^{2+} y de la producción de ROS, debido a la presencia de cisteínas que son modificadas cuando están presentes en un ambiente oxidado, lo que aumenta la respuesta del canal a Ca^{2+} (Marengo et al., 1998). Además la actividad del receptor es modulada por otras especies como la concentración de Mg^{2+} y ATP, lo que en conjunto le otorgan un rol clave en la señalización redox y mediada por Ca^{2+} (Bull et al., 2007; Riquelme et al., 2011).

2.3-Activación de la vía Calcineurina (CaN)/NFATc4 y la Enfermedad de Alzheimer

La regulación de la transcripción génica dependiente de Ca^{2+} tiene un papel crítico en la plasticidad sináptica y la formación de la memoria. Esta regulación depende de la señalización de varias proteínas cuya actividad puede ser modulada por el Ca^{2+} . El aumento de Ca^{2+} provoca la activación de la fosfatasa calcineurina (CaN) que defosforila, entre otros sustratos, al factor nuclear de las células T activadas (NFAT) induciendo su translocación nuclear, donde regula la expresión génica, participando entre otros, en los procesos de arborización dendrítica y desarrollo axonal (Schwartz et al., 2009). NFAT consta de 4 principales isoformas, nominadas NFATc1-4, de ellas las

dos isoformas más importantes en las neuronas son NFATc3 y NFATc4. En estado basal el dominio N-terminal de NFAT se encuentra fosforilado, ocultando una secuencia de localización nuclear, y la elevación sostenida y de baja intensidad de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático lleva a la activación de la CaN, la cual entonces desfosforila a NFAT, revelando su secuencia de localización nuclear y resultando en su translocación al núcleo (Hogan et al., 2003). La regulación de este proceso es diferencial para NFATc3 y NFATc4, mientras que NFATc3 rápidamente transloca al núcleo (minutos), NFATc4 permanece fosforilado y localizado en el citoplasma, requiriendo depolarizaciones más largas para translocar al núcleo (Ulrich et al., 2012).

Durante el envejecimiento se producen la desregulación gradual de la señalización por Ca^{2+} , aumento del estrés oxidativo, y la neuroinflamación, todos conllevando a una mayor producción de A β y a un aumento de la activación de CaN (Abdul et al., 2009; Norris et al., 2005), en un ciclo de daño que se retroalimenta. Los daños que se producen durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer correlacionan con la mayor activación de la CaN y con un aumento en la activación de isoformas específicas de NFAT en las células gliales y neuronas de la corteza e hipocampo en pacientes *postmortem* (Abdul et al., 2009, 2010). La activación de la CaN y la activación específica de la isoforma NFATc4 por A β O₂ provoca cambios morfológicos observados en la proximidad de las placas amiloides como: distrofia neurítica, pérdida de la arborización dendrítica y disminución de la densidad de espinas, cambios morfológicos que son prevenidos y revertidos cuando se utilizan inhibidores de la vía CaN/NFAT (Hudry et al., 2012; Wu et al., 2010).

2.4.-El estrés oxidativo y la enfermedad de Alzheimer

Junto con el control de los niveles de Ca^{2+} , las células han desarrollado un sofisticado mecanismo de señalización basado en cambios localizados del estado de oxidación de proteínas, generando un sistema de señalización redox. En general el estado redox de la célula se mantiene en equilibrio. Sin embargo la producción no controlada de especies oxidantes, como las (ROS), pueden alterar este equilibrio y desencadenar daño celular. Las ROS son un término colectivo que agrupa a aquellos compuestos que derivan de las reacciones del oxígeno con pérdida o ganancia de electrones, generando compuestos oxidantes altamente reactivos. Esto incluye entre otros al, anión superóxido $\text{O}_2^{\cdot -}$, peróxido de hidrógeno H_2O_2 y el radical hidroxilo $\text{HO}\cdot$ (Dröge, 2002). La atención se ha enfocado en el H_2O_2 que, por sus propiedades, es el principal segundo mensajero en la señalización redox. Sin embargo el H_2O_2 , no tiene electrones no apareados y por lo tanto no es un radical, lo cual lo hace un oxidante

comparativamente menor que otras especies. El H_2O_2 puede difundir desde su sitio de generación para reaccionar con otras biomoléculas. Sin embargo, su rango de acción es local ya que, el H_2O_2 es metabolizado rápidamente por enzimas o compuestos antioxidantes endógenos (Veal and Day, 2011). El H_2O_2 puede reaccionar con residuos de tioles libres (-SH) en proteínas blanco, que son oxidados a su forma de puente disulfuro (S-S), de esta manera pueden regular diferentes funciones celulares, como activar directamente a factores de transcripción regulando la expresión génica (Brigelius-Flohe and Flohé, 2011).

En la membrana plasmática la producción de ROS depende de la actividad de la NADPH oxidasa (NOX), que remueve un electrón desde el NADPH y lo añade al oxígeno generando $\text{O}_2^{\cdot-}$, luego la superóxido dismutasa convierte el $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Por otro lado, en el citoplasma conviven varias enzimas que pueden generar ROS tales como xantina oxidasa (XO), citocromo P450 (CYP_{450}), entre otras. Sin embargo, la fuente de producción de ROS intracelular más importante es la mitocondria (Schieber and Chandel, 2014). En la mitocondria, se han encontrado deficiencias en las distintas enzimas responsables del metabolismo oxidativo, que pueden aumentar la generación de ROS, también la actividad normal de estas y la cadena transportadora de electrones, en los complejos I y III contribuyen a la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Hamanaka and Chandel, 2010).

El estrés oxidativo se produce por un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o disminución de los sistemas de defensa antioxidante, que son responsables de la eliminación de ROS. Esto genera un desequilibrio, aumentando la oxidación de biomoléculas y desencadenando procesos que generan daño celular, que favorecen el desarrollo de la neurodegeneración implicada en el envejecimiento y deterioro cognitivo (Barnham et al., 2004; Dröge and Schipper, 2007; Mattson and Magnus, 2006). Usando tejido *postmortem* de pacientes con la EA, varios estudios han demostrado que presentaban mayores niveles de estrés oxidativo, revelado por los niveles de oxidación proteica, oxidación lipídica y glicooxidación, que se desarrollan en forma progresiva y gradual desde temprano, en las primeras etapas de la enfermedad, tanto en pacientes con deterioro cognitivo leve, como en casos de EA (von Bernhardi and Eugenín, 2012; Butterfield et al., 2013). Uno de los mecanismos por los cuales el A β puede generar ROS, es a través de complejos formados con metales como el Zn^{2+} y el Cu^{2+} , en particular, el Zn^{2+} , a concentraciones fisiológicas, lo que puede inducir la mayor agregación de A β . El Cu^{2+} y el Fe^{3+} pueden reducirse y oxidar residuos de aminoácidos del péptido A β , generando en el proceso

un aumento en la generación de ROS, como peróxido de hidrogeno, el cual si no puede ser contenido por el sistema antioxidante celular, generará estrés oxidativo y daño celular (Bush, 2003; Ward et al., 2014). Una de las fuentes principales de estrés oxidativo en la EA es la mitocondria, y varios estudios han encontrado deficiencias en enzimas de la cadena respiratoria y del ciclo de Krebs, además de fallas en la dinámica mitocondrial, lo que termina aumentando la producción normal de ROS desde este organelo (Hirai et al., 2001; Mattson et al., 2008; Zhang et al., 2016).

El estrés oxidativo aparece simultáneamente con problemas en la vías señalización mediada por Ca^{2+} , en particular se ha asociado a la neurotoxicidad inducida por los A β O con la activación de vías rio abajo del receptor de " N-metil-D-aspartato" (NMDA) (Decker et al., 2010). La activación aberrante de los receptores NMDA conlleva a cambios anormales en la expresión génica, que median los defectos morfológicos y funcionales inducidos por los A β O en las neuronas (Sebollela et al., 2012). A pesar de que los ROS se clasifican típicamente como especies neurotóxicas, no debe perderse de vista que es la generación excesiva de los ROS lo que se asocia con sus efectos neurotóxicos. A concentraciones fisiológicas, muchos ROS están implicados en cambios funcionales necesarios para la plasticidad sináptica y, por tanto, para la función cognitiva normal, y tan solo en caso de producción excesiva o no controlada como en el estrés oxidativo, son perjudiciales (Kishida and Klann, 2007; Massaad and Klann, 2011).

3. Estrategias farmacológicas contra la enfermedad de Alzheimer

3.1.- Escenario actual de la terapéutica y problema actual

Durante los pasados 10 a 15 años, el estudio de los detalles moleculares de la patogénesis de la EA ha indagado en busca de los posibles blancos y estrategias para una mejor intervención terapéutica. Principalmente, la evidencia apunta al péptido A β como un blanco clave. De hecho, la mayoría de las nuevas estrategias terapéuticas involucran interferir con la producción, auto-asociación o las vías de señalización que median los efectos neurotóxicos del péptido A β (Wolfe, 2002). Ya existen fármacos, en diferentes etapas de desarrollo clínico o pre-clínico, dirigidos contra todos estos procesos, aunque desafortunadamente es posible que ninguno de estos agentes ayudarán a pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad de Alzheimer, ya que el grado de neurodegeneración a este nivel, parece alcanzar un punto de no retorno. Sin embargo, se espera que aún sea posible encontrar compuestos que puedan enlentecer o detener el progreso de la enfermedad, en individuos que se encuentren en etapas tempranas (Andrieu et al., 2015; Cummings et al., 2014; Petersen, 2003).

Actualmente existen pocas alternativas terapéuticas aprobadas por la FDA para el tratamiento de la EA, y estas sólo proveen tratamiento sintomático y un beneficio a corto plazo. Comprenden principalmente a inhibidores de la acetilcolinesterasa de acción central, que tratan de reemplazar la pérdida de neuronas colinérgicas que sucede en la EA. Desafortunadamente este tipo de terapia no detiene la pérdida de estas neuronas, por lo que los fármacos eventualmente pierden su efectividad (Cummings, 2004). Una mejor aproximación busca desarrollar agentes contra dianas o procesos que sean responsables de la neurodegeneración. De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, los primeros blancos en este sentido, se han dirigidos contra enzimas que participan en este proceso de proteólisis y producción de A β , con la intención de disminuir la generación del péptido (Karran et al., 2011). Estos incluyen: inhibidores de la β secretasa (BACE) y/o del complejo de la γ secretasa (Wolfe, 2012), moduladores de la α secretasa y la inmunoterapia activa o pasiva contra el A β (Delrieu et al., 2012). También se buscan otros que puedan modular indirectamente la producción de A β y o sus efectos a través de distintas vías de señalización. Se destacan algunos ya aprobados para otras condiciones como antiinflamatorios, antioxidantes, inhibidores de la biosíntesis de colesterol (estatinas), sensibilizadores de insulina, entre otros (Wolfe, 2002).

Una estrategia que ha alcanzado relativo éxito en los ensayos clínicos ha sido la inmunoterapia contra el péptido A β , que busca prevenir la acumulación de A β y aumentar su eliminación por el sistema inmune, activamente con el mismo péptido A β como inmunógeno o pasivamente, mediante la administración de anticuerpos anti-A β (Wisniewski and Goñi, 2015). La inmunización activa ha mostrado reducir la disfunción cognitiva en ratones transgénicos de la EA. Sin embargo, han aparecido dudas, ya que la respuesta inmunológica podría desencadenar la disolución de las placas que contienen A β , sin la eliminación de la forma soluble de A β , por lo que se desconoce si la reducción en el declive cognitivo se debe a la disolución de las placas o puede deberse verdaderamente a la unión de anti-A β a las formas tóxicas solubles de A β . En ensayos clínicos de fase III con anticuerpos o la inmunización pasiva han fallado en demostrar beneficios cognitivos en pacientes (Delrieu et al., 2012). Esto ha dado un nuevo impulso para las estrategias que buscan intervenir los procesos provocados por el péptido A β , tal como el estrés oxidativo.

3.2.- Los antioxidantes y su posible relevancia en la enfermedad de Alzheimer.

En pacientes con la enfermedad de Alzheimer se ha encontrado deficiencias funcionales en enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa (SOD), las cuales se relacionaron con un fenotipo más grave de la enfermedad, mostrando en tales casos un aumento de la agregación de amiloide, y la aceleración de la aparición de deterioro cognitivo (von Bernhardt and Eugenín, 2012). Por el contrario, la sobreexpresión de enzimas antioxidantes atenúa y revierte la disfunción celular inducida por los oligómeros de A β (Giordano et al., 2014)

En la búsqueda de estrategias terapéuticas que pudiesen retrasar, revertir y/o prevenir el desarrollo de la EA, los compuestos antioxidantes han concitado considerable atención y esfuerzos, con relativo éxito en la investigación, siendo importantes herramientas farmacológicas cuyas propiedades protectoras se han probado en diversas enfermedades (Schmidt et al., 2015). Los antioxidantes reaccionan preferentemente con los ROS inactivándolos y restableciendo el equilibrio redox de la célula. También pueden activar o imitar a los sistemas endógenos antioxidantes celulares, restableciendo sus actividades y/o aumentar su expresión, además de prevenir los efectos dañinos de los ROS sobre las diferentes dianas biológicas. En general las principales estrategias antioxidantes probadas en modelos *in vitro* e *in vivo* de la EA, incluyen: usar compuestos atrapadores de ROS que limiten los efectos tóxicos de los ROS; usar compuestos o precursores metabólicos que imiten la actividad de enzimas antioxidantes endógena; o usar compuestos que activen los sistemas antioxidantes endógenos (Domenico et al., 2015; Schmidt et al., 2015). Mención especial merecen las estrategias dirigidas a controlar la producción de ROS en la mitocondria, regulando su metabolismo y función, con compuestos dirigidos específicamente a este organelo, dado el rol de la mitocondria controlando la función metabólica y modulando vías de señalización celular, no es de extrañar que estos compuestos hayan demostrado gran efectividad y posibles aplicaciones en patologías neurodegenerativas (Apostolova and Victor, 2015; Ma et al., 2011; Wu et al., 2015b).

Existe una enorme cantidad de antioxidantes ensayados en distintos modelos de la EA. Una atención especial se han atraído los de origen natural, ya que estos están presentes en productos de consumo regular y se encuentran normalmente en nuestra dieta en alimentos como aceites, frutas, vegetales, vegetales y aditivos, e incluye a compuestos como la vitamina E, vitamina C, β -caroteno, polifenoles, etc, donde la investigación ha demostrado en diverso grado, que su consumo o su uso en tratamientos puede prevenir o retrasar el desarrollo de la EA (Domenico et al., 2015).

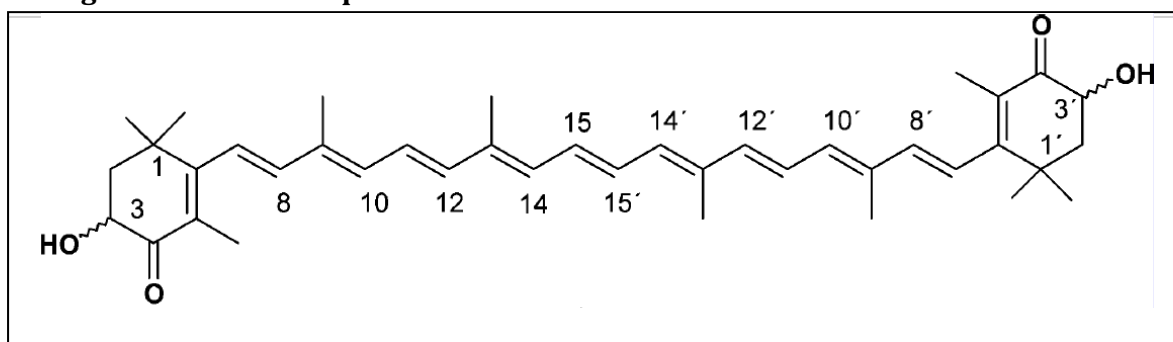
3.3.- Efectos antioxidantes de la astaxantina y su posible rol protector.

La astaxantina (ATX), pigmento rojo-naranja carotenoides relacionado a la familia de la vitamina E está presente naturalmente en muchos animales acuáticos como salmón y centollas. Comparte propiedades y características metabólicas con otros reconocidos antioxidantes como la luteína y β -carotenos y se le atribuye un alto poder antioxidante (Hernández-Marin et al., 2012). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado sus propiedades antioxidantes como atrapador de radicales y especies oxidantes como O_2^- , H_2O_2 y OH^\cdot , que junto a su gran lipofiliidad le permiten tener un efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica (Husseini et al., 2006; Ikeda et al., 2008). También se le atribuyen efecto antiinflamatorio y anti-apoptótico (Kim et al., 2009). Por lo mismo, la ATX ha sido utilizada con éxito para disminuir el estrés oxidativo en pacientes de edad avanzada y para mejorar la función neuronal después de la isquemia cerebral (Shen et al., 2009). Todas estas propiedades presentes en la ATX la hacen un candidato muy atractivo para el uso contra enfermedades del centro sistema nervioso. Recientemente se han descrito efectos protectores en neuronas de modelos experimentales de daño agudo, enfermedades neurodegenerativas crónicas y enfermedades neurológicas (Wu et al., 2015a).

Aunque ATX tiene una estructura muy similar a la de otros carotenoides como la luteína y la zeaxantina, tiene algunas diferencias estructurales en la disposición de sus grupos hidroxilo, lo que le proporciona características únicas (estructura en la Figura 1). La actividad antioxidante de la ATX reside en sus anillos polares, con grupo carbonilo e hidroxilos conjugados y enlaces carbono-carbono insaturados conjugados no polares, con actividad 10 veces mayor que la de otros carotenoides (Rodrigues et al., 2012). Además de la actividad como atrapador de ROS atribuida a la ATX, varios estudios han demostrado que la ATX sola, o en combinación con ácidos grasos omega-3, protege a las células a través de la activación de la vía de señalización del factor nuclear (derivado eritroide 2) (Nrf2) y de la hemo oxigenasa-1 (HO-1) (Saw et al., 2013). Varios estudios han implicado Nrf2 en la inducción de HO-1, que es la enzima que cataliza el metabolismo del grupo hemo metabolismo. HO-1 protege la actividad del tejido durante el estrés inflamatorio en diversas condiciones a través de la degradación de hemo pro-oxidante y la producción de monóxido de carbono (CO) y la bilirrubina, ambos de los cuales tiene propiedades anti-inflamatorias y anti-apoptóticas, especialmente en las perturbaciones ROS-dependientes asociadas con el síndrome metabólico (Abraham et al., 2015).

En esta tesis, investigamos los posibles efectos protectores de la ATX contra algunos de los efectos deletéreos inducidos por los A β O en un modelo *in vitro* de cultivo primario de neuronas hipocampales de rata. Nuestros resultados sugieren firmemente la protección de la ATX contra los efectos dañinos ejercidos por los A β O en la producción de ROS mitocondrial, la activación de NFATc4 y la regulación negativa de la expresión génica de RyR2, sugiriendo que este antioxidante natural podría representar una futura aproximación terapéutica en la EA.

Figura 1: Estructura química de la astaxantina.



Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

❖ El tratamiento con el antioxidante Astaxantina previene la generación de especies reactivas de oxígeno, la activación de NFATc4 y la disminución de los niveles de RNAm de la isoforma 2 del receptor de Ryanodina inducidos por los oligómeros de A β en cultivos primarios de neuronas hipocampales.

Objetivo general:

❖ Determinar si el tratamiento con el antioxidante Astaxantina protege a las neuronas hipocampales de los efectos tóxicos dependientes de Ca²⁺ inducidos por el tratamiento con A β Os, como son la generación de especies reactivas de oxígeno mitocondriales, la activación de NFATc4 y la disminución de los niveles de RNAm de la isoforma 2 del receptor de ryanodina.

Objetivos específicos:

❖ Determinar si la preincubación con el antioxidante Astaxantina previene la producción de especies reactivas de oxígeno en cultivo primario de células hipocampales.

❖ Investigar si el uso del antioxidante Astaxantina previene la translocación al núcleo del factor transcripcional NFATc4 inducida por A β Os en cultivo primario de células hipocampales.

❖ Determinar si la preincubación con el antioxidante Astaxantina previene la disminución de la expresión de la isoforma 2 del receptor de ryanodina 2 (RyR2) inducida por A β Os en cultivo primario de células hipocampales.

