

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ROL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA MODIFICACIÓN DE LA RED MITOCONDRIAL Y EN LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA 2 DEL RECEPTOR DE RYANODINA INDUCIDOS POR LOS OLIGÓMEROS DEL PÉPTIDO A $\beta$  EN NEURONAS.***

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

***PABLO GIANFRANCO BARATTINI MATTA***

Directora de Tesis: Dra. Andrea Paula-Lima  
Co-Directora de Tesis: Dra. María Antonieta Valenzuela

Santiago-CHILE

Abril 2015

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

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

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

**PABLO GIANFRANCO BARATTINI MATTA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Proteínas y Biotecnología y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_.

**Director de Tesis:**

**Dra. Andrea Paula-Lima** \_\_\_\_\_

**Co-directora de Tesis:**

**Dra. María Antonieta Valenzuela** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Mario Chiong** \_\_\_\_\_

**Dra. Lorena García** \_\_\_\_\_

**Dr. Enrique Jaimovich** \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi directora de Tesis, Dra. Andrea Paula-Lima, por su constante apoyo, consejo y confianza en el trabajo realizado.**

**A la Dra. Cecilia Hidalgo, por incluirme en su equipo de trabajo por creer en mí y en mis capacidades.**

**A la Dra. Carol San Martín, por guiarme durante los primeros pasos que di y enseñarme a continuar adelante.**

**A todos los integrantes del laboratorio de Transducción de Señales Medidas por Calcio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile entre ellos; Dra. Tatiana Adasme, Dr. Genaro Barrientos, Dra. Paola Lanos, Luis Mortecinos, José Galaz, Mónica Silva, Daniela Ponce, Yamile Moore, Bárbara Bruna, Pedro Lobos, Ismael Valdez. Por los buenos momentos y la ayudas de último minuto.**

**A la comisión revisora, que gracias a sus aportes y exigencias me permitieron mejorar este trabajo de tesis y a mí como profesional.**

**A Daniel Veloso y Claudia Matta por todo el apoyo económico, moral y espiritual que me han entregado todos estos años, han sido unos excelentes padres.**

**A los amigos; Sebastián, Pablo, Pietro, Fernanda, Carlos, Iván, Angelica, Claudia, Isis, Gonzalo, Paula, Ilda, Hugo. Sin ellos no podría haber seguido adelante.**

## ABREVIATURAS

4-CMC: 4-Cloro-metilcresol

A $\beta$ : Péptido  $\beta$ -amiloide

A $\beta$ Os: Oligómeros de péptido  $\beta$ -amiloide

APP: Proteína precursora de  $\beta$ -amiloide

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

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

Ca<sup>2+</sup>:IÓN calcio

CICR: Liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por Ca<sup>2+</sup>

DIV: Días *in vitro*

DMSO: Dimetilsulfóxido

Drp-1: Dynamin-relatedprotein 1

EA: Enfermedad de Alzheimer

GSH: Glutación

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol

IP<sub>3</sub>R: Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato

NAC: N-acetil-cisteína

NMDAR: Receptor de N-metil-D-aspartato

PKC: Proteína quinasa C

LTD: Depresión a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido.

RE: Retículo endoplasmático

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Rya: Ryanodina

RyR: Receptor de ryanodina

RyR2: Receptor de ryanodinaisoforma 2

SOD: Superóxidodismutasa

## INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
1. ANTECEDENTES .....	5
1.1. Enfermedad de Alzheimer .....	5
1.2. Papel del péptido $\beta$ -amiloide y sus agregados en la Enfermedad de Alzheimer .....	5
1.3. Rol de A $\beta$ Os en la generación de señales aberrantes de $Ca^{2+}$ en Enfermedad de Alzheimer .....	6
1.4. Receptores de ryanodina y su rol en las señales aberrantes de $Ca^{2+}$ generadas por A $\beta$ Os.....	7
1.5. La liberación de $Ca^{2+}$ mediada por RyR e inducida por los A $\beta$ Os afecta la red mitocondrial neuronal.....	9
1.6. Oligómeros del péptido $\beta$ -amiloide alteran los niveles y producción basal de ROS 11	
1.7. Moléculas antioxidantes podrían bloquear los efectos deletéreos de los A $\beta$ Os. ....	12
2. Hipótesis .....	14
3. Objetivo General.....	14
3.1. Objetivos Específicos.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
4.1. Materiales.....	15
4.1.1. Material biológico.....	16
4.1.2. Equipos .....	16
4.2. MÉTODOS.....	16
4.2.1. Cultivo primario de hipocampo de rata .....	16
4.2.2. Preparación de oligómeros del péptido A $\beta$ .....	17
4.2.3. Cuantificación de neuronas con mitocondrias fragmentadas.....	18
4.2.4. Determinación de peróxido de hidrógeno mitocondrial .....	18
4.2.5. Determinación de superóxido mitocondrial .....	19
4.2.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	20
4.2.7. Análisis estadístico.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Participación de ROS en la fisión mitocondrial inducida por A $\beta$ Os .....	22
5.2 Los A $\beta$ Os inducen aumento en los niveles de $H_2O_2$ en la mitocondria.....	25

5.3. El aumento de los niveles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mitocondrial inducido por los AβOs es prevenido por NAC y EUK-134 .....	25
5.4. Los AβOs inducen aumento en los niveles de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en la mitocondria .....	28
5.5. NAC y EUK-134 previenen el aumento en los niveles de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> mitocondrial inducido por los AβOs.....	28
5.6. La producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> <sup>-</sup> mitocondrial es dependiente de RyR.....	30
5.7. La disminución de los niveles de mRNA RyR2 inducida por AβOs es dependiente de ROS.....	32
6.1. La fragmentación de la red mitocondrial inducida por los AβOs depende de la generación de ROS.....	34
6.2. Los AβOs inducen un aumento en los niveles de ROS mitocondriales.....	36
6.3. Los aumentos de ROS mitocondriales generados por AβOs se deben a la liberación de Ca <sup>2+</sup> mediada por RyR .....	37
6.4. Ca <sup>2+</sup> y ROS median las alteraciones en la expresión de RyR inducidas por AβOs.	39
7. CONCLUSIÓN .....	41
8. PROYECCIONES.....	42
9. BIBLIOGRAFÍA .....	43

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> El antioxidante EUK-134 previene la fragmentación de la red mitocondrial neuronal inducida por los A $\beta$ Os. ....	24
<b>Figura 2:</b> Los antioxidantes NAC y EUK-134 previenen la generación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mitocondrial inducida por los A $\beta$ Os .....	2727
<b>Figura 3:</b> Los antioxidantes NAC y EUK-134 previenen la generación de superóxido mitocondrial inducida por los A $\beta$ Os.....	2929
<b>Figura 4:</b> Los aumentos de los niveles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> <sup>-</sup> mitocondriales inducidos por los A $\beta$ Os requieren de las señales de Ca <sup>2+</sup> mediadas por los RyR .....	31
<b>Figura 5:</b> El antioxidante NAC previene la disminución de los niveles de mRNA de RyR2 inducida por los A $\beta$ Os. ....	33