Materiales y Procedimientos Experimentales:

Materiales: El péptido A β (A β ₁₋₄₂) se adquirió de Bachem Inc. (Torrance, CA), la astaxantina (ATX) fue extraída desde *Lithodes antarcticus* (por la empresa BIOTEX S.A., Santiago, Chile). El Hexafluoro-2-propanol (HFIP) se adquirió desde Merck (Darmstadt, Germany) el dimetil -sulfóxido (DMSO) desde Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El reactivo Trizol, el suplemento B27, el medio de cultivo Neurobasal, el medio de cultivo esencial modificado Dulbeco`s (DMEM), la Lipofectamina 2000 y la sonda de unión a DNA SYBR green (Platinum SYBR GreenqPCR SuperMix UDG) se adquirieron desde Invitrogen (Carlsbad, CA). El kit de Live/Dead se adquirió desde Molecular Probes (Chicago, IL), el kit Ambion DNA-free™ desde Thermo Fisher Scientific (Chicago, IL) y el kit ImProm-II™ Reverse Transcriptase desde Promega (Madison, WI). El plasmidio pEGFP-C1 NFAT3 (NFATc4) (plasmid #10961; secuencia completa humana NFATc4) fue gentilmente cedido por el Dr. J. D. Molkentin a Addgene (Cambridge, MA), donde se adquirió. El plasmidio HyperMito se adquirió desde Evrogen (Moscow, Russia). El sistema de amplificación (MX3000P) se obtuvo de Stratagene (La Jolla, CA).

Preparación de oligómeros del péptido A β . La preparación de oligómeros se realizó según se describió en trabajos anteriores (Paula-Lima et al., 2011; SanMartin et al., 2012). Se solubilizó el péptido A β ₁₋₄₂ en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) para obtener una solución de concentración final de 1 mM. Esta solución se incubó a temperatura ambiente por 1 hora y después en hielo por 10 min. La solución fría se separó en alícuotas y se evaporó el HFIP en la campana de flujo laminar, formándose películas de A β que se guardaron a -20°C. Al momento de su uso, previo a los respectivos experimentos, se descongelaron las alícuotas de las películas de A β necesarias y se disolvieron en suficiente dimetilsulfóxido (DMSO), de forma a alcanzar una concentración de 5 mM. Luego se diluyeron con suficiente solución de amortiguador fosfato salino (PBS) estéril para obtener una solución de concentración de 100 μ M. Esta solución se incubó durante 24 h a 4°C, para luego separar la fracción soluble, de los agregados insolubles de fibrillas o protofibrillas, para lo cual las alícuotas se centrifugaron por 10 minutos a 14.000 g a 4°C y los sobrenadantes, que contenían los oligómeros solubles del péptido A β (A β Os), se traspasaron a tubos estériles apropiados que se mantuvieron a 4°C hasta su utilización en los respectivos tratamientos realizados en el medio de cultivo o solución Tyrode. Sólo los A β Os preparados frescos (no más de 48 horas) se utilizaron para todos los experimentos.

Cultivo primario de hipocampo de rata.- Los cultivos se prepararon a partir de embriones de 18 días de gestación (E18) de ratas Sprague-Dawley, de acuerdo a protocolo de bioética aprobados en el marco del proyecto. Se extrajeron los cerebros de los embriones que se mantuvieron en una solución salina HANKS balanceada a pH 7,4 a 4°C (NaCl 135 mM; KCl 5,4 mM; NaH₂PO₄ 0,5 mM; Na₂HPO₄ 0,33 mM; y D-glucosa 5,5 mM). En zona estéril de campana de flujo laminar se retiraron las meninges y se disectaron los hipocampos. Los hipocampos se lavaron con solución HANKS, y se incubaron en solución HANKS suplementada con 0,25% tripsina a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 8 minutos. Después de otros tres lavados con solución HANKS, el tejido se disoció mecánicamente en medio de adhesión (DMEM, D-glucosa 19,4 mM; NaHCO₃ 26 mM; suplementado con 10% de suero de caballo; 10 U/mL de penicilina; 10 µg/mL de estreptomycin). Los fragmentos de tejido no disgregados se sedimentaron por centrifugación a 800 rpm durante 10 segundos, se recuperaron las células en suspensión y se sembraron a una densidad de 40.000 células por cubre-objeto de vidrio de 12 mm de diámetro o a una densidad de 1.500.000 células por placa plástica de 60 mm de diámetro previamente tratada con poli-Lisina (50 µg/mL). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 40 minutos después de ser sembradas, el medio de adhesión se cambió por medio Neurobasal® suplementado con B27, 20 U/mL de penicilina y 20 µg/mL de estreptomycin y 2 mM de Glutamax. Las células se mantuvieron en estas condiciones suplementándose con medio de cultivo periódicamente y se utilizaron después de 14 a 21 días (14-21 DIV) según se detalla en cada procedimiento.

Ensayo de viabilidad celular.- Para evaluar los efectos de la astaxantina (ATX) en la viabilidad del cultivo primario de células hipocámpales, estas se mantuvieron *in vitro* por 14 días (14 DIV). Luego estas células se trataron con ATX previamente diluida, de tal manera de alcanzar las diferentes concentraciones de ATX en el medios de cultivo (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) y la viabilidad celular se evaluó 24 horas después a través del ensayo de viabilidad celular Live/Dead®, con un protocolo adaptado de las instrucciones del fabricante. El protocolo, en resumen, consistió en: pasadas las 24 horas de tratamiento con las diferentes concentraciones de ATX, se removió el medio de cultivo las células, y estas se lavaron suavemente tres veces con una solución tibia de PBS-Glucosa y tratadas con 2 µM calceína-éster AM y 1 µM homodímero de etidio en PBS-Glucosa, donde se incubaron a 37 °C por 30 minutos. Las células se observaron en microscopio de epifluorescencia Nikon® Eclipse Ti-E con objetivo de amplificación 20X. Las células

viabiles se identificaron por la fluorescencia verde emitida por la calceína y las células muertas por la fluorescencia roja emitida por el etidio enlazado al DNA. Al menos se adquirieron tres campos aleatorios por pocillo de cultivo (se ensayaron por experimento tres pocillos como replicados de cada concentración usada), y se contaron aproximadamente 500 células por campo. Se realizaron 6 experimentos en total con cultivos diferentes. La viabilidad celular se expresó como porcentaje de células vivas respecto al control no tratado con ATX. En promedio la viabilidad del control fue del 85%.

Determinación de peróxido de hidrógeno mitocondrial.- Se utilizaron cultivos de neuronas hipocampales sembradas en cubreobjetos de 25 mm que se mantuvieron entre 14-16 DIV en cultivo. Luego, se evaluaron los niveles relativos de H_2O_2 mitocondrial en distintas condiciones experimentales, a través de microscopía confocal. Para ello, las neuronas se transfectaron con 1 μg del plásmido HyPerMito (Excitación: 420 nm/Emisión: 516 nm; cortesía del Dr. Rizzuto) (Belousov et al., 2006) con lipofectamina 2000® según las recomendaciones del fabricante, se utilizó una proporción de 1:2 en μg de ADN del plasmidio y de la lipofectamina. Al día siguiente de la transfección, las neuronas se sometieron a tratamientos con 0,1 μM ATX por 1,5 horas. Luego se lavaron 3 veces con medio extracelular Tyrode (129 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM Hepes ácido libre, 30 mM glucosa, 2 mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$) y se llevaron al microscopio confocal, donde se registró la fluorescencia de HyPerMito por 200 segundos hasta lograr estabilización de la señal basal. A continuación, se registraron los cambios en la intensidad de fluorescencia al agregar 0,5 μM de A β Os. Las imágenes se adquirieron cada 6 segundos en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM Pascal 5 utilizando el objetivo de 63x de inmersión en aceite. Este aumento óptico permite la visualización de un número reducido de neuronas por campo, pero otorga una mayor resolución para estudiar la generación de H_2O_2 en la mitocondria. Para cada condición, se delimitaron regiones de interés (ROIs) en 1 – 3 neuronas por campo, con el fin de monitorear la producción de H_2O_2 a nivel mitocondrial. Los experimentos se repitieron en triplicado utilizando tres cultivos distintos. La modificación en los niveles de H_2O_2 se monitorearon a través de los cambios de fluorescencia de HyPerMito y son presentados como la razón F_1/F_0 , donde F_1 corresponde a la fluorescencia experimental y F_0 a la fluorescencia basal previa a la estimulación. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Determinación de la translocación nuclear de NFATc4-eGFP.- Se utilizaron neuronas de cultivo primario hipocampal sembradas en placas de vidrio de 25 mm de diámetro de 13-15 DIV. Estas fueron transfectadas con el plasmidio codificante de la proteína de fusión entre la proteína fluorescente verde y NFATc4 (Ichida and Finkel, 2001), mediante el sistema de Lipofectamina 2000®, utilizándose una razón entre DNA:Lipofectamina 2000® de 1:2. Los cultivos se mantuvieron en medio Neurobasal® suplementado con B-27, y aproximadamente 24 horas después de la transfección, las células se trataron de acuerdo a las respectivas condiciones utilizadas en el experimento (ATX, vehículo 1% DMSO en PBS y/o AβOs). Transcurridos los tratamientos respectivos, las células fueron fijadas tratándolas con solución de paraformaldehído 4% por 10 minutos y lavadas suavemente 5 veces con solución de PBS. Luego, las células fijadas se incubaron con Hoescht por 5 minutos para marcar los núcleos celulares y se montaron sobre portaobjetos en medio de montaje DAKO®. Los portaobjetos montados se guardaron a 4°C para posterior observación. La localización intracelular de NFAT-eGFP se visualizó y las imágenes se adquirieron en microscopio invertido confocal de escaneo laser Zeiss con lentes objetivos 40x. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el programa ImageJ (NIH). La segmentación de las diferentes ROI se realizó utilizando el siguiente protocolo: las imágenes se estratificaron según la intensidad de los canales correspondientes a la señal verde (GFP, Alexa flúor 488, etc.) y a la señal azul Hoechst (núcleo), utilizando diferentes filtros para demarcar la extensión de las células a cuantificar. Para determinar la translocación nuclear de NFATc4-eGFP, se calculó la razón de la intensidad de la señal nuclear/citoplasmática. Para esto, se analizaron las imágenes seleccionando una ROI tanto en la región citoplasmática como nuclear, indicada por la marca nuclear Hoescht, ambas intensidades normalizadas por su respectiva área y corregidas por el background, usando un ROI en un área sin células. Los datos se expresaron en relación al control sin estimular.

Extracción de RNA y análisis por PCR en tiempo real.- Se determinaron los niveles relativos del RNAm de RyR2, en las células tratadas con 0,1 μM ATX por 1.5 horas o con el antioxidante NAC, a 10 mM por 30 minutos, y vehículo 1% DMSO en PBS o AβOs respectivamente. Se realizó la extracción de RNA total utilizando un protocolo modificado del reactivo Trizol®. Las células de las respectivas condiciones se lisaron usando Trizol®, se agregó cloroformo para separar las fases. Las muestras se centrifugaron y la fase acuosa se separó, para luego precipitar el DNA y RNA con isopropanol durante 2 horas a -80°C. Luego, las muestras se centrifugaron 30 minutos a 12.000 rpm, descartando el sobrenadante. Para eliminar las sales y otros posibles

precipitados, las muestras se lavaron 5 veces agregando solución de etanol 70% y centrifugando a 8500 rpm por 5 minutos, descartándose el sobrenadante. Tras los lavados, el precipitado obtenido se disolvió en agua ultra pura libre de nucleasas. Para eliminar el DNA contaminante y el remanente genómico, las muestras se trataron con el kit de la enzima DNAasa (Ambion DNA-free™). Luego, se determinó la concentración de RNA en las muestras, midiéndose la absorbancia a 260 nm y la pureza a través de la razón 260/280 (solo se utilizaron las muestras con razón mayor o igual a 1,75). Luego 2 µg del RNA obtenido se trataron para obtener el DNA complementario (cDNA) mediante el kit ImProm-II™ Reverse Transcriptase. Con el cDNA obtenido se determinaron los niveles del RNAm de RyR2, que se amplificaron usando partidores previamente descritos en el laboratorio (RyR2: 5'-AATCAAAGTGGCGGAA TTTCTTG-3' / 5'-TCTCCCTCAGCCTTCTCCGGTTC-3'). Se determinaron los niveles de expresión relativos de ambos genes normalizándolos respecto a los niveles de expresión de β-actina (β-actina: 5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3' / 5'-TACATGGC TGGGGTGTGAA-3'). El qPCR se realizó utilizando el kit Brilliant III Ultra FAST SYBR Green QPCR master mix, según protocolo estándar del fabricante, utilizando el equipo MX3000P presente en el laboratorio. Cada muestra se analizó a lo menos en triplicado y se realizaron curvas de disociación para verificar la pureza de los productos obtenidos y la especificidad de las condiciones de PCR. Los resultados obtenidos fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Análisis estadístico: Todos los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar (SE). Las diferencias significativas se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía o ANOVA de dos vías, seguido de un test Bonferroni para comparación de múltiples condiciones.

RESULTADOS

1. La ATX ($\leq 10 \mu\text{M}$) no disminuye la viabilidad del cultivo primario de células hipocampales.-

Con el fin de determinar el perfil de toxicidad de la ATX, antes de investigar los posibles efectos protectores de la ATX contra los efectos tóxicos producidos por los A β O $_2$ en células de cultivos primarios hipocampales, utilizamos el ensayo Live/Dead® para cuantificar la viabilidad de los cultivos primarios hipocampales de (13-15 DIV), expuestos por 24 horas a diferentes concentraciones de ATX (desde 0,001 a 100 μM). En la Fig. 2 (A-H), se muestran imágenes representativas de las células expuestas a los diferentes tratamientos, en las que las células vivas se identifican por la emisión de fluorescencia verde asociada a la incorporación de Calceína-AM en el citoplasma de esas células, mientras que las muertas exhiben fluorescencia roja punteada, característica del etidio unido al DNA. Se muestran imágenes de los cultivos control, tratados con vehículo Figura 2A, y de cultivos tratados con la ATX en el rango de concentraciones expuestas Figura 2 B-G. También se evaluó el efecto de 250 μM de H $_2$ O $_2$ como control positivo para inducir la muerte celular Figura 2 H. En el panel Figura 2 I se muestra el análisis cuantitativo de la viabilidad celular, expresada como porcentaje respecto al cultivo control, de seis experimentos diferentes para cada condición. En esta condición, las células presentaron una viabilidad promedio de 85%. El tratamiento con concentraciones menores o iguales 10 μM de ATX, no disminuyó significativamente la viabilidad. Sin embargo, el tratamiento con 100 μM indujo en promedio un 20% de disminución de la viabilidad, mostrando que a altas concentraciones la ATX podría inducir algún grado de toxicidad. A modo de comparación, el tratamiento con 250 μM H $_2$ O $_2$ disminuyó la viabilidad en promedio un 40%.

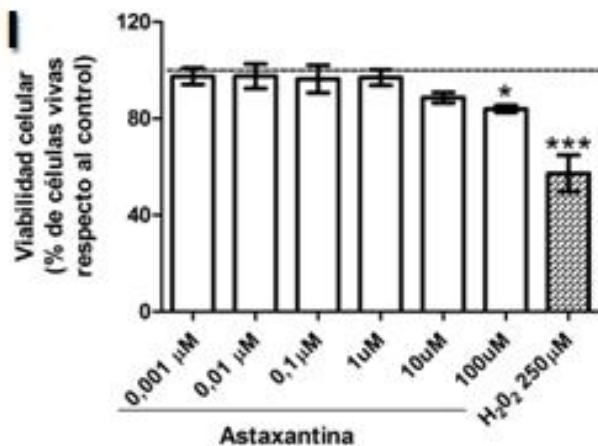
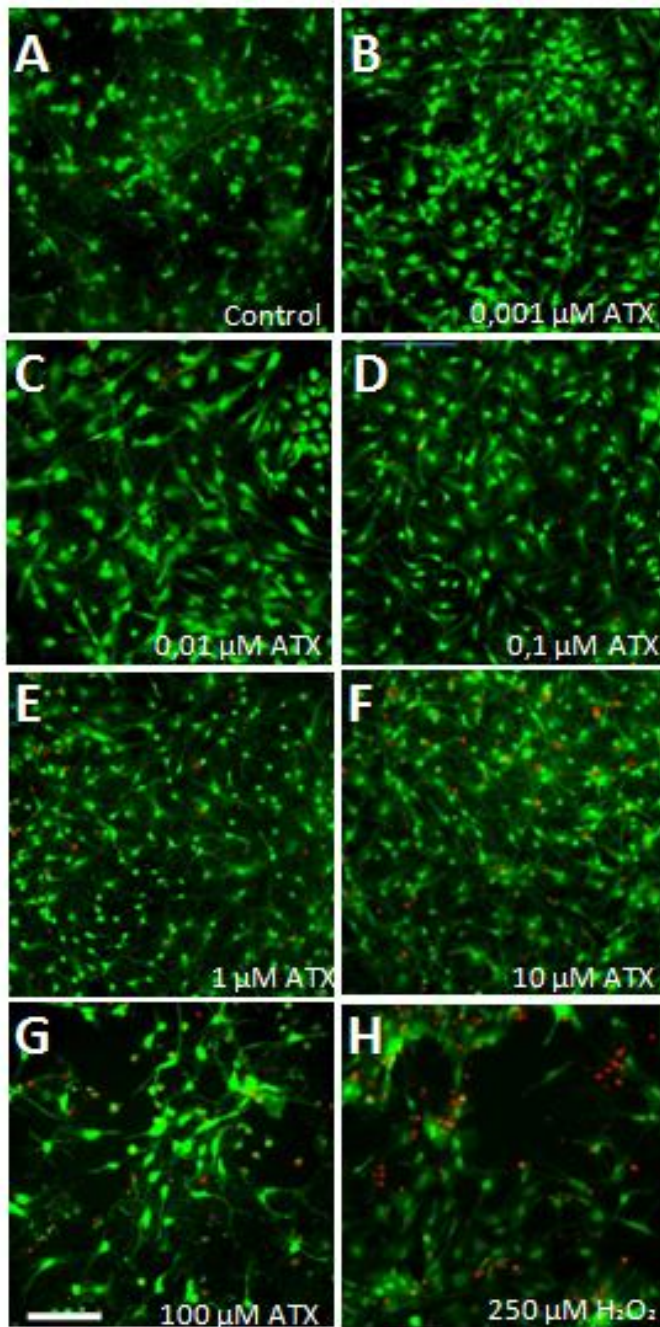


Figura 2. La ATX ($\leq 10 \mu\text{M}$) no altera la viabilidad del cultivo primario de células de hipocampo. Se ilustran imágenes representativas de los cultivos primarios hipocampales, de 13-15 DIV, obtenidas tras realizar el ensayo de viabilidad celular Live/Dead® (A-H) Las células se incubaron durante 24 h en presencia de vehículo (A), o se trataron con 0,001 μM (B), 0,01 μM (C), 0,1 μM (D), 1 μM (E), 10 μM (F) y 100 μM (G) de ATX respectivamente. En la imagen H, las células se expusieron a 250 μM de H_2O_2 . Las células vivas se identificaron por la fluorescencia verde asociada a la calceína y las células muertas por la fluorescencia roja asociada al etidio enlazado al ADN. Barra de escala blanca: 50 μm . En el gráfico (I) se muestra el análisis cuantitativo de la viabilidad celular en 6 experimentos distintos, incubados a las concentraciones de ATX indicadas (barras blancas) y en la barra gris incubadas con H_2O_2 . Los resultados se expresan como porcentajes relativos a la viabilidad del cultivo tratado con vehículo (Control). Los valores corresponden al promedio \pm SE de seis experimentos independientes (cada condición por triplicado), con diferentes cultivos neuronales. Los cultivos control mostraron 85% de la viabilidad celular en promedio. Las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales se evaluaron por ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni para comparación (* $p < 0,05$ y *** $p < 0,0001$ en comparación con el control).

2.-La ATX previene el aumento en la producción de H₂O₂ mitocondrial inducida por los AβOs.