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de memoria. Los oligómeros solubles sinaptotóxicos del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ Os) son reconocidos como los agentes causantes de la EA. Los A $\beta$ Os se unen a las neuronas hipocampales e inducen la generación de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares persistentes, que se deben a su entrada por el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) y la subsecuente amplificación a través de la activación de los receptores de ryanodina (RyR). Los RyR residen en el retículo endoplasmático (RE) y son activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , liberando  $\text{Ca}^{2+}$  desde el lumen de este compartimiento al citoplasma. Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  persistentes y de baja intensidad generadas por los A $\beta$ Os y mediadas por los RyR inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares por un mecanismo no del todo dilucidado. Por su parte, los ROS disminuyen el umbral de activación de los RyR por  $\text{Ca}^{2+}$ , debido a que la actividad de estos receptores está estrechamente regulada por su estado redox. Antecedentes del laboratorio muestran que los A $\beta$ Os, adicionados en concentraciones subletales a cultivos primarios de neuronas de hipocampo, causan la fragmentación de la red mitocondrial y la disminución de los niveles transcripcionales de la isoforma 2 del RyR (RyR2). Adicionalmente, la incubación previa de las neuronas con el antioxidante general N-acetil-cisteína (NAC) previene la generación de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  aberrantes y la fragmentación de la red mitocondrial inducida por los A $\beta$ Os.

En la presente tesis, se estudiaron los efectos de los antioxidantes NAC y EUK-134 sobre la disfunción mitocondrial y la disminución de la expresión de RyR2 inducidos por los A $\beta$ Os. Para cumplir con este objetivo, se trataron cultivos hipocampales de ratas con 0,5  $\mu\text{M}$  A $\beta$ Os y se evaluó: 1) la generación de ROS en la mitocondria utilizando la sonda MitoSox (que detecta superóxido -  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) o la transfección de las neuronas con HyPerMito (que detecta peróxido de hidrógeno -  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por microscopía confocal; 2) la morfología de la red mitocondrial en neuronas cargadas con el marcador mitocondrial MitoTracker, por microscopía

confocal; y 3) los niveles transcripcionales de RyR2, por PCR en tiempo real. Los resultados muestran que la incubación de las neuronas con 0,5  $\mu$ M A $\beta$ Os generó un aumento lento pero progresivo de la concentración de  $O_2^{\cdot-}$  y de  $H_2O_2$  mitocondrial. El tratamiento previo con NAC o con EUK-134 previno tanto el aumento de los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  como de  $H_2O_2$  inducidos por los A $\beta$ Os. De forma interesante, el tratamiento con ryanodina, un inhibidor de los RyR, también previno el aumento en los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  inducidos por los A $\beta$ Os, sugiriendo que este efecto es mediado por los RyR. Además, la incubación previa de las neuronas con EUK-134 previno la fragmentación de la red mitocondrial inducida por los A $\beta$ Os, tal como se demostró con NAC. Por último, la incubación con NAC también previno de forma significativa la disminución de la expresión de RyR2 inducida por los A $\beta$ Os, sugiriendo que los ROS podrían modular la transcripción de RyR2.

Como conclusión, los datos obtenidos en esta tesis apoyan la idea de que los efectos deletéreos de los A $\beta$ Os sobre la mitocondria y sobre los niveles transcripcionales de RyR2 son mediados por el RyR, cuya actividad es, a su vez, modulada por los ROS. Estos efectos deletéreos de los A $\beta$ Os son prevenidos farmacológicamente por el uso de antioxidantes como el NAC y el EUK-134.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive memory loss. Synaptotoxic soluble oligomers of the  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ O) are recognized as the causative agents of the disease. A $\beta$ O bind to hippocampal neurons and elicit persistent intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals, which are due to its entry by the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and subsequent amplification by the activation of ryanodine receptors (RyR). RyR are resident in endoplasmic reticulum (ER) and are activated by  $\text{Ca}^{2+}$ , releasing  $\text{Ca}^{2+}$  from the lumen of this organelle to the cytoplasm. The persisted RyR-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signals generated in neurons in response to A $\beta$ O induce the production of reactive oxygen species (ROS), by a mechanism not yet fully elucidated. In turn, ROS decrease the threshold of RyR activation by  $\text{Ca}^{2+}$ , since RyR activity is tightly regulated by its redox state. Previous works from the laboratory showed that A $\beta$ O, added at sublethal concentration to primary cultures of hippocampal neurons, induces mitochondrial network fragmentation, increases the concentration of reactive oxygen species (ROS) and causes deregulation of transcriptional levels of RyR2. Interestingly, previous incubation of neurons with the general antioxidant NAC prevented the generation of aberrant  $\text{Ca}^{2+}$  signals and mitochondrial fragmentation induced by A $\beta$ O.

In this thesis, we studied the protective effects of the antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and EUK-134 on the mitochondrial dysfunction and the decrease in RyR2 expression induced by A $\beta$ O. To this, rat hippocampal neurons were treated with 0,5  $\mu\text{M}$  A $\beta$ O to evaluate: 1) Mitochondrial ROS generation, using the MitoSox dye (detects superoxide -  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) or the transfection of the neurons with HyPerMito (detects hydrogen peroxide -  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) by confocal microscopy; 2) Mitochondrial morphology in neurons loaded with the dye MitoTracker, by confocal microscopy; and 3) RyR2 transcriptional levels, by real time PCR. The results showed that the incubation of neurons with 0.5  $\mu\text{M}$  A $\beta$ O generated a slow but progressive increase in the mitochondrial concentration of both  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pretreatment with NAC or EUK-134 prevented this effect. Interestingly, treatment with ryanodine, a RyR inhibitor, also prevented the increase in  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{O}_2^{\cdot-}$  in response to A $\beta$ O,

indicating that RyR mediates this effect. Moreover, preincubation of the neurons with EUK-134 prevented mitochondrial network fragmentation induced by A $\beta$ Os, as previously shown with NAC. Finally, the incubation with NAC also significantly prevented the decrease in RyR2 expression induced by A $\beta$ Os, indicating that ROS might modulate RyR2 transcription.

In conclusion, the data obtained in this study support the idea that the deleterious effects of A $\beta$ Os on mitochondrial morphology and function and on RyR2 expression are mediated by RyR, whose activity is modulated by ROS. These deleterious effects of A $\beta$ Os are prevented pharmacologically by using antioxidants like NAC and EUK-134.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. Enfermedad de Alzheimer**

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia y se caracteriza por la disminución progresiva de las habilidades cognitivas y la pérdida de memoria de los pacientes. Por mecanismos que aún no han sido del todo comprendidos, un extenso proceso de neurodegeneración se inicia en zonas específicas del cerebro y en forma localizada (hipocampo y corteza entorrinal) hasta progresar a un deterioro cerebral masivo que conlleva a la total incapacidad del individuo. El envejecimiento es el principal factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad: cerca del 10% de los individuos sobre los 65 años la desarrollan y los casos alcanzan a los 32% en individuos sobre los 85 años (Association 2014). Como la expectativa de vida ha ido en aumento y los costos individuales asociados a la enfermedad son altos, la EA representa uno de los más importantes problemas de salud pública de nuestro siglo.

### **1.2. Papel del péptido $\beta$ -amiloide y sus agregados en la Enfermedad de Alzheimer**

En el cerebro de los individuos afectados se encuentran lesiones conocidas como placas seniles que, en conjunto con los ovillos neurofibrilares, son los principales marcadores histopatológicos de la enfermedad. El componente mayoritario de las placas seniles es el péptido de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), de 4,5 kDa (Glenner and Wong 1984), que juega un rol central en la disfunción sináptica observada en la EA (Selkoe 2008, Crews and Masliah 2010). La hipótesis más aceptada para explicar la patogénesis de la EA es “la hipótesis de la cascada amiloide” (Haass and Selkoe 2007), que establece que la acumulación y agregación del péptido  $A\beta$  en oligómeros neurotóxicos solubles ( $A\beta$ Os) originan la patogénesis (Ferreira and Klein 2011). Los  $A\beta$ Os se unen específicamente a algunas sinapsis excitatorias, suscitando cambios importantes en la señalización glutamatérgica, afectando los mecanismos de plasticidad sináptica, inhibiendo la producción de la potenciación a largo plazo (LTP) (Lambert, Barlow et al. 1998, Shankar, Li et al. 2008) e induciendo la depresión a largo plazo (LTD) (Li, Hong et