Como se evidenció en la introducción, el aumento en la generación de ROS, tales como H₂O₂, o la disminución de los sistemas antioxidantes celular, son procesos fundamentales en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. En este estudio, probamos si la ATX podría prevenir la generación de H₂O₂ mitocondrial inducida por los AβOs. Para esto, transfectamos las neuronas con el plasmidio que codifica para la proteína HyperMito, un sensor de H₂O₂ fluorescente con destinación mitocondrial (Belousov et al., 2006; Bilan and Belousov, 2015). 24 horas después de la transfección, las células preincubadas o no con 0,1 μM ATX por 1,5 horas se trataron con 0,5 μM AβOs y se adquirieron los niveles de fluorescencia durante 20 minutos en microscopio confocal. En la Figura 3A se ilustran las imágenes representativas de neuronas transfectadas y tratadas con vehículo, que no mostraron cambios en la fluorescencia, como se ilustra al comparar las imágenes obtenidas antes de la adición del vehículo (250 segundos) y las obtenidas al final del registro (1250 segundos). Las neuronas hipocampales transfectadas respondieron al tratamiento con AβOs, induciendo un aumento significativo en la fluorescencia de HyperMito, como se ilustra en la Figura 3B, al comparar el registro obtenido antes de agregar AβOs (250 segundos) y después de la adición (1250 segundos). En contraste, las neuronas pre-incubadas con ATX Fig 3C o pre-incubadas con la ATX y tratadas con AβOs Fig. 3D, no mostraron cambios significativos en la fluorescencia de HyperMito, como se ilustra en las imágenes adquiridas antes y después del tratamiento con AβOs o vehículo, respectivamente. En la figura 3E, se ilustran las líneas temporales del promedio de los cambios de fluorescencia registrados en las neuronas transfectadas tratadas con AβOs o vehículo en presencia o ausencia de ATX. El trazo azul muestra el tratamiento con AβOs, que indujo un incremento en la producción mitocondrial de H₂O₂. Las neuronas pre-incubadas con ATX no mostraron cambios significativos con el tratamiento de AβOs (trazo verde) o vehículo (trazo rojo). En la figura 3F se ilustran en el gráfico de barras los valores relativos de fluorescencia (F_{final}/F_0) obtenidos en el final del registro de las diferentes condiciones. Estos muestran que el tratamiento con AβOs indujo un aumento significativo de la producción de H₂O₂ mitocondrial, lo cual se previene con la pre-incubación con ATX.

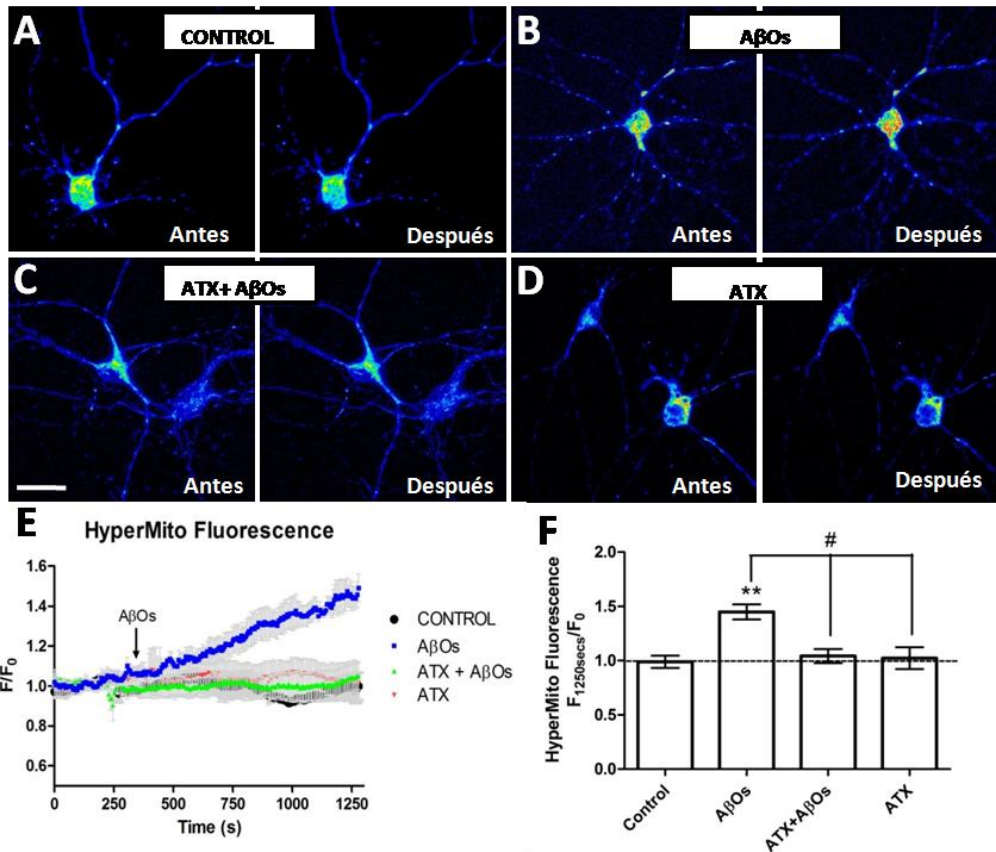


Figura 3. La ATX (0,1 μ M) impide la generaci3n de H₂O₂ mitocondrial inducida por los A β Os. En las im3genes (A-D) se ilustran en pseudo color las neuronas que expresan la prote3na HyperMito. La intensidad de fluorescencia emitida por HyperMito se ilustra en la escala de pseudo-color como rojo para la mayor intensidad, mientras que los niveles de menor intensidad se expresan por el color azul-negro. Barra de escala: 10 μ m. En la imagen de la izquierda se muestran las fotos adquiridas antes de agregar A β Os (0,5 μ M im3genes A y D) o veh3culo (250 segundos de iniciado, im3genes B y C), y a la derecha se muestra 1000 segundos despu3s de agregar A β Os (0,5 μ M) o veh3culo (1250 segundos de iniciado). El grafico (E) muestra las l3neas temporales de la emisi3n de fluorescencia de HyperMito, adquiridas en el soma neuronal despu3s de la adici3n del veh3culo (s3mbolos negros) o 0,5 μ M A β Os, en ausencia (s3mbolos azules) o presencia (s3mbolos verdes) de 0,1 M ATX pre-incubada durante 1,5 horas (s3mbolos rojos, pre-incubado con ATX y adici3n de veh3culo). Los cambios en la fluorescencia (media \pm SE) se expresan como (F/F₀), donde F₀ corresponde a la fluorescencia basal registrada en el soma antes de la adici3n de A β Os. El gr3fico ilustra los valores promedio de 2 ROI adquiridas en el soma neuronal de cuatro experimentos diferentes, cada condici3n por duplicado (n = 4). El gr3fico (F) muestra la valores de F/F₀ obtenidas al final del experimento (tiempo de 1250 s) de cada condici3n. Las barras representan la media \pm SE. Las diferencias estad3sticamente significativas entre las condiciones experimentales se evaluaron por ANOVA de una v3a seguido del test Bonferroni de comparaci3n (** p < 0,001 en comparaci3n con el control; #p < 0,05 en comparaci3n con la condici3n indicada).

3. La ATX previene la translocación nuclear de NFATc4-eGFP inducida por los AβOs.

Un requisito esencial para los procesos de plasticidad sináptica que subyacen el aprendizaje y la memoria es el incremento en la concentración de Ca^{2+} libre, ya que este desempeña un papel central en la transcripción génica dependiente de Ca^{2+} . No es de extrañar entonces, que desde temprano en la enfermedad de Alzheimer existan defectos en el manejo y señalización dependiente de Ca^{2+} , que forman parte de la patogénesis de la enfermedad. Uno de estos es la activación de la fosfatasa dependiente de Ca^{2+} , calcineurina (CaN), quien promueve la activación río abajo del factor transcripcional NFAT. Ambos participan en las vías de señalización de Ca^{2+} desencadenadas por actividad sináptica, regulando el desarrollo dendrítico y axonal. La isoforma NFATc4, en particular, es activada por señales de Ca^{2+} prolongadas, y estudios *in vivo*, *in vitro*, y con tejidos *postmortem* de la EA, han observado la activación de NFATc4 en el desarrollo de la enfermedad. La activación de NFATc4 por el péptido Aβ induce importantes cambios morfológicos en las neuronas, causando distrofia neurítica, pérdida de la ramificación dendrítica y disminución de la densidad de espinas dendríticas. De hecho, estos cambios pudieron ser prevenidos y revertidos por estrategias que impidan la activación de la vía CaN/NFAT.

Por esto investigamos si la preincubación con ATX podría prevenir la activación de NFATc4 por los AβOs. Para esto, determinamos la translocación nuclear de la proteína de fusión NFATc4-eGFP, en neuronas transfectadas en cultivo primario de células hipocampales, 24 horas después de la transfección, las células se pre-incubaron con 0,1 μM ATX por 1,5 horas y tratadas con AβOs o vehículo por 6 horas. Como se ilustra en la Fig. 4A las neuronas control mostraron principalmente localización citoplasmática de NFATc4, revelado por la fluorescencia verde del GFP. En las neuronas tratadas 6 horas con AβOs, se observó una mayor localización nuclear de la proteína NFATc4-eGFP, Fig. 4B. La pre-incubación con la ATX no alteró la distribución citoplasmática de NFATc4-eGFP, tanto en las células tratadas con vehículo Fig. 4C o en las tratadas con los AβOs por 6 horas Fig. 4D. En la figura Fig. 4E, se muestra el promedio del resultado de la cuantificación de 4 experimentos, revelando que la incubación con AβOs por 6 horas incrementó en aproximadamente 3 veces la intensidad de fluorescencia núcleo/citoplasma relativa a las neuronas control. Este incremento no se observó en las neuronas pre-incubadas con la ATX.

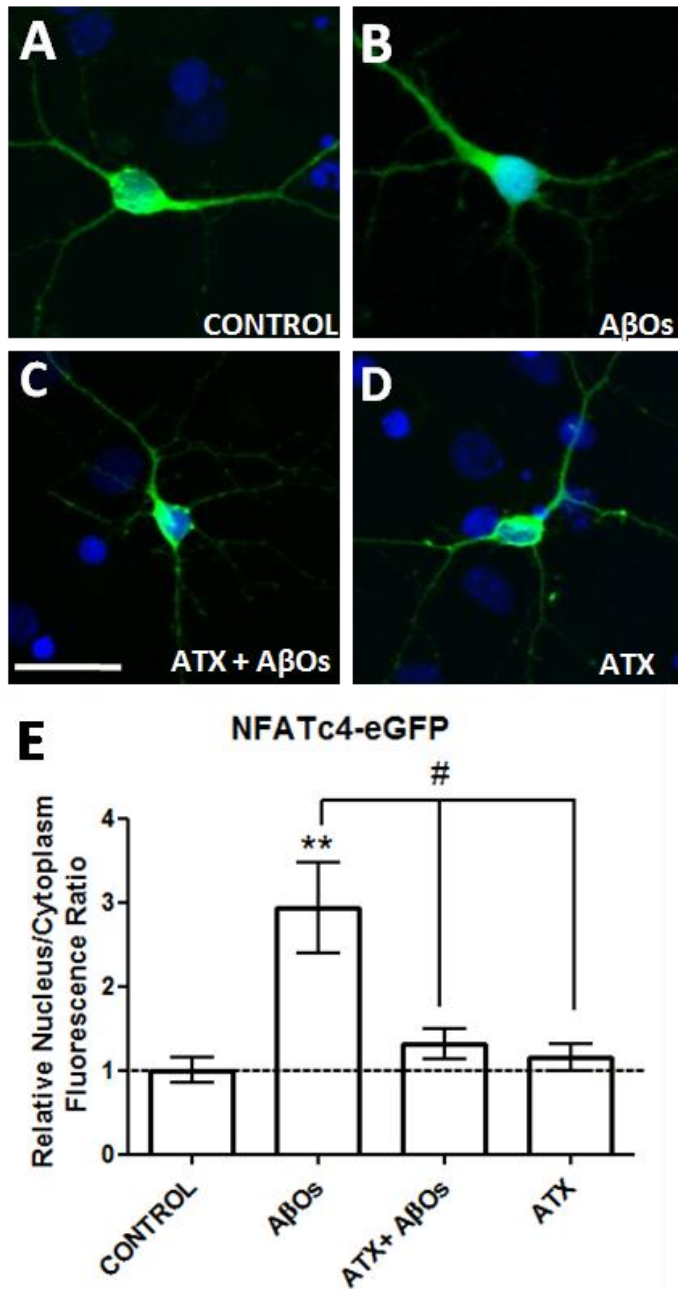


Figura 4. La ATX previene la translocación nuclear de NFATc4-eGFP inducida por los AβOs. Se transfectaron cultivos primarios de neuronas hipocámpales (13-15 DIV) con el plasmidio codificante de la proteína NFATc4 fusionada a GFP, 24 horas antes de realizar los experimentos. Los Paneles A-D muestran imágenes representativas de la distribución intracelular de NFATc4-GFP (fluorescencia verde) y de la tinción nuclear con Hoechst (fluorescencia azul). En (A) se trataron con vehículo, en (B) se trataron por 6 horas con 0,5 μM AβOs, en (C) se pre-incubaron con 0,1 μM ATX durante 1,5 h antes de la adición de AβOs y en (D) incubadas con ATX 0,1 μM por 7,5 h. Barra de escala: 10 μm. El Panel E muestra la cuantificación de cuatro experimentos diferentes expresados como el promedio ± SE que representan la razón

de la intensidad de fluorescencia nuclear/citoplásmica, relativa a las células control tratadas con vehículo (15-25 neuronas se analizaron por condición). Las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales se evaluaron por ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni de comparación (** p <0,001 en comparación con el control; #p <0,05 en comparación con las condiciones indicadas).

4.-La ATX previene la disminución de la expresión del RNAm de RyR2 inducida por los AβOs.

En resultados previos del laboratorio mostramos que la neurotrofina BDNF regula positivamente la expresión del receptor de ryanodina, en cultivo primario de células

hipocampales, mientras que los A β Os disminuyen la expresión de RyR2 (Adasme et al., 2011; Paula-Lima et al., 2011).

En concordancia con estos resultados, en la Figura 5 se muestra los resultados de los experimentos de qPCR, que revelan que la incubación por 6 horas con 0,5 μ M A β Os disminuye significativamente los niveles del RNAm de RyR2, mientras que en las células pre-incubadas con 0,1 μ M ATX, Fig 5A o con 10 mM NAC, Fig. 5B, no modificaron los niveles del mensajero previniendo el efecto de los A β Os sobre la expresión de RyR2.

Estos resultados pueden sugerir una relación entre la generación de ROS mitocondrial y los efectos en la expresión génica ejemplificados en la expresión del RNAm de RyR2.

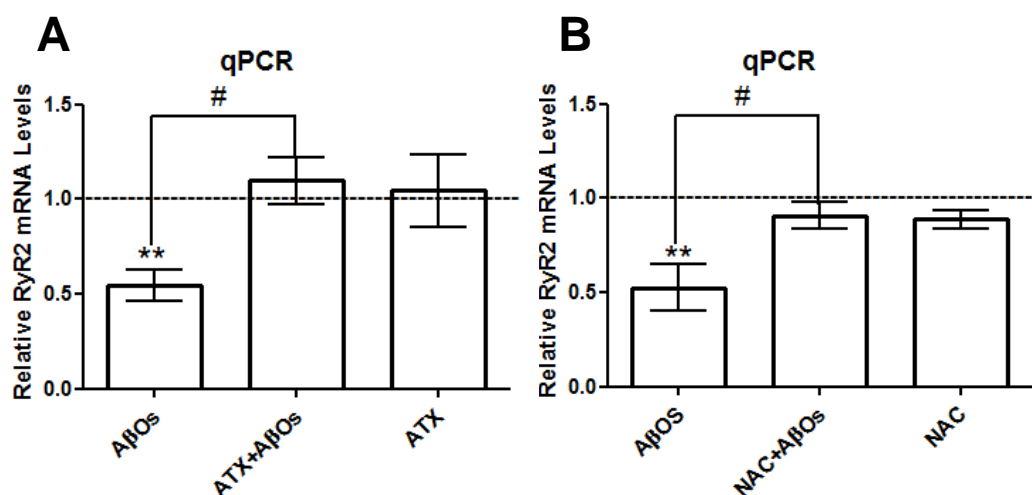


Figura 5. La ATX previene la disminución del RNAm de RyR2 inducida por los A β Os.

En el gráfico A, las células de cultivos primarios de hipocampo, se pre-incubaron con ATX 0,1 μ M durante 1,5 horas, antes de la adición de A β Os 0,5 μ M durante 6 horas. Luego se determinaron los niveles del RNAm de RyR2, mediante qRT-PCR, el nivel de mensajeros se normalizó respecto de los niveles de RNAm de β -actina y se expresaron como veces relativas al control (vehículo). De manera análoga en el gráfico B, las células de cultivos primarios de neuronas de hipocampo y se pre-incubaron con NAC 10 mM durante 30 minutos, antes de la adición de A β Os 0,5 μ M durante 6 horas. Luego se determinaron los niveles del RNAm de RyR2 de igual manera que en el gráfico A. Los valores representados en las barras muestran la media \pm SE de seis diferentes experimentos. Las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales se evaluaron por ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni de comparación para múltiples variables (** $p < 0,001$ en comparación con el control; # $p < 0,05$ en comparación con las condiciones indicadas).

Conclusiones

En resumen los resultados presentados nos permiten concluir:

❖ La ATX a concentraciones $<10 \mu\text{M}$ no alteró significativamente la viabilidad del cultivo primario de células hipocampales (Fig 2). Además en concordancia con resultados previos del laboratorio, que utilizaron otros antioxidantes, la pre-incubación con ATX ($0,1 \mu\text{M}$) previene la producción de H_2O_2 mitocondrial inducido por A β Os en cultivo primario de células hipocampales (Fig 3).

❖ La pre-incubación de ATX ($0,1 \mu\text{M}$) previno la translocación al núcleo del factor transcripcional NFATc4 inducida por A β Os en cultivo primario de células hipocampales. Lo que sugiere que la activación de la vía CaN/NFAT (Fig. 4), depende ya sea directa o indirectamente del estrés oxidativo inducido por los A β Os.

❖ Por último la preincubación con ATX ($0,1 \mu\text{M}$) previno la disminución de la expresión de la isoforma 2 del receptor de ryanodina 2 (RyR2) inducida por A β Os en cultivo primario de células hipocampales(Fig. 5). Aunque, cabe destacar que con estos resultados no es posible establecer una relación directa de la expresión del RNAm de RyR2, con la inhibición de la translocación del factor transcripcional NFATc4.

Discusión.

A la fecha, todos los esfuerzos para desarrollar terapias efectivas basadas en alguna de las vías específicas relacionadas a la EA, pese a los primeros resultados positivos en etapas preclínicas, no han sido efectivas en ensayos clínicos. Para explicar esta desconexión se postula que la ineffectividad en el tratamiento para los pacientes con EA de las nuevas estrategias actualmente ensayadas, podría deberse a que se aplica muy tarde, cuando ya ha sucedido una significativa pérdida neuronal en el cerebro (Sperling et al., 2011). Para estas etapas, las estrategias que mantendrían el potencial de tratar a los pacientes con la EA, son únicamente las terapias de reemplazo celular. Estas están relacionadas al uso de células madre embrionarias o células neuronales derivadas de células madre pluripotenciales inducidas, técnicas que aun están en desarrollo y para las cuales los avances que se puedan lograr en la clínica primero deberán pasar varias etapas de seguridad y eficacia (Tong et al., 2015), por lo tanto, es necesario seguir en la búsqueda de alternativas con

compuestos clásicos, enfocándose en demostrar que puedan modular la patogénesis de la enfermedad.

En este trabajo, estudiamos las propiedades protectoras de la ATX contra los efectos dañinos de los A β O en cultivo primario de células hipocampales. La ATX es clasificada como un antioxidante perteneciente a la familia de los carotenoides, entre sus principales propiedades se cuentan la funcionar como un "atrapador" de radicales y especies oxidantes. Pese a que es relativamente segura, en el proceso de atrapamiento de radicales la ATX puede ser transformada en una sustancia pro-oxidante, formando el radical carotenil por la pérdida de un hidrógeno. Además, a concentraciones altas puede alterar los sistemas de señalización redox normales de la célula, ambos procesos requieren estudiar con cuidado sus posibles aplicaciones y pueden explicar la toxicidad observada a altas concentraciones (100 μ M usada en el trabajo) y algunas observaciones de efectos tóxicos, realizadas en otros estudios que probaron los beneficios de antioxidantes lipofílicos similares en principio a la ATX (Miller III et al., 2005).

Además del papel de los ROS y estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer, también esta se destaca por un incremento sostenido en los niveles de Ca²⁺ intracelular. En trabajos previos del laboratorio se ha probado con el antioxidante NAC, un precursor del principal sistema antioxidante endógeno glutatión, en células de cultivo primario incubadas con NAC 10 mM, se previno completamente el aumento en la generación de señales de Ca²⁺ dependientes de RyR y la fragmentación mitocondrial inducida por el tratamiento con A β O (Paula-Lima et al., 2011; SanMartin et al., 2012). La administración de NAC en el agua dada a ratones transgénicos de la enfermedad de Alzheimer (APP/PS1), previno la oxidación y nitrosilación de proteínas en el cerebro (Huang et al., 2010). Estos resultados enfatizan la participación de ROS en la mantención de las señales de Ca²⁺ inducidas por los A β O. Por otra parte, el tratamiento con quelantes de Ca²⁺ como BAPTA-AM, previene el aumento en la generación de ROS (De Felice et al., 2007), complementando la interrelación mutua entre las ROS y las señales de Ca²⁺. En este contexto el RyR se destaca como un importante mediador, ya que su actividad y expresión son reguladas por vías dependientes de ROS y Ca²⁺, debido a la presencia de residuos de cisteínas que pueden ser reversiblemente modificadas dependiendo del estado redox celular. La oxidación de éstas cisteínas aumenta la actividad de RyR inducida por Ca²⁺ (Marengo et al., 1998). En el presente trabajo, mostramos que la ATX, previene el aumento en la producción de H₂O₂ mitocondrial inducido por los A β O. También demostramos, que

tanto la ATX, como el antioxidante general NAC previenen la disminución en los niveles de RNAm de RyR2 inducida por los A β Os. Por lo tanto, es probable que la ATX y otros antioxidantes modulen y/o prevenga el estrés oxidativo desencadenado por los A β Os y que afectan la liberación de Ca $^{2+}$ mediada por RyR, impidiendo la activación de vías dependientes de Ca $^{2+}$ que inducen la muerte o daño neuronal. Uno de los daños más importantes son los defectos en la función mitocondrial, característicos en el desarrollo de los procesos de neurodegeneración y envejecimiento. El daño de las mitocondria puede desencadenar dos eventos dañinos y a la vez: la mayor producción de radicales libres y fallas metabólicas que disminuyen la principal fuente de energía celular, procesos que forman parte importante de la patogénesis en la EA (Mattson et al., 2008; Zhang et al., 2016).

Las fallas en la regulación de la transcripción dependiente de Ca $^{2+}$ desempeñan un rol crítico en la plasticidad sináptica y los defectos en el establecimiento de la memoria. Los A β Os inducen la activación de la calcineurina y su substrato el factor transcripcional NFAT. La activación de esta vía, incluso en la ausencia del péptido A β , induce los mismos cambios estructurales: pérdida de espinas, distrofia neurítica y pérdida de la arborización dendrítica (Wu et al., 2010). La calcineurina es activada reversiblemente por la unión a Ca $^{2+}$ /CaM. Sin embargo, varios estudios muestran que la calcineurina también es sensible al estado redox celular, mostrando que la oxidación de esta inhibe fuertemente su actividad fosfatasa (Klann and Thiels, 1999). En el desarrollo de los procesos de neurodegeneración, prevalece la activación de la calcineurina, debido al aumento sostenido en los niveles de Ca $^{2+}$ intracelular presente en estas enfermedades, o mediada por la generación de formas proteolizadas de la calcineurina que presentan mayor actividad, generadas por la actividad de caspasas o proteasas dependientes de Ca $^{2+}$, como los son las calpains implicadas en el desarrollo de las enfermedades cardiacas o neurodegenerativas (Liu et al., 2005; Mukherjee and Soto, 2011). En el presente trabajo logramos mostrar que la ATX puede regular positivamente este proceso, ya que la pre incubación con esta, previno la activación de esta vía inducida por los A β Os, evitando la activación aberrante de esta señalización celular.

En resumen, en este trabajo demostramos que la ATX 0,1 μ M puede prevenir la translocación nuclear de NFATc4 inducida por los A β Os, sugiriendo que la vía CaN/NFAT, depende ya sea directa o indirectamente del estrés oxidativo inducido por los A β Os. Además, mostramos que la ATX puede prevenir la disminución de los niveles del RNAm de RyR2, aunque con los resultados mostrados no es posible establecer una relación directa de esto con la inhibición de la translocación del factor transcripcional NFATc4. Trabajos previos del laboratorio muestran que los niveles de expresión de RyR2 desempeñan un rol importante en los procesos de plasticidad sináptica hipocampal, y su disminución mediada por los A β Os contribuye a sus efectos neurotóxicos. La ATX por sus propiedades antioxidantes, al menos en este modelo *in vitro*, puede prevenir los efectos dañinos de los A β Os en la expresión génica, los cuales son mediados, al menos en parte, por la vía CaN/NFAT. En la Figura 6 se muestra un esquema que ilustra el mecanismo propuesto para los efectos de la ATX y la modulación que producen en la señalización desencadenada por los A β Os.

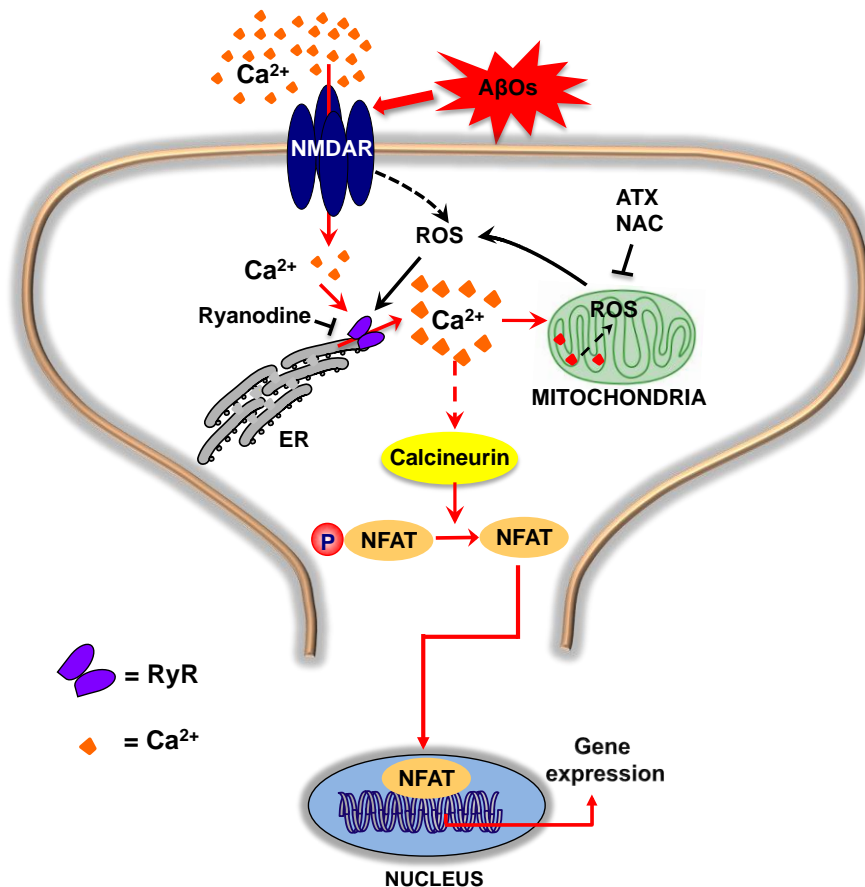


Figura 6. Esquema que muestra el mecanismo propuesto para explicar los efectos protectores de la ATX contra los efectos deletéreos de los AβOs. Los AβOs inducen la generación de señales anormales Ca²⁺ en neuronas. Estas señales surgen de la entrada de Ca²⁺ a través de los receptores NMDA en la membrana plasmática. La entrada de Ca²⁺ desde este canal es posteriormente amplificada a través de los RyR, co-estimulados por Ca²⁺ y ROS generados en respuesta a los AβOs (Paula-lima 2011). Además de la activación y liberación de Ca²⁺ mediada por RyR, otros resultados han mostrado que un antagonista específico de RyR, la ryanodina, bloquea el aumento de la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria. Estas señales anormales de Ca²⁺ promueven la translocación nuclear de NFATc4, que altera la expresión génica, la morfología de las neuronas y la densidad de espinas dendríticas. Por otra parte, la generación de ROS y RNS, controlan la excitabilidad y fuerza sináptica, mediante la regulación de la función de diversos tipos de canales iónicos, incluyendo al RyR, que disminuye su actividad en condiciones redox reductoras. La ATX y otros antioxidantes como el NAC, funcionan como atrapadores de ROS, o aumentando las defensas antioxidantes, impedirían las señales anormales de Ca²⁺ mediadas por la liberación de Ca²⁺ desde RyR inducidas por los AβOs. Esto evitaría la translocación nuclear de NFAT que se ha relacionado con varios de los cambios perjudiciales en la expresión génica, la morfología neuronal y la densidad de espinas dendríticas, que son claves en la funcionalidad de los procesos de memoria y aprendizaje.

Proyecciones.

El aumento de la expectativa de vida está entre los mayores logros que la humanidad ha conseguido, y se debe casi sin dudas al desarrollo de la ciencia y la tecnología aplicadas a mejorar la salud. Sin embargo, lamentablemente, este logro ha traído consigo un costo adicional; el aumento en la prevalencia de varias enfermedades asociadas al envejecimiento, tales como enfermedades cardíacas, cáncer y la EA (Niccoli and Partridge, 2012). Estos representan no sólo un creciente problema médico, sino que social, económico y cultural, que debemos tratar con urgencia para el devenir de las próximas décadas (Harper, 2014; Hurd et al., 2013; Rae et al., 2010). El objetivo es lograr un envejecimiento saludable, basado en una aproximación integral, resultante de la interacción multidimensional entre salud física, salud mental, independencia de vida diaria, integración social, soporte familiar e independencia económica. Lamentablemente, el envejecimiento se ha convertido en un padecimiento, también en parte gracias a la medicina, que no se ha centrado en mejorar la calidad de vida de esta etapa, sino más bien en retrasar la muerte de estos sujetos. La visión del envejecimiento saludable, que va más allá de lo médico, debe quedar integrada en la actual línea programática, y sumarse a los esfuerzos de la medicina centrados en la cobertura diagnóstica y terapéutica de enfermedades no transmisibles que afectan al envejecido para que así se logre recuperar los valores perdidos de esta etapa de la vida.

Una de las maneras de abordar este problema, basados en las habilidades que se puede aportar desde la academia y ciencia básica, es continuar y aumentar la investigación de los mecanismos celulares y moleculares que desencadenan el envejecimiento, que conllevaran al descubrimiento de blancos y terapias que retrasen, prevengan y/o incluso reviertan los procesos dañinos. En los últimos años este tema ha congregado un gran interés de discusión e investigación que han mostrado que las intervenciones más efectivas convergen en sólo unos pocos procesos celulares, que de traducirse en los estudios para la población general muestran que un panorama más optimista para el futuro, en especial en intervenciones desde edades tempranas (de Cabo et al., 2014), logrando esta vez no tan solo aumentar la longevidad, sino también la expectativa de vida saludable (Bansal et al., 2015; Kaeberlein et al., 2015). Para esto, el estudio de compuestos naturales (como la ATX) o sus derivados, promete, como lo ha hecho en la historia humana, ofrecer alternativas de futura proyección no solamente en la terapéutica, como también en la prevención de enfermedades asociadas al envejecimiento. Es necesario, en este sentido, seguir investigando las propiedades de este tipo de compuestos en otros modelos.

Bibliografía

- Abdul, H.M., Sama, M.A., Furman, J.L., Mathis, D.M., Beckett, T.L., Weidner, A.M., Patel, E.S., Baig, I., Murphy, M.P., 3rd, L.H., et al. (2009). Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in Calcineurin/NFAT signaling. *J. Neurosci.* *29*, 12957–12969.
- Abdul, H.M., Furman, J.L., Sama, M.A., Mathis, D.M., and Norris, C.M. (2010). NFATs and Alzheimer's Disease. *Mol. Cell. Pharmacol.* *2*, 7–14.
- Abraham, N.G., Junge, J.M., and Drummond, G.S. (2015). Translational Significance of Heme Oxygenase in Obesity and Metabolic Syndrome. *Trends Pharmacol. Sci.* *xx*, 1–20.
- Adasme, T., Haeger, P., Paula-Lima, A.C., Espinoza, I., Casas-Alarcón, M.M., Carrasco, M.A., and Hidalgo, C. (2011). Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3029–3034.
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E., and Smith, S.O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 561–567.
- Andrieu, S., Coley, N., Lovestone, S., Aisen, P.S., and Vellas, B. (2015). Prevention of sporadic Alzheimer's disease: lessons learned from clinical trials and future directions. *Lancet Neurol.* *14*, 926–944.
- Apostolova, N., and Victor, V.M. (2015). Molecular Strategies for Targeting Antioxidants to Mitochondria: Therapeutic Implications. *Antioxid. Redox Signal.* *22*, 686–729.
- Association, A. (2015). 2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's Dement.* *11*.
- Bansal, A., Zhu, L.J., Yen, K., and Tissenbaum, H. A. (2015). Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, E277–E286.
- Barnham, K.J., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* *3*, 205–214.
- Belousov, V. V., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Staroverov, D.B., Shakhbazov, K.S., Terskikh, A. V., and Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat. Methods* *3*, 281–286.
- von Bernhardt, R., and Eugenín, J. (2012). Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* *16*, 974–1031.
- Berridge, M.J. (2006). Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* *40*, 405–412.
- Berridge, M.J. (2010). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* *459*, 441–449.
- Bilan, D.S., and Belousov, V. V. (2015). HyPer family probes: state of the art. *Antioxidants Redox Signal.* 1–52.
- Birks, J. (2012). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease (Review). *Cochrane Libr.* 1–51.

- Brigelius-Flohe, R., and Flohé, L. (2011). Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2335–2381.
- Bull, R., Finkelstein, J.P., Humeres, A., Behrens, M.I., and Hidalgo, C. (2007). Effects of ATP, Mg²⁺, and redox agents on the Ca²⁺ dependence of RyR channels from rat brain cortex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, 162–171.
- Bush, A.I. (2003). The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 26, 207–214.
- Butterfield, D.A., Swomley, A.M., and Sultana, R. (2013). Amyloid β -peptide (1–42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: Importance in disease pathogenesis and progression. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 823–835.
- Carrasco, M.A., and Hidalgo, C. (2006). Calcium microdomains and gene expression in neurons and skeletal muscle cells. *Cell Calcium* 40, 575–583.
- Cummings, J.L. (2004). Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 56–67.
- Cummings, J.L., Morstorf, T., and Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Res. Ther.* 6, 1–7.
- de Cabo, R., Carmona-Gutierrez, D., Bernier, M., Hall, M.N., and Madeo, F. (2014). The Search for Antiaging Interventions: From Elixirs to Fasting Regimens. *Cell* 157, 1515–1526.
- Decker, H., Jürgensen, S., Adrover, M.F., Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., Klein, W.L., Epstein, A.L., De Felice, F.G., Jerusalinsky, D., and Ferreira, S.T. (2010). N-Methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- β peptide oligomers. *J. Neurochem.* 115, 1520–1529.
- Delrieu, J., Ousset, P.J., Caillaud, C., and Vellas, B. (2012). "Clinical trials in Alzheimer's disease": Immunotherapy approaches. *J. Neurochem.* 120, 186–193.
- Domenico, F. Di, Barone, E., Perluigi, M., and Butterfield, D.A. (2015). Strategy to reduce free radical species in Alzheimer's disease: an update of selected antioxidants. *Expert Rev. Neurother.* 15, 19–40.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Dröge, W., and Schipper, H.M. (2007). Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 361–370.
- De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., and Klein, W.L. (2007). A β Oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.* 282, 11590–11601.
- Ferreira, S.T., Lourenco, M. V., Oliveira, M.M., and De Felice, F.G. (2015). Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 1–17.
- Fill, M., and Copello, J. A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* 82, 893–922.
- Forny-Germano, L., Lyra E. Silva, N.M., Batista, A.F., Brito-Moreira, J., Gralle, M., Boehnke, S.E., Coe, B.C., Lablans, A., Marques, S.A., Martinez, A.M.B., et al. (2014). Alzheimer's Disease-Like Pathology Induced by Amyloid- Oligomers in Nonhuman Primates. *J. Neurosci.* 34, 13629–13643.

- Fotuhi, M., Do, D., and Jack, C. (2012). Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nat. Rev. Neurol.* *8*, 189–202.
- Giordano, C.R., Terlecky, L.J., Bollig-Fischer, A., Walton, P.A., and Terlecky, S.R. (2014). Amyloid- β neuroprotection mediated by a targeted antioxidant. *Sci. Rep.* 1–9.
- Glabe, C.G. (2008). Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* *283*, 29639–29643.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G. a, and Klein, W.L. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10417–10422.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.-C., Zaidi, M.S., and Wisniewski, H.M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* *261*, 6084–6089.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 101–112.
- Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 505–513.
- Handoko, M., Grant, M., Kuskowski, M., Zahs, K.R., Wallin, A., Blennow, K., and Ashe, K.H. (2013). Correlation of specific amyloid- β oligomers with tau in cerebrospinal fluid from cognitively normal older adults. *JAMA Neurol.* *70*, 594–599.
- Harper, S. (2014). Economic and social implications of aging. *Science (80-.)*. *346*, 587–591.
- Hernández-Marin, E., Barbosa, A., and Martínez, A. (2012). The Metal Cation Chelating Capacity of Astaxanthin. Does This Have Any Influence on Antiradical Activity? *Molecules* *17*, 1039–1054.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, a B., Kress, Y., Vinters, H. V, Tabaton, M., et al. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *21*, 3017–3023.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* *17*, 2205–2232.
- Hong, S., Ostaszewski, B.L., Yang, T., O'Malley, T.T., Jin, M., Yanagisawa, K., Li, S., Bartels, T., and Selkoe, D.J. (2014). Soluble A β oligomers are rapidly sequestered from brain ISF in vivo and bind GM1 ganglioside on cellular membranes. *Neuron* *82*, 308–319.
- Huang, Q., Aluise, C.D., Joshi, G., Sultana, R., St. Clair, D.K., Markesbery, W.R., and Butterfield, D.A. (2010). Potential in vivo amelioration by N-Acetyl-L-cysteine of oxidative stress in brain in human double mutant APP/PS-1 knock-in mice: Toward therapeutic modulation of mild cognitive impairment. *J. Neurosci. Res.* *88*, 2618–2629.
- Hudry, E., Wu, H.-Y., Arbel-Ornath, M., Hashimoto, T., Matsouaka, R., Fan, Z., Spires-Jones, T.L., Betensky, R. A., Bacskai, B.J., and Hyman, B.T. (2012). Inhibition of the NFAT Pathway Alleviates Amyloid Beta Neurotoxicity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* *32*, 3176–3192.
- Hurd, M.D., Martorell, P., Delavande, A., Mullen, K.J., and Langa, K.M. (2013). Monetary Costs of Dementia in the United States. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1326–1334.
- Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., and Watanabe, H. (2006). Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. *J. Nat. Prod.* 443–449.