al. 2009). Los A $\beta$ Os causan excitotoxicidad (Brito-Moreira, Paula-Lima et al. 2011, Camandola and Mattson 2011), deterioran y eliminan las sinapsis (Lacor, Buniel et al. 2007, De Felice, Vieira et al. 2009) e inducen una reducción de las vesículas sinápticas llevando a una falla en la neurotransmisión (Parodi, Sepulveda et al. 2010). Todos los efectos sinaptotóxicos mencionados están relacionados con una alteración de la homeostasis y de la señalización por Ca<sup>2+</sup> en las neuronas afectadas (Berridge 2010, Gleichmann and Mattson 2011, Zundorf and Reiser 2011).

### **1.3.Rol de A $\beta$ Os en la generación de señales aberrantes de Ca<sup>2+</sup> en Enfermedad de Alzheimer**

La generación de señales prolongadas de Ca<sup>2+</sup> en neuronas en respuesta a la presencia de A $\beta$ Os, está fuertemente implicada en la patogénesis de la EA(Camandola and Mattson 2011). Los A $\beta$ Os promueven la activación los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR), receptor ionotrópico glutamatérgico que permite el influjo de Ca<sup>2+</sup> a la neurona cuando se encuentra activado. La activación de NMDA es fundamental para los procesos de plasticidad sináptica y memoria. Sin embargo, la activación aberrante de los NMDAR forma parte de los mecanismos de disfunción neuronal inducidos por A $\beta$ Os (Li, Hong et al. 2009, Decker, Jurgensen et al. 2010, Decker, Lo et al. 2010) y los aumentos del ingreso de Ca<sup>2+</sup> inducido por los A $\beta$ Os pueden ser bloqueados mediante el uso de antagonistas de NMDAR, incluyendo MK-801 y memantina (De Felice, Velasco et al. 2007, Paula-Lima, Adasme et al. 2011). La memantina es uno de los pocos fármacos disponibles para el tratamiento de la EA. La entrada de Ca<sup>2+</sup> inducida por los A $\beta$ Os y mediada por los NMDAR genera un aumento en la generación de ROS intracelulares(Hensley, Carney et al. 1994). Este aumento de la producción de ROS gatillado por A $\beta$ Os puede bloquearse mediante el uso de antagonistas de NMDAR (De Felice, Velasco et al. 2007). En la misma línea, el uso del quelante selectivo de Ca<sup>2+</sup> BAPTA-AM bloquea completamente la generación de ROS inducido por los A $\beta$ Os (De Felice, Velasco et al. 2007).

#### **1.4. Receptores de ryanodina y su rol en las señales aberrantes de Ca<sup>2+</sup> generadas por AβOs**

Los receptores de ryanodina (RyR) son una familia de canales iónicos expresados de forma ubicua en el retículo endoplasmático (RE) de muchos tipos celulares. Estos canales receptores intracelulares median la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el lumen del RE al citoplasma, a través del mecanismo liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por Ca<sup>2+</sup> (CICR) (Laver 2007). El Ca<sup>2+</sup> que ingresa a través de canales de membrana es el principal agonista de los RyR. La actividad de los RyR es también regulada por otros iones (H<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup>), moléculas pequeñas (ATP), por interacciones proteína-proteína y por modificaciones post traduccionales, incluyendo fosforilaciones y modificaciones redox (Hidalgo and Donoso 2008). Canales individuales muy reducidos incorporados en bicapas responden mal a elevaciones en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático, mientras que el aumento de la oxidación/alquilación de sus cisteínas aumenta la activación de los RyR por Ca<sup>2+</sup>, incluso en presencia del inhibidor Mg<sup>2+</sup> en altas concentraciones (Marengo, Hidalgo et al. 1998). Es por lo ya mencionado, que se ha postulado que los RyR podrían funcionar como detectores de coincidencia del incremento de Ca<sup>2+</sup> y de la producción de ROS inducidos por la activación de los NMDAR postsinápticos (Carrasco and Hidalgo 2006, Hidalgo and Donoso 2008).