- Ichida, M., and Finkel, T. (2001). Ras Regulates NFAT3 Activity in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 3524–3530.
- Ikeda, Y., Tsuji, S., Satoh, A., Ishikura, M., Shirasawa, T., and Shimizu, T. (2008). Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 1730–1740.
- Iqbal, K., Liu, F., and Gong, C. X. (2016). Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 15–27.
- Jana, M.K., Cappai, R., Pham, C.L.L., and Ciccotosto, G.D. (2016). Membrane bound tetramer and trimer A β oligomeric species correlate with toxicity towards cultured neurons. *J. Neurochem.* 136, 594–608.
- Jarosz-Griffiths, H.H., Noble, E., Rushworth, J. V., and Hooper, N.M. (2016). Amyloid- β receptors: the good, the bad and the prion protein. *J. Biol. Chem.* 291, 3174–3183.
- Kaeblerlein, M., Rabinovitch, P.S., and Martin, G.M. (2015). Healthy aging: The ultimate preventative medicine. *Science* (80-.). 350, 1191–1193.
- Karran, E., Mercken, M., and Strooper, B. De (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 698–712.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X., and Peck, A. (1988). Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol.* 23, 138–144.
- Kelliher, M., Fastbom, J., Cowburn, R., Bonkale, W., Ohm, T., Ravid, R., Sorrentino, V., and O'Neill, C. (1999). Alterations in the Ryanodine Receptor Calcium Release Channel Correlate with Alzheimer's Disease Neurofibrillary and beta-amyloid Pathologies. *Neuroscience* 92, 499–513.
- Kim, Y.J., Kim, Y.A., and Yokozawa, T. (2009). Protection against oxidative stress, inflammation, and apoptosis of high-glucose-exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8793–8797.
- Kishida, K.T., and Klann, E. (2007). Sources and Targets of Reactive Oxygen Species in Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 233–244.
- Klann, E., and Thiels, E. (1999). Modulation of protein kinases and protein phosphatases by reactive oxygen species: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 23, 359–376.
- LaFerla, F.M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 862–872.
- Leal, S.L., and Yassa, M.A. (2015). Neurocognitive Aging and the Hippocampus across Species. *Trends Neurosci.* 1–13.
- Li, S., Hong, S., Shepardson, N.E., Walsh, D.M., Shankar, G.M., and Selkoe, D. (2009). Soluble Oligomers of Amyloid beta Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake. *Neuron* 62, 788–801.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Oda, Y., Tomizawa, K., and Gong, C. X. (2005). Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. *J. Biol. Chem.* 280, 37755–37762.

- Ma, T., Hoeffler, C.A., Wong, H., Massaad, C.A., Zhou, P., Iadecola, C., Murphy, M.P., Pautler, R.G., and Klann, E. (2011). Amyloid -Induced Impairments in Hippocampal Synaptic Plasticity Are Rescued by Decreasing Mitochondrial Superoxide. *J. Neurosci.* *31*, 5589–5595.
- Marengo, J.J., Hidalgo, C., and Bull, R. (1998). Sulfhydryl Oxidation Modifies the Calcium Dependence of Ryanodine-Sensitive Calcium Channels of Excitable Cells. *Biophys. J.* *74*, 1263–1277.
- Massaad, C.A., and Klann, E. (2011). Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 2013–2054.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *82*, 4245–4249.
- Mattson, M.P., and Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 278–294.
- Mattson, M.P., Gleichmann, M., and Cheng, A. (2008). Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* *60*, 748–766.
- Miller III, E.R., Pastor-barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R.A., Appel, L.J., and Guallar, E. (2005). Review Meta-Analysis : High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase all Cause Mortality. *Ann. Intern. Med.* *142*, 37–46.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.-Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of A beta-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* *20*, 4050–4058.
- Mukherjee, A., and Soto, C. (2011). Role of calcineurin in neurodegeneration produced by misfolded proteins and endoplasmic reticulum stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* *23*, 223–230.
- Niccoli, T., and Partridge, L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Curr. Biol.* *22*, R741–R752.
- Norris, C.M., Kadish, I., Blalock, E.M., Chen, K.-C., Thibault, V., Porter, N.M., Landfield, P.W., and Kraner, S.D. (2005). Calcineurin triggers reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer's models. *J. Neurosci.* *25*, 4649–4658.
- Paula-Lima, A.C., Adasme, T., SanMartín, C., Sebollela, A., Hetz, C., Carrasco, M.A., Ferreira, S.T., and Hidalgo, C. (2011). Amyloid β -peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca²⁺ release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1209–1223.
- Paula-Lima, A.C., Brito-Moreira, J., and Ferreira, S.T. (2013). Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *126*, 191–202.
- Petersen, R.C. (2003). Mild cognitive impairment clinical trials. *Nat. Rev. Drug Discov.* *2*, 646–653.
- Phillip, J.M., Aifuwa, I., Walston, J., and Wirtz, D. (2015). The Mechanobiology of Aging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *113*–141.
- Querfurth, H.W., and Laferla, F.M. (2010). Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* *329*–344.
- Rae, M.J., Butler, R.N., Campisi, J., De Grey, A.D.N.J., Finch, C.E., Gough, M., Martin, G.M., Vijg, J., Perrott, K.M., and Logan, B.J. (2010). The Demographic and Biomedical Case for Late-Life Interventions in Aging. *Sci. Transl. Med.* *2*, 1–7.

Riquelme, D., Alvarez, A., Leal, N., Adasme, T., Espinoza, I., Valdes, A.J., Troncoso, N., Hartel, S., Hidalgo, J., Hidalgo, C., et al. (2011). High-Frequency Field Stimulation of Primary Neurons Enhances Ryanodine-Receptor-Mediated Ca²⁺ Release and Generates Hydrogen Peroxide ,Which Jontly Stimulate NF-kB Activity. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1245–1259.

Rodrigues, E., Mariutti, L.R.B., and Mercadante, A.Z. (2012). Scavenging capacity of marine carotenoids against reactive oxygen and nitrogen species in a membrane-mimicking system. *Mar. Drugs* *10*, 1784–1798.

SanMartin, C., Adasme, T., Hidalgo, C., and Paula-Lima, A.C. (2012). The antioxidant N-acetylcysteine prevents the mitochondrial fragmentation induced by soluble amyloid- β peptide oligomers. *Neurodegener. Dis.* *10*, 34–37.

Saw, C.L.L., Yang, A.Y., Guo, Y., and Kong, A.-N.T. (2013). Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway. *Food Chem. Toxicol.* *62*, 869–875.

Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* *24*, R453–R462.

Schmidt, H.H.H.W., Stocker, R., Vollbracht, C., Paulsen, G., Riley, D., Daiber, A., and Cuadrado, A. (2015). Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid. Redox Signal.* *00*.

Schwartz, N., Schohl, A., and Ruthazer, E.S. (2009). Neural Activity Regulates Synaptic Properties and Dendritic Structure In Vivo through Calcineurin/NFAT Signaling. *Neuron* *62*, 655–669.

Sebollala, A., Freitas-Correa, L., Oliveira, F.F., Paula-Lima, A.C., Saraiva, L.M., Martins, S.M., Mota, L.D., Torres, C., Alves-Leon, S., de Souza, J.M., et al. (2012). Amyloid- β oligomers induce differential gene expression in adult human brain slices. *J. Biol. Chem.* *287*, 7436–7445.

Selkoe, D.J. (1991). The Molecular Pathology of Alzheimer ' s Disease. *Neuron* *6*, 487–498.

Shen, H., Kuo, C.-C., Chou, J., Delvolve, A., Jackson, S.N., Post, J., Woods, A.S., Hoffer, B.J., Wang, Y., and Harvey, B.K. (2009). Astaxanthin reduces ischemic brain injury in adult rats. *FASEB J.* *23*, 1958–1968.

Sperling, R.A., Jack Jr, C.R., and Aisen, P.S. (2011). Testing the Right Target and Right Drug at the Right Stage. *Sci. Transl. Med.* *3*, 1–6.

Strooper, B. De, and Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer ' s Disease. *Cell* *164*, 603–615.

Tong, L.M., Fong, H., and Huang, Y. (2015). Stem cell therapy for Alzheimer's disease and related disorders: current status and future perspectives. *Exp. Mol. Med.* *47*, e151.

Ulrich, J.D., Kim, M.-S., Houlihan, P.R., Shutov, L.P., Mohapatra, D.P., Strack, S., and Usachev, Y.M. (2012). Distinct Activation Properties of the Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) Isoforms NFATc3 and NFATc4 in Neurons. *J. Biol. Chem.* *287*, 37594–37609.

Veal, E., and Day, A. (2011). Hydrogen Peroxide as a Signaling Molecule. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 147–151.

Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K. a., Salvado, O., Szoeker, C., Macaulay, S.L., Martins, R., Maruff, P., et al. (2013). Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: A prospective cohort study. *Lancet Neurol.* *12*, 357–367.

- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* *416*, 535–539.
- Ward, R.J., Zucca, F. a, Duyn, J.H., Crichton, R.R., and Zecca, L. (2014). The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* *13*, 1045–1060.
- Wisniewski, T., and Goñi, F. (2015). Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. *Neuron* *85*, 1162–1176.
- Wolfe, M.S. (2002). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 859–866.
- Wolfe, M.S. (2012). Gamma-Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *120*, 89–98.
- Wu, H., Niu, H., Shao, A., Wu, C., Dixon, B., Zhang, J., Yang, S., and Wang, Y. (2015). Astaxanthin as a Potential Neuroprotective Agent for Neurological Diseases. *Mar. Drugs* *13*, 5750–5766.
- Wu, H.-Y., Hudry, E., Hashimoto, T., Kuchibhotla, K., Rozkalne, A., Fan, Z., Spires-Jones, T., Xie, H., Arbel-Ornath, M., Grosskreutz, C.L., et al. (2010). Amyloid β induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. *J. Neurosci.* *30*, 2636–2649.
- Wu, J., Li, H., Sun, X., Zhang, H., Hao, S., Ji, M., Yang, J., and Li, K. (2015). A Mitochondrion-Targeted Antioxidant Ameliorates Isoflurane-Induced Cognitive Deficits in Aging Mice. *PLoS One* *10*, e0138256.
- Yankner, B.A., Lu, T., and Loerch, P. (2008). The Aging Brain. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *41*–66.
- Zhang, L., Trushin, S., Christensen, T.A., Bachmeier, B. V., Gateno, B., Schroeder, A., Yao, J., Itoh, K., Sesaki, H., Poon, W.W., et al. (2016). Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* *6*, 18725.
- Zhao, W., Meiri, N., Xu, H., Cavallaro, S., Quattrone, A., Zhang, L., and Alkon, D.L. (2000). Spatial learning induced changes in expression of the ryanodine type II receptor in the rat hippocampus. *FASEB J.* *14*, 290–300.

Artículo científico publicado a partir de este trabajo

Research Article

Astaxanthin Protects Primary Hippocampal Neurons against Noxious Effects of A β -Oligomers

Pedro Lobos,¹ Barbara Bruna,¹ Alex Cordova,¹ Pablo Barattini,¹ Jose Luis Galáz,¹ Tatiana Adasme,¹ Cecilia Hidalgo,^{1,2} Pablo Muñoz,³ and Andrea Paula-Lima^{1,4}

¹*Biomedical Neuroscience Institute, Faculty of Medicine, University of Chile, 8380453 Santiago, Chile*

²*Institute of Biomedical Sciences and Center for Molecular Studies of the Cell, Faculty of Medicine, University of Chile, 8380453 Santiago, Chile*

³*Interdisciplinary Center for Innovation in Health (CIIS), School of Medicine, University of Valparaíso, 2341369 Valparaíso, Chile*

⁴*Institute for Research in Dental Sciences, Faculty of Dentistry, University of Chile, 8380492 Santiago, Chile*

Correspondence should be addressed to Andrea Paula-Lima; acpaulalima@u.uchile.cl

Received 17 October 2015; Revised 28 December 2015; Accepted 1 February 2016

Academic Editor: Christian Wozny

Copyright © 2016 Pedro Lobos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Increased reactive oxygen species (ROS) generation and the ensuing oxidative stress contribute to Alzheimer's disease pathology. We reported previously that amyloid- β peptide oligomers (A β O) produce aberrant Ca²⁺ signals at sublethal concentrations and decrease the expression of type-2 ryanodine receptors (RyR2), which are crucial for hippocampal synaptic plasticity and memory. Here, we investigated whether the antioxidant agent astaxanthin (ATX) protects neurons from A β O-induced excessive mitochondrial ROS generation, NFATc4 activation, and RyR2 mRNA downregulation. To determine mitochondrial H₂O₂ production or NFATc4 nuclear translocation, neurons were transfected with plasmids coding for HyperMito or NFATc4-eGFP, respectively. Primary hippocampal cultures were incubated with 0.1 μ M ATX for 1.5 h prior to A β O addition (500 nM). We found that incubation with ATX ($\leq 10 \mu$ M) for ≤ 24 h was nontoxic to neurons, evaluated by the live/dead assay. Preincubation with 0.1 μ M ATX also prevented the neuronal mitochondrial H₂O₂ generation induced within minutes of A β O addition. Longer exposures to A β O (6 h) promoted NFATc4-eGFP nuclear translocation and decreased RyR2 mRNA levels, evaluated by detection of the eGFP-tagged fluorescent plasmid and qPCR, respectively. Preincubation with 0.1 μ M ATX prevented both effects. These results indicate that ATX protects neurons from the noxious effects of A β O on mitochondrial ROS production, NFATc4 activation, and RyR2 gene expression downregulation.

1. Introduction

Accumulation and aggregation of the amyloid β peptide (A β) cause neuronal damage and death and induce the cognitive deficits that characterize Alzheimer's disease (AD) [1]. Soluble A β oligomers (A β O) are among the different conformations of A β aggregates found in human AD brains; these neurotoxins bind to neurons and induce synaptic loss, microglia and astrocyte activation, and Tau hyperphosphorylation. Moreover, A β O reproduce most AD pathological hallmarks when injected into animal model brains [2, 3]. The cellular and molecular mechanisms by which A β O perturb normal neuronal function have been extensively investigated [4]. In this regard, the excessive generation of

reactive oxygen species (ROS) produced by A β O represents an important source of neuronal damage [5]. The consequent redox imbalance generated by A β O contributes to the pathological cascade in AD and other neurodegenerative diseases, in which oxidative stress is a common pathological feature [6, 7].

Oxidative stress occurs concomitantly with the deregulation of Ca²⁺ signaling and of downstream Ca²⁺-dependent pathways induced by A β O [8, 9]; in particular, pathways downstream of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors play a key role in A β O induced neurotoxicity [10–12]. Aberrant activation of NMDA receptors leads to abnormal changes in gene expression that underlie A β O-induced morphological and functional defects [13, 14]. The abnormal

NMDA receptor-mediated Ca^{2+} signaling induced by $\text{A}\beta\text{Os}$ activates the protein phosphatase calcineurin, leading to downstream activation of the transcription factor NFAT [15], which promotes spine loss [11].

Astaxanthin (ATX), a red-orange carotenoid that originates the pink or red color of salmon, trout, lobster, shrimp, and other sea organisms, exhibits antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic effects. Recently, ATX was shown to protect neurons in experimental models of acute injuries, chronic neurodegenerative disorders, and neurological diseases and was proposed as a beneficial strategy to treat neurological diseases [16]. Although other antioxidants, such as resveratrol, have been shown to protect neurons from injury in similar model systems [17], ATX presents many advantages compared to other antioxidants displaying protective effects. Albeit ATX has a very similar structure to that of other carotenoids such as lutein and zeaxanthin, and it has some structural differences in the arrangement of its hydroxyl groups that provide ATX with unique characteristics. Among others properties, (i) ATX has much higher antioxidant power than other members of the carotenoid family [18]; (ii) it chelates several metal ions, preventing metal ion-induced oxidative stress [19]; (iii) it has anti-inflammatory properties [18]; (iv) it crosses the blood brain barrier, allowing free access to the central nervous system [20]; (v) it acts as damper of singlet oxygen levels [21]. The combination of these properties makes ATX a very attractive candidate for use against certain diseases of the central nervous system that are caused by increases in ROS, such as superoxide anion, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide. Consequently, ATX has been successfully used to decrease oxidative stress in elderly patients [22] and to improve neuronal function after brain ischemia [23].

Here we investigated the possible protective effects of ATX against some of the well-known deleterious effects of $\text{A}\beta\text{Os}$ on primary hippocampal neurons. Our results strongly suggest that ATX protects neurons from the noxious effects which $\text{A}\beta\text{Os}$ exert on mitochondrial ROS production, NFATc4 activation, and downregulation of RyR2 gene expression, suggesting that this natural antioxidant agent may represent a future approach to treat AD.

2. Experimental Procedures

2.1. Materials. $\text{A}\beta$ peptide ($\text{A}\beta_{1-42}$) was purchased from Bachem Inc. (Torrance, CA). ATX was extracted from *Lithodes antarcticus* (BIOTEX S.A., Santiago, Chile). Hexafluoro-2-propanol (HFIP) was from Merck (Darmstadt, Germany) and dimethyl sulfoxide (DMSO) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). TRIzol reagent, B27 supplement, Neurobasal medium, Dulbecco's modified essential medium (DMEM), Lipofectamine 2000, and the DNA binding dye SYBR green (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG) were from Invitrogen (Carlsbad, CA). The live/dead kit was from Molecular Probes (Chicago, IL), the Ambion DNA-free™ Kit from ThermoFisher Scientific (Chicago, IL), and the ImProm-II™ Reverse Transcriptase kit from Promega (Madison, WI). The pEGFP-C1 NFAT3 (NFATc4) (plasmid #10961; full-length

human NFATc4) was a gift from Dr. J. D. Molkenkin (Cambridge, MA) [24]. The HyperMito plasmid was from Evrogen (Moscow, Russia). The amplification system (MX3000P) was from Stratagene (La Jolla, CA).

2.2. Preparation of $\text{A}\beta\text{Os}$. $\text{A}\beta_{1-42}$ peptide, prepared as a dried hexafluoro-2-propanol (HFIP) film as described previously [9], was stored at -80°C for up to 4 months. Prior to use, this peptide film was dissolved in sufficient sterile DMSO to make a 5 mM stock solution. To prepare $\text{A}\beta\text{Os}$ as previously described [25, 26], the 5 mM peptide solution was subsequently diluted to 100 μM with cold phosphate buffered saline (PBS), aged overnight at 4°C and centrifuged at 14,000 $\times g$ for 10 min at 4°C to remove insoluble aggregates (protofibrils and fibrils). The supernatant containing soluble $\text{A}\beta\text{Os}$ was transferred to clean tubes and stored at 4°C . Only fresh $\text{A}\beta\text{O}$ preparations (2 days-old maximum) were used in all experiments.

2.3. Primary Hippocampal Cultures. Cultures were prepared from eighteen-day-old embryos obtained from pregnant Sprague-Dawley rats as previously described [25–29]. Briefly, brains were removed and placed in a dish containing HANKS-glucose solution. Hippocampi were dissected and, after stripping away the meningeal membranes, cells were gently dissociated in HANKS-glucose solution, centrifuged, and resuspended in DMEM medium supplemented with 10% horse serum. Dissociated hippocampal cells were plated on polylysine-coated plates and after 1 h DMEM was replaced by Neurobasal medium supplemented with B-27. Cultures were incubated for 15–21 days *in vitro* (DIV) at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere prior to experimental manipulations. The resulting cultures were highly enriched in neuronal cells, identified with neuronal anti-MAP-2, with a glial content <24% [25]. The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Universidad de Chile, approved the bioethical protocol of this study. All procedures were performed in accordance with the Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Institutes of Health, USA. Animals were housed under a 12 h light/dark cycle in a temperature-controlled room at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ with free access to food and water. Animals were euthanized under deep anesthesia to avoid animal suffering at each stage of the experiment.

2.4. Cell Viability Assay. To evaluate the effect of ATX on the cell viability of cultured hippocampal neurons maintained *in vitro* for 14 days (14 DIV), cultures were treated for 24 h with different ATX concentrations (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , and 100 μM) and cell viability was evaluated by the live/dead kit following the manufacturer's instructions as previously described [29]. Briefly, after removal of the culture, medium cells were gently washed three times with warm PBS-glucose and incubated at room temperature for 30 min in the presence of 2 μM calcein AM ester and 1 μM ethidium homodimer in PBS-glucose. Live neurons were identified by green calcein fluorescence and dead neurons were identified by the red fluorescence of DNA-bound ethidium. Cells were examined and counted on a Nikon® Eclipse Ti-Eat at 20 \times

magnification. At least three random fields were imaged per culture well (three replicate wells were used per experimental condition in each experiment) and about 500 cells were counted in each well. Six independent experiments were performed with different neuronal cultures. Cell viability was expressed as percentage relative to the untreated control cultures, which exhibited 85% cell viability on average.