Farmacológicamente, los RyR son activados por el alcaloide ryanodina (Rya), compuesto cuyo nombre derivó el del receptor. La Rya posee un rol dual en la actividad de RyR; a bajas concentraciones (en el rango de los nM), Rya favorece la apertura del canal; a concentraciones intermedias (≈10μM), cierra los RyR en un estado de subconductancia a largo plazo; largas incubaciones con altas concentraciones (≥ 10 μM) causan la inhibición irreversible del canal (Bull, Marengo et al. 1989).

Se conocen tres isoformas de RyR en mamíferos (RyR1, RyR2 y RyR3). Todas están presentes en el cerebro mamífero, pero la isoforma RyR2 es la más abundante y RyR3 representa el 30% del total de los RyR (Giannini, Conti et al. 1995, Zhao, Meiri et al. 2000). La disminución de la expresión de los RyR,

sobretudo de la isoforma RyR2, ocurre tempranamente en muestras *post mortem* de cerebros humanos con EA (Kelliher, Fastbom et al. 1999), mientras que se ha sugerido la existencia de un aumento de la expresión de RyR3 y alteración en las señales  $Ca^{2+}$  en diferentes modelos provenientes de ratones transgénicos de la enfermedad (Stutzmann, Smith et al. 2006, Supnet, Grant et al. 2006, Goussakov, Miller et al. 2010). En neuronas primarias corticales, la adición de A $\beta$  extracelular lleva a un incremento en la expresión de RyR3 (Supnet, Grant et al. 2006), lo que se ha propuesto que juega un papel neuroprotector en los ratones TgCRND8, modelos transgénicos para la EA (Supnet and Bezprozvanny 2010). Por otro lado, el tratamiento de neuronas corticales con fibrillas de A $\beta$  promueve la liberación de  $Ca^{2+}$  desde ER a través del RyR y del receptor de inositoltrifosfato (IP $_3$ R), induciendo estrés de retículo, estrés oxidativo y muerte celular (Ferreiro, Oliveira et al. 2008, Resende, Ferreiro et al. 2008). Finalmente, un aumento en el reclutamiento de RyR contribuiría a la pérdida de la homeostasis de  $Ca^{2+}$  en ratones jóvenes, adultos y envejecidos con EA (Stutzmann, Smith et al. 2006), efecto que parece ser particularmente importante en las espinas dendríticas (Goussakov, Miller et al. 2010).

Los canales RyR tienen un rol sobre la plasticidad sináptica. En ratones, su activación aumenta la actividad cognitiva, mientras que la disminución de su expresión o su inhibición induce el efecto opuesto en diferentes pruebas de aprendizaje y memoria (Balschun, Wolfer et al. 1999, Galeotti, Quattrone et al. 2008, Adasme, Haeger et al. 2011). Además, la alteración tanto en su expresión como en su funcionalidad posee un potencial efecto en la EA. Se ha estudiado en detalle los efectos de los A $\beta$ O $_2$  en la generación de las señales  $Ca^{2+}$  mediadas por RyR sobre distintos procesos celulares importantes para la función sináptica de neuronas hipocámpales (Adasme, Haeger et al. 2011, Paula-Lima, Adasme et al. 2011, Sanmartin, Adasme et al. 2012). Uno de los efectos importantes encontrados son los cambios en la expresión de los RyR inducidos por los A $\beta$ O $_2$ . Ante concentraciones subletales de A $\beta$ O $_2$ , se generan señales prolongadas de  $Ca^{2+}$  en las neuronas que causan una disminución transitoria de la expresión de la isoforma RyR2, con un incremento tardío en la isoforma RyR3. Estos producen un

impacto importante en el remodelamiento de las espinas dendríticas (Paula-Lima, Adasme et al. 2011). Por otro lado, el factor neurotrófico derivado del cerebro o BDNF aumenta la expresión de RyR2 y RyR3 e induce el incremento en la longitud de las espinas dendríticas. Los efectos de BDNF son prevenidos al incubarse las neuronas con A $\beta$ Os (Adasme, Haeger et al. 2011, Paula-Lima, Adasme et al. 2011).