2.5. Determination of Mitochondrial Hydrogen Peroxide Generation. Cultures grown in 25 mm glass plates were transiently transfected with the HyperMito plasmid at 11–14 DIV, using a proportion of 1:2 DNA:Lipofectamine 2000®. HyperMito is a fusion protein of the permuted circular yellow fluorescent protein (YFP) and the regulatory domain of the transcription factor OxyR, which contains two cysteines that oxidize in response to H₂O₂ generation and form a disulfide bridge producing a conformational change that causes an increase in YFP fluorescence [30]. One-day after transfection, cultures incubated in Neurobasal medium supplemented with B-27 were treated for 1.5 h with 0.1 μM ATX, rinsed three times with modified Tyrode solution plus 0.1 μM ATX, and maintained in this solution during the experiment. At the microscope stage, cultures were stimulated with 500 nM AβOs and fluorescence signals from neuronal cells (identified as such by morphology) were recorded every 6 s in a Carl Zeiss LSM Pascal 5 confocal microscope system using 63x Oil DIC objective, excitation 488 nm, and argon laser beam. Changes in mitochondrial H₂O₂ levels are presented as F/F_0 values, where F corresponds to the experimental fluorescence and F_0 corresponds to the basal fluorescence.

2.6. Nuclear Translocation of NFATc4-eGFP. Cultures grown in 25 mm glass plates were transiently transfected with a plasmid of a fusion protein encoding a green fluorescent protein (GFP) and NFATc4 [24] at 13–15 DIV using a proportion of 1:2 DNA:Lipofectamine 2000®. Cultures maintained in Neurobasal medium (supplemented with B-27) were treated one day after transfection for 1.5 h with 0.1 μM ATX, previous to the addition of 500 nM AβOs for 6 h. Neurons were then fixed with 4% paraformaldehyde, washed three times with PBS, and incubated with Hoechst for 5 minutes for nuclear staining. Covers were mounted in DAKO mounting medium for microscope observation. The subcellular localization of NFATc4-eGFP was visualized in cells using a Carl Zeiss LSM Pascal 5 laser scanning confocal with the 40x objective lens. Data were analyzed using the ImageJ software (NIH). To calculate the NFATc4 ratio of nucleus versus cytoplasm, the fluorescence intensity of nuclear NFATc4 was divided by the intensity of cytoplasmic NFATc4. Nuclear translocation of NFATc4 was determined by EGFP fluorescence intensity values from a region of interest (ROI) in the nucleus, as indicated by the overlap of EGFP staining with Hoechst nuclear staining. Background fluorescence was corrected by using a ROI devoid of cells and values were normalized to their respective areas.

2.7. RNA Isolation and PCR Analysis. To determine RyR2 mRNA levels, neurons were treated for 1.5 h with 0.1 μM ATX

prior to incubation with 500 nM AβOs for 6 h. To extract RNA cells were lysed as described in previous work [25]. Total RNA was isolated using TRIzol reagent. To remove any contaminating genomic DNA, a DNAase digestion step with Ambion DNA-free™ Kit was included. RNA purity was assessed by the 260/280 absorbance ratio and RNA integrity by gel electrophoresis. cDNA was synthesized from total RNA (2 μg) using the ImProm-II™ Reverse Transcriptase kit. Twenty-five ng of cDNA was used in 20 μL final volume for PCR amplification (Applied Biosystem Thermal Cycler). Amplification was performed using the primers and conditions detailed previously [25]. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed in an amplification system (MX3000P) using the DNA binding dye SYBR green (Brilliant III SYBER-GREEN Master Mix). Levels of RyR mRNA were calculated by the relative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [31] and normalized with respect to levels of β-actin mRNA. Dissociation curves were analyzed to verify purity of products. All samples were run in triplicate.

2.8. Statistics. Results are expressed as mean ± SEM. The significance of differences was evaluated using Student's *t*-test for paired data and with one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for multiple determinations.

3. Results

Previous studies showed that ATX, by attenuating oxidative damage, lipid peroxidation, and inhibiting the mitochondrial-related apoptotic pathway, protects hippocampal neurons against epilepsy-induced cellular loss [32]. Additionally, ATX prevents inflammation injury and improves cognition in diabetic mice [33]. To investigate the possible neuroprotective role of ATX against the toxic effects produced by AβOs, we treated primary hippocampal cultures with sublethal concentrations of AβOs (500 nM) in the presence or absence of ATX.

We first determined cell viability of primary hippocampal cultures (14 DIV) exposed for 24 h to different concentrations of ATX (ranging from 0.001 to 100 μM). Figures 1(a)–1(h) show representative live/dead images of control cultures (a), of cultures treated with different ATX concentrations ((b)–(g)) or with 250 μM H₂O₂ (h) to induce cell death. Live cells display calcein green fluorescence while dead cells exhibit punctuated ethidium red fluorescence. Figure 1(i) shows the quantitative analysis of cell viability expressed as percentages of control, determined in six independent experiments performed in six neuronal cultures. Control neurons presented at least 85% cell survival. Treatment with ATX concentrations ≤10 μM did not decrease cell viability when compared to control cultures, while treatment with 100 μM ATX induced 20% cell death. For comparison, treatment with 250 μM H₂O₂ elicited 40% neuronal death.

Considerable evidence points to brain oxidative stress as an important event in the early stages of AD [5]. In particular, enhanced generation of ROS, such as H₂O₂ and hydroxyl radicals, has been proposed as a key molecular mechanism underlying the pathogenesis of AD [34]. Since

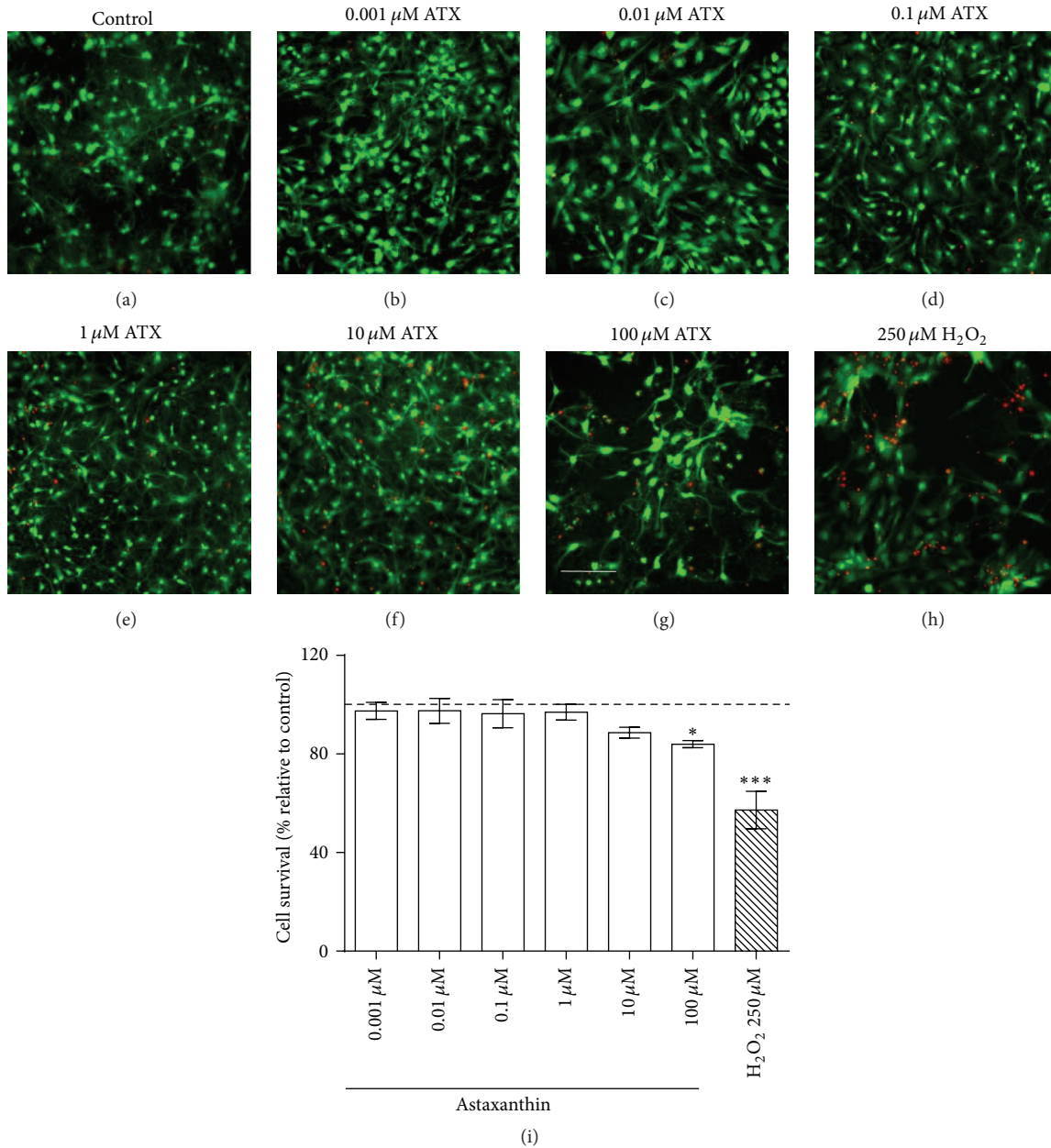


FIGURE 1: Lack of toxicity of ATX ($\leq 10 \mu\text{M}$) to primary hippocampal cultures. Representative live/dead fluorescence images ((a)–(h)) of neuronal hippocampal cultures (13–15 DIV) incubated for 24 h in the presence of vehicle (a) or treated with 0.001 μM (b), 0.01 μM (c), 0.1 μM (d), 1 μM (e), 10 μM (f), and 100 μM (g) ATX. In (h), 250 μM H_2O_2 was used to induce cell death. Live and dead neurons were identified by green calcein and red DNA-bound ethidium fluorescence, respectively. Scale bar: 50 μm . (i) shows quantitative analysis of cell survival incubated with different concentrations of ATX (white bars) and under H_2O_2 stimulation (hatched bar). Results are expressed as percentages relative to the viability of the control, untreated cultures. Values correspond to mean \pm SE of six independent experiments ($n = 6$, corresponding to cultures from 6 different animals; in all experiments, each condition was tested at least in triplicate), with different neuronal cultures. Control cultures exhibited 85% of cell viability on average. Statistically significant differences among experimental conditions were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.0001$ compared to control).

$\text{A}\beta\text{Os}$ induce neuronal ROS production [9], including mitochondrial ROS production [35], we tested whether ATX prevents mitochondrial H_2O_2 generation induced by $\text{A}\beta\text{Os}$. To this purpose, we transfected neurons with a plasmid that codes for the HyperMito protein, a H_2O_2 fluorescent sensor with mitochondrial destination; 24 h after transfection

we added $\text{A}\beta\text{Os}$ (500 nM) to the cultures and recorded fluorescence levels for 20 minutes. The representative images illustrated in Figure 2 show that control neurons (Figure 2(a)) did not display significant fluorescence changes when comparing the image taken before vehicle addition (250 s), with the final image collected at the end of the record (1250 s).

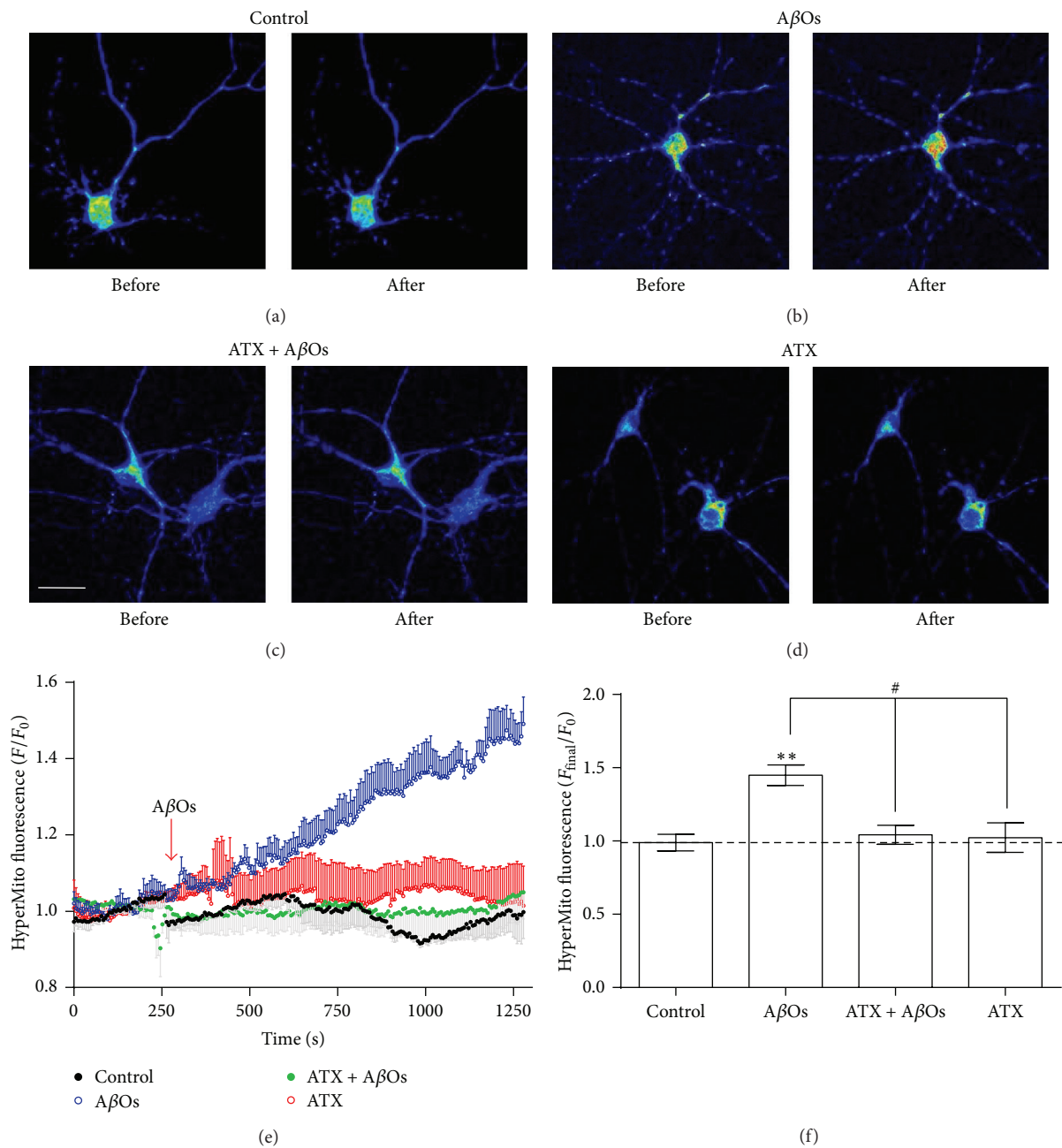


FIGURE 2: ATX prevents mitochondrial H₂O₂ generation induced by AβOs. Hippocampal neurons (13–15 DIV) were transfected with HyperMito, 24 h before the experimental maneuvers. ((a)–(d)) show representative pseudocolor images of hippocampal neurons expressing the HyperMito protein, collected before (250 s, left images) or 1000 s after (1250 s, right images) the addition of vehicle ((a) and (d)) or of 500 nM AβOs ((b) and (c)). Higher fluorescence intensity levels are expressed by the red color in a pseudocolor scale, while lower intensity levels are expressed by blue color. Scale bar: 10 μm. (e) shows representative time courses of HyperMito fluorescence, recorded in neuronal soma after the addition of vehicle (black symbols) or 500 nM AβOs in the absence (blue symbols) or presence (green symbols) of 0.1 μM ATX preincubated for 1.5 h, which alone did not induce changes in HyperMito fluorescence (red symbols). Fluorescence changes (mean ± SE) are expressed as F/F_0 , where F_0 corresponds to the basal fluorescence recorded in the soma before AβOs addition. The graph illustrates average values from 2 ROIs registered at the soma of neurons recorded in the visual field ($n = 4$). Values correspond to four different experiments performed in four cultures from four different animals; each condition was tested in duplicate. (f) shows the values of F/F_0 obtained at the end of the experiment (time 1250 s) to each condition and bars represent mean ± SE. Statistically significant differences among experimental conditions were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (** $p < 0.001$ compared to control; # $p < 0.05$ compared to indicated conditions).

Hippocampal neurons responded to A β O_s with a significant increase in probe fluorescence, as illustrated by the representative images (Figure 2(b)), recorded before (250 s) and 1000 s after A β O_s addition (1250 s). In contrast, neurons preincubated for 1.5 h with 0.1 μ M ATX and then treated with 500 nM A β O_s (Figure 1(c)) or preincubated with ATX and vehicle (Figure 1(d)) did not exhibit significant fluorescence changes when comparing the images taken at the final and the initial time point, recorded before vehicle or A β O_s addition. The time courses of average fluorescence changes recorded in neurons stimulated with 500 nM A β O_s or vehicle in the presence or absence of ATX, shown in Figure 2(e), indicate that A β O_s addition to control neurons promoted mitochondrial H₂O₂ production within minutes (blue trace). Neurons preincubated for 1.5 h with ATX (0.1 μ M) did not exhibit changes in fluorescence following addition of 500 nM A β O_s (green trace) or of saline (red trace). The relative fluorescence (F_{final}/F_0) values of neurons maintained in different conditions, plotted in Figure 2(f), show that 500 nM A β O_s induced a significant increase in mitochondrial H₂O₂ content, which was prevented by preincubation with 0.1 μ M ATX.

A requisite step for the sustained synaptic plasticity processes underlying learning and memory is an elevation in intracellular-free Ca²⁺ concentration, which plays a central role in Ca²⁺-dependent gene transcription [36–38]. Indeed, defective Ca²⁺ signaling is believed to underlie AD neuronal pathology [39]. The activation of calcineurin, which promotes the downstream stimulation of the transcriptional factor NFAT that is engaged in dendritic and axonal development, synaptogenesis, and neuronal survival [40], plays a prominent role among activity-dependent Ca²⁺-signaling pathways. In particular, the isoform NFATc4 is activated by prolonged Ca²⁺ signals [41]. Moreover, activation of NFATc4 has been demonstrated *in vitro* and *in vivo* in AD [42]. Of importance, NFATc4 activation by A β invokes morphological changes such as neuritic dystrophy and loss of dendritic branching and spines, effects that are prevented and reverted by inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway [42, 43]. Also *postmortem* studies showed that, in the hippocampus of patients, activation of NFATc4 correlates with cognitive deficits [44, 45]. To investigate whether preincubation with ATX prevents the activation of NFATc4 by A β O_s, we determined its translocation to the nucleus in hippocampal neurons transfected with plasmid codifying for the fusion protein of NFATc4 with GFP. We preincubated neurons 24 h after transfection with 0.1 μ M ATX for 1.5 h and exposed them to A β O_s (500 nM) for an additional 6 h period. As illustrated in Figure 3(a), control neurons displayed GFP fluorescence mainly in the cytoplasm, indicating that in this condition NFATc4 was inactive. Incubation with A β O_s for 6 h induced nuclear translocation of NFATc4/GFP, indicating that A β O_s induce NFATc4 activation (Figure 3(b)). Previous incubation with ATX did not change the cytoplasmic distribution of NFATc4 in neurons incubated with A β O_s for 6 h (Figure 3(c)) or in control neurons (Figure 3(d)). The average results from four experiments (Figure 3(e)) show that incubation of neurons with A β O_s for 6 h increased 3-fold

the nuclear/cytoplasmic ratio; this increase did not occur in neurons pretreated with ATX.

We have previously shown that brain derived neurotrophic factor (BDNF) positively regulates the expression of intracellular RyR2 Ca²⁺ channels in hippocampal cultures [46], whereas A β O_s downregulate RyR2 expression during synaptotoxicity [25]. In agreement with our previous results, incubation for 6 h with A β O_s (500 nM) significantly decreased RyR2 mRNA levels to approximately 54% (Figure 4(a)). Preincubation with ATX (0.10 μ M) did not modify RyR2 mRNA levels but resulted in complete prevention of the reduction of RyR2 mRNA levels promoted by A β O_s (Figure 4(a)). These results suggest a possible link between mitochondrial ROS generation and RyR2 expression. In addition, we found that the general antioxidant agent N-acetyl-L-cysteine (NAC), which is a cellular precursor of glutathione, also protects primary hippocampal neurons from the RyR2 mRNA decrease induced by A β O_s (Figure 4(b)). Although the results presented in Figure 4 may be interpreted as an indication that RyR2 protein content was better preserved by treatment with ATX compared to NAC, these effects were not significantly different (not shown).

4. Discussion

Alzheimer's disease is the most common form of dementia worldwide. Among the most important risk factors for the development of AD are human conditions that have been associated with oxidative stress and chronic inflammation, which include aging, cardiovascular diseases, diabetes, hypertension, brain trauma, and high alcohol consumption [47, 48]. On the other hand, there are factors considered protective, as regular exercise and the consumption of diets rich in antioxidants [48, 49]. In the search for therapeutic strategies that could prevent AD, several attempts have been made to slow the disease progression with antioxidant agents [50]. Briefly, several studies carried out in *in vitro* and *in vivo* models of AD have shown some positive results of antioxidants. The main mechanisms proposed to explain these effects are (1) mimicking endogenous catalytic enzymes (mainly superoxide dismutases (SOD), catalases (CAT)) [51] and metabolic precursors of endogenous antioxidants system (Glutathione) [52]; (2) acting like ROS scavenger; and (3) causing SIRT activation [53]. Although antioxidants have been widely studied as an alternative strategy to prevent or treat AD, direct evidence is still required to support their use in the treatment of patients suffering from AD [54, 55].

Antioxidant agents are distinct chemical entities with structures that command their different modes of action; this structural diversity imparts each antioxidant agent with a unique biochemical profile, which is reflected in different sites of action and biological activities. ATX is classified as a lipophilic antioxidant of the carotenoid family, and its main protective mechanisms rely on its capacity to act as a singlet oxygen quencher and free radical scavenger. However, after scavenging reactive-free radicals, ATX is transformed into a carotenyl radical by hydrogen abstraction; this process can lead to a switch from a beneficial antioxidant agent

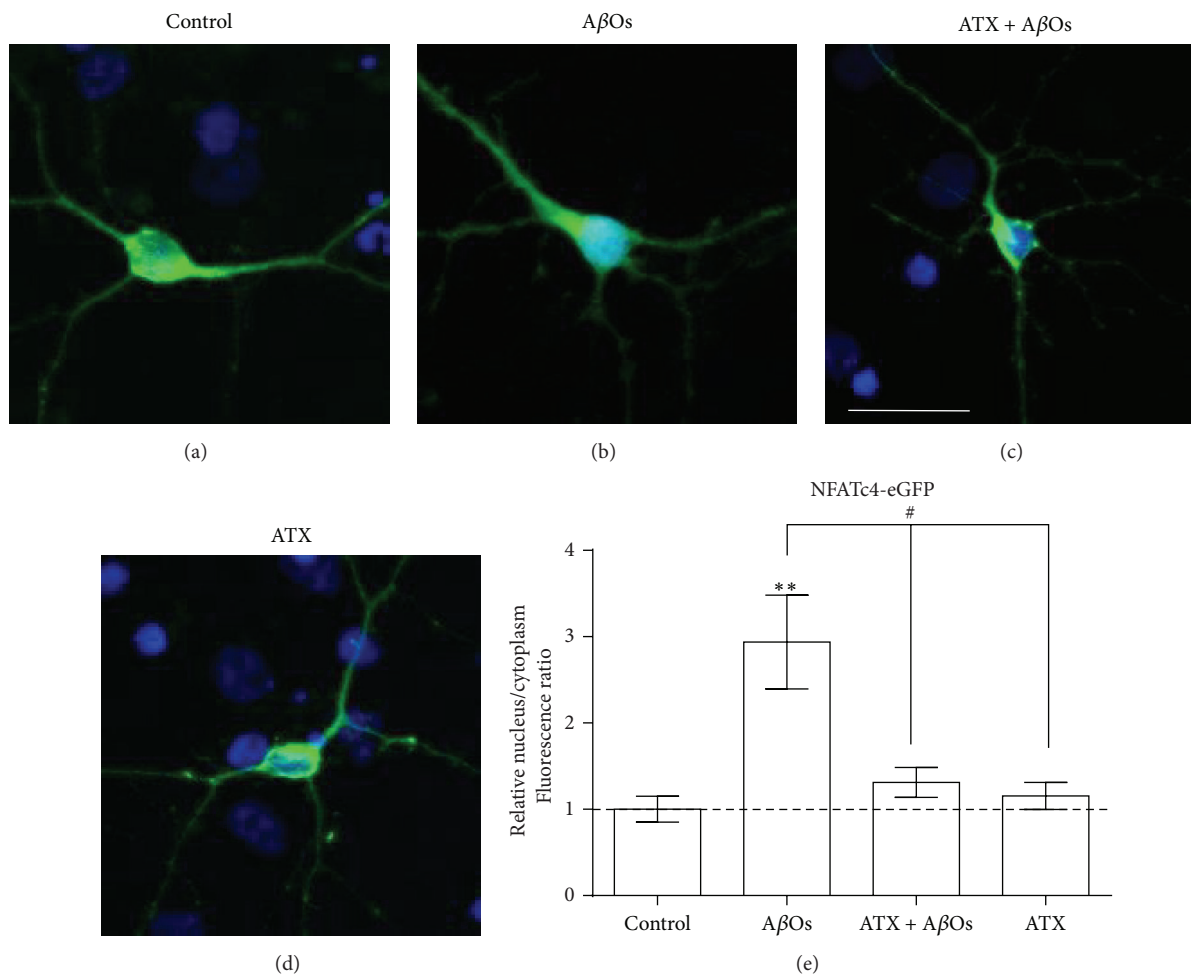


FIGURE 3: ATX prevents A β Os-induced NFATc4 activation. Hippocampal neurons (13–15 DIV) were transfected with EGFP-NFATc4 24 h before the experiments. ((a)–(d)) show representative images of intracellular distribution of EGFP-NFATc4 (green fluorescence) and of nuclear staining with Hoechst (blue fluorescence) in hippocampal neurons. (a) Neurons treated with vehicle, (b) stimulated with 500 nM A β Os for 6 h, (c) preincubated with 0.1 μ M ATX for 1.5 h before A β Os addition, or (d) incubated with ATX for 7.5 h. Scale bar: 10 μ m. (e) shows the quantification of four different experiments ($n = 4$) in cultures from four different animals; each condition was tested in duplicate (in total, 15–25 cells were analyzed per condition). The results are expressed as the mean ratio of nuclear/cytoplasmic fluorescence intensity \pm SE, relative to control cells. Statistically significant differences among experimental conditions were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (** $p < 0.001$ compared to control; # $p < 0.05$ compared to indicated conditions).

to a damaging prooxidative one, which could explain ATX toxicity when used at higher concentrations (100 μ M) [56]. Here, we studied the protective properties of ATX against the noxious effects of A β Os on primary hippocampal cultures and compared some of its effects with the protective actions of NAC. We also compared the effects of NAC because this is a classical and very widely studied antioxidant. Although NAC also acts as a ROS scavenger, its principal action stems from its role as a precursor of cysteine, the rate-limiting factor in the *de novo* synthesis of glutathione (GSH). In this sense, contrary to ATX, NAC is an indirect antioxidant, which, as a precursor of the antioxidant GSH, has a safer toxicity profile, allowing the use of higher concentrations [57]. Both antioxidant agents have been studied in the context of central nervous system disorders [16, 58], but evidence related to NAC is more abundant.

We have previously shown that incubation of hippocampal neurons *in vitro* with NAC, a glutathione precursor molecule with antioxidant properties, completely prevents the aberrant increase in intracellular Ca $^{2+}$ levels and the mitochondrial fragmentation induced A β Os [25, 52]. In previous work from our laboratory, we have also shown that reducing agents suppress RyR activation by Ca $^{2+}$ in cortical neurons [59]. Also the administration of NAC through drinking water to a transgenic mouse model of AD (mouse APP/PS-1) suppressed the protein oxidation and nitrosylation in the brains of mice aged 9 and 12 months [60]. The above results are consistent with the idea that NAC modulates the activity of RyR by avoiding the aberrant intracellular ROS increase and hence the enhanced Ca $^{2+}$ release produced by ROS-modified RyR, induced by A β Os.

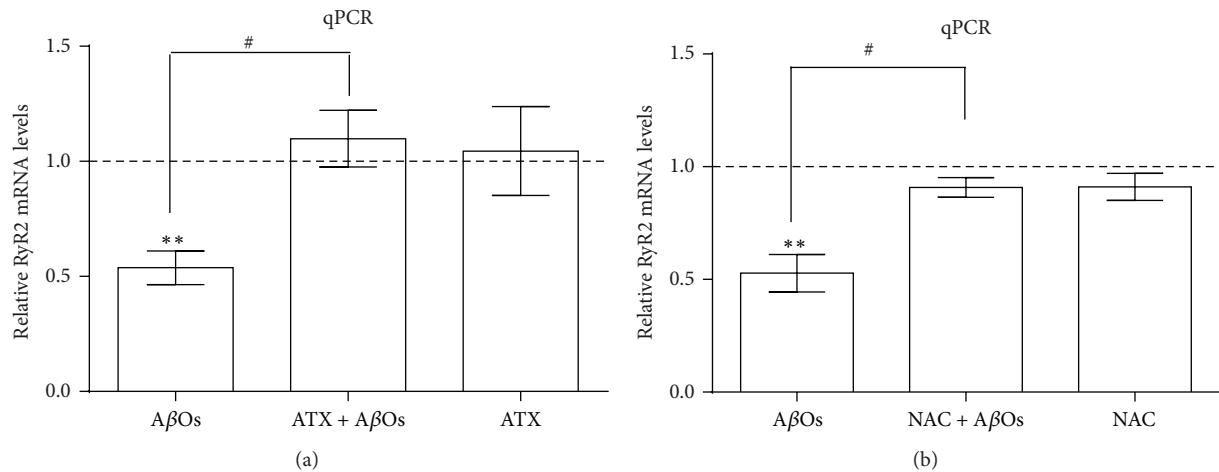


FIGURE 4: ATX prevents A β Os-induced RyR2 mRNA downregulation. Hippocampal cultures were preincubated with 0.1 μ M ATX (a) or 10 mM of NAC (b) for 1.5 h or 30 minutes, respectively, before incubation for 6 h with 500 nM A β Os. Relative RyR2 mRNA levels were determined with qPCR, normalized to β -actin mRNA levels, and expressed as fold over control. Values represent mean \pm SE ($n = 6$) from experiments performed in cultures from six different animals; each condition was tested in triplicate. Statistically significant differences among experimental conditions were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (** $p < 0.001$ compared to control; # $p < 0.05$ compared to indicated conditions).

Astaxanthin is a natural carotenoid product that is used in nutritional supplements, which can be extracted from *Lithodes antarcticus*. ATX has been shown to quench singlet oxygen and to scavenge free radicals [61]; ATX antioxidant properties reside in its polar ionic rings and nonpolar conjugated carbon-carbon bonds and are 10-fold greater than those of other carotenoids [62]. In addition to the ROS scavenging properties attributed to ATX, several studies have shown that ATX, alone or in combination with omega-3 fatty acids, protects cells by inducing antioxidant activity via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) Nrf2/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway [63–65]. Several studies have implicated Nrf2 in the induction of HO-1, which is the enzyme that catalyzes the first and rate-limiting step of heme metabolism [66, 67]. HO-1 activity protects tissue during inflammatory stress in various conditions through the degradation of prooxidant heme and the production of carbon monoxide (CO) and bilirubin, both of which have anti-inflammatory and antiapoptotic properties, especially in ROS-dependent perturbations associated with metabolic syndrome [67].

In this work, we tested the possible neuroprotective effects of ATX on some of the noxious effects induced by A β Os on primary hippocampal cultures. We found that ATX prevented the mitochondrial generation of H₂O₂, the nuclear translocation of NFATC4, and the decrease of RyR2 mRNA levels induced by A β Os. These protective effects may result from the reduction of intracellular ROS promoted by ATX. Although ROS have important roles in cell signaling and normal neuronal function, excessive ROS generation, such as that produced by A β Os, has deleterious effects on neuronal function, which include the significant damage to DNA, RNA, proteins, and polyunsaturated fatty acids in lipids caused by irreversible oxidation. Normally, cells

defend themselves against ROS damage through intracellular and extracellular defenses, in particular through enzymes such as SOD, CAT, lactoperoxidases, and glutathione peroxidases. ATX supplementation not only lowers ROS levels but also leads to an important functional recovery of the antioxidant network [68], including SOD, which catalyzes the dismutation of superoxide anion to O₂ and H₂O₂, and CAT, which protects cells from oxidative damage by catalyzing the decomposition of H₂O₂ to water and O₂.

Recent clinical studies showed that ATX promotes significant reductions in cardiovascular risk markers of oxidative stress and inflammation [69]; ATX also has considerable potential for both the prevention and treatment of various chronic inflammatory disorders, such as cancer, asthma, rheumatoid arthritis, metabolic syndrome, diabetes, and diabetic nephropathy, as well as gastrointestinal, hepatic, and neurodegenerative diseases [56]. In rats, ATX supplementation in the diet for four weeks markedly decreases the level of malondialdehyde (MDA), nitric oxide, and advanced protein oxidation products in the cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, and cerebellum [68]. Also ATX increases the activity of CAT and SOD enzymes as well as the level of glutathione in the brain [68]. Additionally, ATX exhibits protective effects against the neurotoxicity induced by A β _{25–35} peptide aggregates in PC12 and neuroblastoma (SH-SY5Y) cells [70, 71]. These results are in agreement with the main conclusions presented in this work.

Besides the role of ROS and oxidative stress in AD, there are many studies linking this disease with a sustained increase in intracellular Ca²⁺ levels [39, 72, 73]. We have previously reported that A β Os addition to primary hippocampal neurons causes an increase in Ca²⁺ entry to the cytoplasm via NMDA receptors, which promotes RyR-mediated Ca²⁺ release [25]. We also showed that previous

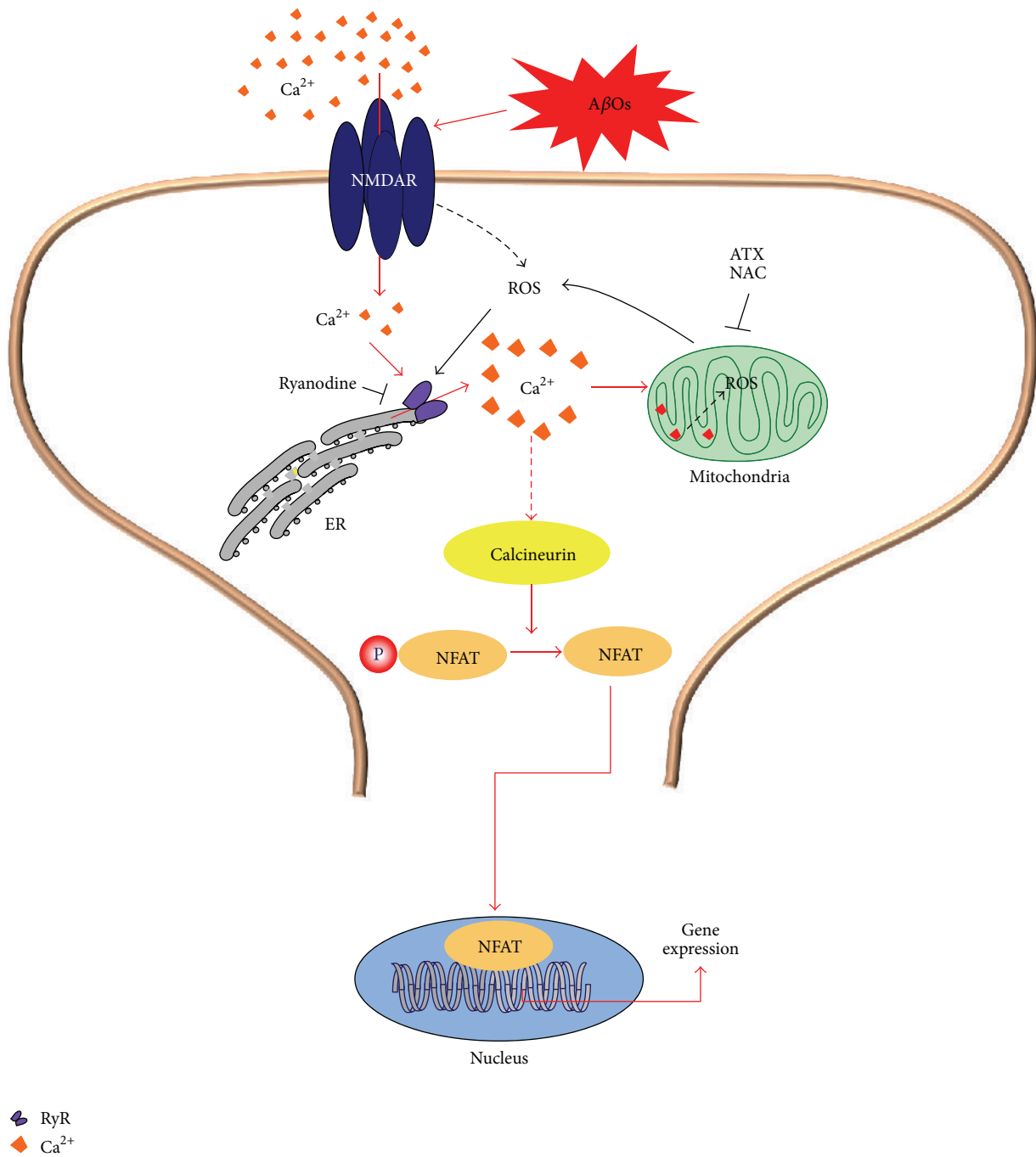


FIGURE 5: Scheme showing a possible mechanism to explain ATX neuroprotection over the deleterious effects of $A\beta$ Os. $A\beta$ Os promote increased ROS generation and induce abnormal Ca^{2+} signals in primary hippocampal neurons, which arise initially from Ca^{2+} entry through NMDA receptors; these entry signals are subsequently amplified by Ca^{2+} release through RyR channels costimulated by Ca^{2+} and the increased ROS levels generated response to $A\beta$ Os [25]. Activation of RyR-mediated Ca^{2+} release by ROS [59, 77] induces mitochondrial Ca^{2+} -uptake, which is prevented by ryanodine at inhibitory concentrations [27]. These abnormal cytoplasmic Ca^{2+} signals promote NFATc4 translocation, which induces deleterious changes in gene expression and dendritic spine morphology [42]. ATX and NAC, either by scavenging ROS/RNS or by increasing antioxidant defenses, would prevent abnormal $A\beta$ Os induced RyR-mediated Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and thus would prevent the harmful effects of enhanced NFAT nuclear translocation.

incubation of primary neurons with NAC prevents the emergence of sustained Ca^{2+} signals induced by $\text{A}\beta\text{Os}$ [52]. These findings emphasize the participation of ROS in the maintenance of the Ca^{2+} signals induced by $\text{A}\beta\text{Os}$. On the other hand, intracellular Ca^{2+} chelators such as BAPTA-AM prevent the ROS generation induced by $\text{A}\beta\text{Os}$, indicating that there is a crosstalk between the ROS and Ca^{2+} signals induced by $\text{A}\beta\text{Os}$ [9]. In this context, the RyR channel appears as an important actor since its activity and expression are regulated by this crosstalk [74]; thus, RyR channels act as coincident detectors of Ca^{2+} and ROS due to the presence of cysteine residues that are reversibly modified by oxidants, enhancing RyR activation by Ca^{2+} [75]. We showed that incubation of primary hippocampal neurons with $\text{A}\beta\text{Os}$ causes an important downregulation of RyR2 mRNA and protein contents and proposed that these reductions are crucial to the synaptotoxicity induced by $\text{A}\beta\text{Os}$ [25]. Of note, *postmortem* samples of patients who died with AD display significantly reduced RyR2 expression at early stages of the disease [76].

Dysregulation of Ca^{2+} -dependent gene transcription plays a critical role in synaptic plasticity and memory defects [77]. $\text{A}\beta\text{Os}$ induce calcineurin activation, which leads in turn to activation of its canonical target, the transcriptional factor NFAT. The damage observed in the cortex and hippocampus of *postmortem* AD patients during the progression of the disease, correlates with activation of the calcineurin/NFAT pathway in both glial and neuronal cells [44, 45]. Activation of this pathway, even in the absence of $\text{A}\beta$, is sufficient to produce a virtual phenocopy of $\text{A}\beta$ -induced dystrophic neurites, dendritic simplification, and dendritic spine loss in both neurons in culture and in adult mouse brain [42]. Thus, $\text{A}\beta\text{Os}$ appear to mediate the neurodegeneration of AD, at least in part, through calcineurin activation and subsequent stimulation of NFAT-mediated downstream cascades.

Calcineurin is susceptible to significant (up to 15 times) and reversible activation by $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. This activation is favored during chronic elevations of Ca^{2+} in the cytoplasm resulting from ER stress caused by exposure to misfolded proteins [78]. However, calcineurin activity is also redox-sensitive, so that oxidation of calcineurin strongly inhibits its phosphatase activity. Some possible mechanisms to explain this apparent paradox, that is, increased activity in conditions of increased ROS generation, have been discussed in studies from other groups [78, 79]. Cleaved forms of the enzyme, which were found in AD brains [79], are constitutively active.

Here, we demonstrated for the first time that ATX inhibits the nuclear translocation of NFAT induced by $\text{A}\beta\text{Os}$, suggesting that the calcineurin/NFAT pathway responds to the increased neuronal oxidative tonus induced by $\text{A}\beta\text{Os}$. Additionally, we show that ATX inhibits the downregulation of RyR2 mRNA levels promoted by $\text{A}\beta\text{Os}$. These results suggest that excessive ROS decrease RyR2 expression, although it is not known if the calcineurin/NFAT pathway mediates this decrease. Previous work indicates that the RyR2 protein plays an important role in hippocampal synaptic plasticity processes [77], so its downregulation by $\text{A}\beta\text{Os}$ may also contribute to their synaptotoxic effects. We previously showed that incubation of primary hippocampal neurons with $\text{A}\beta\text{Os}$

for a period of 6 h prevents the rapid spine remodeling prompted by caffeine-induced RyR-mediated Ca^{2+} release or by BDNF, which also requires RyR-mediated Ca^{2+} signals; these results suggest that the RyR2 decrease induced by $\text{A}\beta\text{Os}$ produces a significant reduction of RyR2-mediated Ca^{2+} signals in response to BDNF, leading to defective synaptic remodeling [25]. Thus, decreased RyR2 protein expression may contribute to impair synaptic plasticity in AD (Figure 5).

The present results indicate that ATX, via its antioxidant properties, may prevent important deleterious effects of $\text{A}\beta\text{Os}$ on gene expression, which might be controlled at least in part by the calcineurin/NFAT pathway. Taken together, our results demonstrate the potential of ATX to prevent synaptotoxic effects of $\text{A}\beta\text{Os}$ in an *in vitro* model of AD. Given the neuroprotective effects of ATX against different neurological disorders, the results presented here support the idea that daily consumption of ATX may be a beneficial strategy in human health management of AD and possibly of other neurological disorders as well.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

Financial support was provided by FONDECYT 1150736, CORFO 13IDL2-18271, FONDECYT 1140545, FONDECYT 1140580, BNI (P-09-015F), and PMI-UVA1402. The authors thank Dr. Osvaldo Rubilar from BIOTEX S.A. for kindly providing ATX.

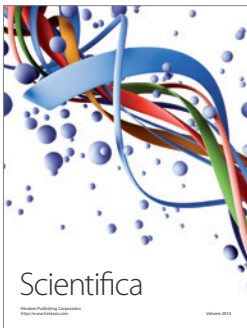
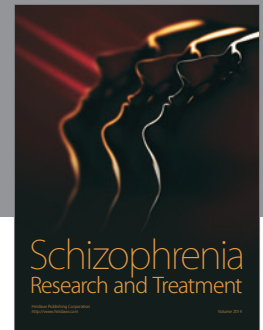
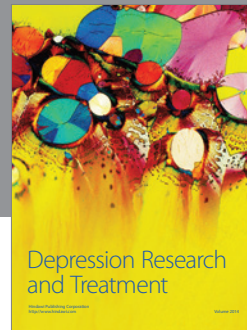
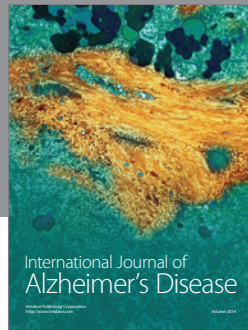
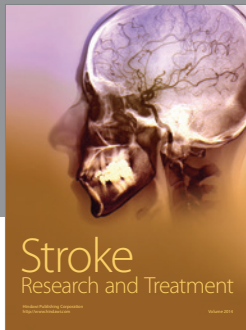
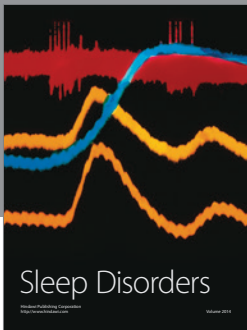
References

- [1] C. Haass and D. J. Selkoe, "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 2, pp. 101–112, 2007.
- [2] Y. Gong, L. Chang, K. L. Viola et al., "Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric $\text{A}\beta$ ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 18, pp. 10417–10422, 2003.
- [3] L. Forny-Germano, N. M. Lyra e Silva, A. F. Batista et al., "Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid β -oligomers in nonhuman primates," *The Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 41, pp. 13629–13643, 2014.
- [4] S. T. Ferreira, M. V. Lourenco, M. M. Oliveira, and F. G. De Felice, "Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 9, article 191, 2015.
- [5] D. A. Butterfield, A. M. Swomley, and R. Sultana, "Amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 19, no. 8, pp. 823–835, 2013.
- [6] K. J. Barnham, C. L. Masters, and A. I. Bush, "Neurodegenerative diseases and oxidative stress," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 3, no. 3, pp. 205–214, 2004.

- [7] P. B. Campos, B. S. Paulsen, and S. K. Rehen, "Accelerating neuronal aging in in vitro model brain disorders: a focus on reactive oxygen species," *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 6, article 292, 2014.
- [8] K. N. Green and F. M. LaFerla, "Linking calcium to A β and Alzheimer's disease," *Neuron*, vol. 59, no. 2, pp. 190–194, 2008.
- [9] F. G. De Felice, P. T. Velasco, M. P. Lambert et al., "A β oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 15, pp. 11590–11601, 2007.
- [10] A. C. Paula-Lima, J. Brito-Moreira, and S. T. Ferreira, "Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 126, no. 2, pp. 191–202, 2013.
- [11] G. M. Shankar, B. L. Bloodgood, M. Townsend, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, and B. L. Sabatini, "Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- β protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway," *Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 11, pp. 2866–2875, 2007.
- [12] M. P. Parsons and L. A. Raymond, "Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders," *Neuron*, vol. 82, no. 2, pp. 279–293, 2014.
- [13] A. Sebollela, L. Freitas-Correa, F. F. Oliveira et al., "Amyloid- β oligomers induce differential gene expression in adult human brain slices," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 10, pp. 7436–7445, 2012.
- [14] C. Barucker, A. Harmeyer, J. Weiske et al., "Nuclear translocation uncovers the amyloid peptide a β 42 as a regulator of gene transcription," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 29, pp. 20182–20191, 2014.
- [15] L. C. Reese and G. Taglialetela, "A role for calcineurin in Alzheimer's disease," *Current Neuropharmacology*, vol. 9, no. 4, pp. 685–692, 2011.
- [16] H. Wu, H. Niu, A. Shao et al., "Astaxanthin as a potential neuroprotective agent for neurological diseases," *Marine Drugs*, vol. 13, no. 9, pp. 5750–5766, 2015.
- [17] S. D. Rege, T. Geetha, T. L. Broderick, and J. R. Babu, "Resveratrol protects β amyloid-induced oxidative damage and memory associated proteins in H19-7 hippocampal neuronal cells," *Current Alzheimer Research*, vol. 12, no. 2, pp. 147–156, 2015.
- [18] M. Kurashige, E. Okimasu, M. Inoue, and K. Utsumi, "Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin," *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, vol. 22, no. 1, pp. 27–38, 1990.
- [19] E. Hernández-Marin, A. Barbosa, and A. Martínez, "The metal cation chelating capacity of astaxanthin. Does this have any influence on antiradical activity?" *Molecules*, vol. 17, no. 1, pp. 1039–1054, 2012.
- [20] M. O. M. Tso and T.-T. Lam, "Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage," United States Patent US 5527533, 1996.
- [21] N. Shimidzu, M. Goto, and W. Miki, "Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms," *Fisheries Science*, vol. 62, no. 1, pp. 134–137, 1996.
- [22] K. Nakagawa, T. Kiko, T. Miyazawa et al., "Antioxidant effect of astaxanthin on phospholipid peroxidation in human erythrocytes," *British Journal of Nutrition*, vol. 105, no. 11, pp. 1563–1571, 2011.
- [23] H. Shen, C.-C. Kuo, J. Chou et al., "Astaxanthin reduces ischemic brain injury in adult rats," *The FASEB Journal*, vol. 23, no. 6, pp. 1958–1968, 2009.
- [24] M. Ichida and T. Finkel, "Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 5, pp. 3524–3530, 2001.
- [25] A. C. Paula-Lima, T. Adasme, C. Sanmartín et al., "Amyloid β -peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca²⁺ release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 14, no. 7, pp. 1209–1223, 2011.
- [26] C. D. SanMartín, A. C. Paula-Lima, C. Hidalgo, and M. T. Núñez, "Sub-lethal levels of amyloid β -peptide oligomers decrease non-transferrin-bound iron uptake and do not potentiate iron toxicity in primary hippocampal neurons," *BioMetals*, vol. 25, no. 4, pp. 805–813, 2012.
- [27] C. D. SanMartín, A. C. Paula-Lima, A. García et al., "Ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release underlies iron-induced mitochondrial fission and stimulates mitochondrial Ca²⁺ uptake in primary hippocampal neurons," *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 7, article 13, 2014.
- [28] A. C. Paula-Lima, F. G. De Felice, J. Brito-Moreira, and S. T. Ferreira, "Activation of GABAA receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of β -amyloid in rat hippocampal and cortical neurons," *Neuropharmacology*, vol. 49, no. 8, pp. 1140–1148, 2005.
- [29] A. C. Paula-Lima, M. A. Tricerri, J. Brito-Moreira et al., "Human apolipoprotein A-I binds amyloid- β and prevents A β -induced neurotoxicity," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 41, no. 6, pp. 1361–1370, 2009.
- [30] V. V. Belousov, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov et al., "Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide," *Nature Methods*, vol. 3, no. 4, pp. 281–286, 2006.
- [31] M. W. Pfaffl, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR," *Nucleic Acids Research*, vol. 29, no. 9, article e45, 2001.
- [32] Y. Lu, T. Xie, X.-X. He et al., "Astaxanthin rescues neuron loss and attenuates oxidative stress induced by amygdala kindling in adult rat hippocampus," *Neuroscience Letters*, vol. 597, pp. 49–53, 2015.
- [33] X. Zhou, F. Zhang, X. Hu et al., "Inhibition of inflammation by astaxanthin alleviates cognition deficits in diabetic mice," *Physiology & Behavior*, vol. 151, pp. 412–420, 2015.
- [34] B. J. Tabner, J. Mayes, and D. Allsop, "Hypothesis: soluble A β oligomers in association with redox-active metal ions are the optimal generators of reactive oxygen species in Alzheimer's disease," *International Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 2011, Article ID 546380, 6 pages, 2011.
- [35] T. Ma, C. A. Hoeffler, H. Wong et al., "Amyloid β -induced impairments in hippocampal synaptic plasticity are rescued by decreasing mitochondrial superoxide," *Journal of Neuroscience*, vol. 31, no. 15, pp. 5589–5595, 2011.
- [36] H. Bading, "Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 14, no. 9, pp. 593–608, 2013.
- [37] P. L. Greer and M. E. Greenberg, "From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function," *Neuron*, vol. 59, no. 6, pp. 846–860, 2008.
- [38] M. Cavazzini, T. Bliss, and N. Emptage, "Ca²⁺ and synaptic plasticity," *Cell Calcium*, vol. 38, no. 3-4, pp. 355–367, 2005.

- [39] F. M. LaFerla, "Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 3, no. 11, pp. 862–872, 2002.
- [40] N. Schwartz, A. Schohl, and E. S. Ruthazer, "Neural activity regulates synaptic properties and dendritic structure in vivo through calcineurin/NFAT signaling," *Neuron*, vol. 62, no. 5, pp. 655–669, 2009.
- [41] J. D. Ulrich, M.-S. Kim, P. R. Houlihan et al., "Distinct activation properties of the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) isoforms NFATc3 and NFATc4 in neurons," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 45, pp. 37594–37609, 2012.
- [42] H.-Y. Wu, E. Hudry, T. Hashimoto et al., "Amyloid β induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 7, pp. 2636–2649, 2010.
- [43] E. Hudry, H.-Y. Wu, M. Arbel-Ornath et al., "Inhibition of the NFAT pathway alleviates amyloid beta neurotoxicity in a mouse model of Alzheimer's disease," *The Journal of Neuroscience*, vol. 32, no. 9, pp. 3176–3192, 2012.
- [44] H. M. Abdul, M. A. Sama, J. L. Furman et al., "Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in Calcineurin/NFAT signaling," *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 41, pp. 12957–12969, 2009.
- [45] H. M. Abdul, J. L. Furman, M. A. Sama, D. M. Mathis, and C. M. Norris, "NFATs and Alzheimer's disease," *Molecular and Cellular Pharmacology*, vol. 2, no. 1, pp. 7–14, 2010.
- [46] T. Adasme, P. Haeger, A. C. Paula-Lima et al., "Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 7, pp. 3029–3034, 2011.
- [47] D. Baglietto-Vargas, Y. Chen, D. Suh et al., "Short-term modern life-like stress exacerbates A β -pathology and synapse loss in 3xTg-AD mice," *Journal of Neurochemistry*, vol. 134, no. 5, pp. 915–926, 2015.
- [48] C. Ballard, S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, and E. Jones, "Alzheimer's disease," *The Lancet*, vol. 377, no. 9770, pp. 1019–1031, 2011.
- [49] C. Reitz and R. Mayeux, "Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers," *Biochemical Pharmacology*, vol. 88, no. 4, pp. 640–651, 2014.
- [50] F. Di Domenico, E. Barone, M. Perluigi, and D. A. Butterfield, "Strategy to reduce free radical species in Alzheimer's disease: an update of selected antioxidants," *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 15, no. 1, pp. 19–40, 2015.
- [51] C. R. Giordano, L. J. Terlecky, A. Bollig-Fischer, P. A. Walton, and S. R. Terlecky, "Amyloid- β neuroprotection mediated by a targeted antioxidant," *Scientific Reports*, vol. 4, article 4983, 2014.
- [52] C. D. SanMartin, T. Adasme, C. Hidalgo, and A. C. Paula-Lima, "The antioxidant N-acetylcysteine prevents the mitochondrial fragmentation induced by soluble amyloid- β peptide oligomers," *Neurodegenerative Diseases*, vol. 10, no. 1–4, pp. 34–37, 2012.
- [53] B. P. Hubbard and D. A. Sinclair, "Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 35, no. 3, pp. 146–154, 2014.
- [54] L. Shen and H.-F. Ji, "Vitamin E: supplement versus diet in neurodegenerative diseases," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 18, no. 8, pp. 443–445, 2012.
- [55] T. Persson, B. O. Popescu, and A. Cedazo-Minguez, "Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail?" *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, Article ID 427318, 11 pages, 2014.
- [56] M. Gammone, G. Riccioni, and N. D'Orazio, "Marine carotenoids against oxidative stress: effects on human health," *Marine Drugs*, vol. 13, no. 10, pp. 6226–6246, 2015.
- [57] S. Dodd, O. Dean, D. L. Copolov, G. S. Malhi, and M. Berk, "N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility," *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 8, no. 12, pp. 1955–1962, 2008.
- [58] O. Dean, F. Giorlando, and M. Berk, "N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action," *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, vol. 36, no. 2, pp. 78–86, 2011.
- [59] R. Bull, J. P. Finkelstein, A. Humeres, M. I. Behrens, and C. Hidalgo, "Effects of ATP, Mg²⁺, and redox agents on the Ca²⁺ dependence of RyR channels from rat brain cortex," *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 293, no. 1, pp. C162–C171, 2007.
- [60] Q. Huang, C. D. Aluise, G. Joshi et al., "Potential in vivo amelioration by N-Acetyl-L-cysteine of oxidative stress in brain in human double mutant APP/PS-1 knock-in mice: toward therapeutic modulation of mild cognitive impairment," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 88, no. 12, pp. 2618–2629, 2010.
- [61] S. Franceschelli, M. Pesce, A. Ferrone et al., "Astaxanthin treatment confers protection against oxidative stress in U937 cells stimulated with lipopolysaccharide reducing O₂-production," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 2, Article ID e88359, 2014.
- [62] E. Rodrigues, L. R. B. Mariutti, and A. Z. Mercadante, "Scavenging capacity of marine carotenoids against reactive oxygen and nitrogen species in a membrane-mimicking system," *Marine Drugs*, vol. 10, no. 8, pp. 1784–1798, 2012.
- [63] Y. Ni, M. Nagashimada, F. Zhuge et al., "Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: a comparison with vitamin E," *Scientific Reports*, vol. 5, Article ID 17192, 2015.
- [64] X. Wen, A. Huang, J. Hu et al., "Neuroprotective effect of astaxanthin against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells: involvement of the Akt/GSK-3 β pathway," *Neuroscience*, vol. 303, pp. 558–568, 2015.
- [65] C. L. L. Saw, A. Y. Yang, Y. Guo, and A.-N. T. Kong, "Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 62, pp. 869–875, 2013.
- [66] R. Brigelius-Flohé and L. Flohé, "Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 15, no. 8, pp. 2335–2381, 2011.
- [67] C. Li, P. Hossieny, B. J. Wu, A. Qawasmeh, K. Beck, and R. Stocker, "Pharmacologic induction of heme oxygenase-1," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 9, no. 12, pp. 2227–2239, 2007.
- [68] M. M. Al-Amin, S. Akhter, A. T. Hasan et al., "The antioxidant effect of astaxanthin is higher in young mice than aged: a region specific study on brain," *Metabolic Brain Disease*, vol. 30, no. 5, pp. 1237–1246, 2015.
- [69] J.-P. Yuan, J. Peng, K. Yin, and J.-H. Wang, "Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae," *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 55, no. 1, pp. 150–165, 2011.
- [70] C.-H. Chang, C.-Y. Chen, J.-Y. Chiou, R. Y. Peng, and C.-H. Peng, "Astaxanthin secured apoptotic death of PC12 cells

- induced by β -amyloid peptide 25-35: its molecular action targets," *Journal of Medicinal Food*, vol. 13, no. 3, pp. 548–556, 2010.
- [71] H.-Q. Wang, X.-B. Sun, Y.-X. Xu, H. Zhao, Q.-Y. Zhu, and C.-Q. Zhu, "Astaxanthin upregulates heme oxygenase-1 expression through ERK1/2 pathway and its protective effect against beta-amyloid-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells," *Brain Research*, vol. 1360, pp. 159–167, 2010.
- [72] I. Bezprozvanny and M. P. Mattson, "Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease," *Trends in Neurosciences*, vol. 31, no. 9, pp. 454–463, 2008.
- [73] M. J. Berridge, "Calcium hypothesis of Alzheimer's disease," *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 459, no. 3, pp. 441–449, 2010.
- [74] C. Hidalgo, "Cross talk between Ca^{2+} and redox signalling cascades in muscle and neurons through the combined activation of ryanodine receptors/ Ca^{2+} release channels," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 360, no. 1464, pp. 2237–2246, 2005.
- [75] J. J. Marengo, C. Hidalgo, and R. Bull, "Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels of excitable cells," *Biophysical Journal*, vol. 74, no. 3, pp. 1263–1277, 1998.
- [76] M. Kelliher, J. Fastbom, R. F. Cowburn et al., "Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and β -amyloid pathologies," *Neuroscience*, vol. 92, no. 2, pp. 499–513, 1999.
- [77] A. C. Paula-Lima, T. Adasme, and C. Hidalgo, "Contribution of Ca^{2+} release channels to hippocampal synaptic plasticity and spatial memory: potential redox modulation," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 21, no. 6, pp. 892–914, 2014.
- [78] A. Mukherjee and C. Soto, "Role of calcineurin in neurodegeneration produced by misfolded proteins and endoplasmic reticulum stress," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 23, no. 2, pp. 223–230, 2011.
- [79] F. Liu, I. Iqbal-Grundke, K. Iqbal, Y. Oda, K. Tomizawa, and C.-X. Gong, "Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 45, pp. 37755–37762, 2005.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>