La liberación de Ca<sup>2+</sup> gatillada por A $\beta$ Os y mediada por los RyR en neuronas hipocámpales de rata promueve la fragmentación de su red mitocondrial. Por otro lado, la inhibición de los canales RyR con Rya confiere protección significativa contra estos efectos cuando ésta es incubada de manera previa a la adición de A $\beta$ Os (Paula-Lima, Adasme et al. 2011). Estos resultados sugieren que la liberación de Ca<sup>2+</sup> gatillada por los A $\beta$ Os y mediada por los RyR podría estar relacionada con efectos deletéreos de los A $\beta$ Os sobre la función mitocondrial y, probablemente, con la producción de ROS en este organelo.

### **1.5. La liberación de Ca<sup>2+</sup> mediada por RyR e inducida por los A $\beta$ Os afecta la red mitocondrial neuronal**

Una simple neurona alberga varios cientos de mitocondrias, las cuales son organelos dinámicos que se dividen, fusionan y se mueven entre el axón y las dendritas con diferentes finalidades (Mattson, Gleichmann et al. 2008). Se ha demostrado que la extensión o el movimiento de las mitocondrias hacia las dendritas incipientes esta correlacionada con el remodelado de las espinas dendríticas (Westermann 2010). La dinámica mitocondrial, la cual involucra la fisión (división del organelo en dos o más estructuras independientes) y la fusión (la unión de dos organelos mitocondrias en uno solo), juega un rol en las múltiples funciones celulares, incluyendo división celular y diferenciación (Westermann 2010).

La disfunción mitocondrial es una característica prominente en la EA (Mattson, Gleichmann et al. 2008). Wang y cols. han demostrado que los A $\beta$ Os reducen la densidad mitocondrial en los procesos neuronales y causan fragmentación de la red mitocondrial. Sus resultados también muestran que en las

neuronas piramidales de los cerebros afectados por la EA, las mitocondrias se redistribuyen alejándose de los axones (Wang, Su et al. 2009). Más importante aún, la pérdida de espinas dendríticas inducida por los A $\beta$ O es esta correlacionada con la alteración en la distribución de la red mitocondrial (Wang, Su et al. 2009). Asimismo, el tratamiento de las neuronas con los A $\beta$ O causa una disminución significativa de los niveles de la proteína GTPasa asociada a Dinamina 1 (Drp-1). Drp-1 es un componente clave de esta maquinaria de fisión mitocondrial (Osteryoung and Nunnari 2003). Los A $\beta$ O alteran además los niveles de otras proteínas involucradas en la fusión mitocondrial, de manera dosis dependiente (Wang, Su et al. 2009). Estos datos indican que las alteraciones en la dinámica mitocondrial jugarían un importante rol en las anomalías sinápticas inducidas por los A $\beta$ O (Wang, Su et al. 2009).

La visualización de sitios de contacto entre retículo endoplasmático y mitocondria y la determinación de los cambios en la localización de las señales de Ca<sup>2+</sup> revelan la existencia de microdominios, donde ocurre de forma espacialmente limitada la transferencia de Ca<sup>2+</sup> (Csordas, Varnai et al. 2010). Las mitocondrias tienen un efecto tamponante en las señales de Ca<sup>2+</sup>, pero también influyen en la propagación de estas señales. Pueden operar o como barrera o como un factor facilitante en la propagación de las señales de Ca<sup>2+</sup>, modificando las señales de Ca<sup>2+</sup> mediadas por IP<sub>3</sub>R y RyR (Alonso, Villalobos et al. 2006). Sin embargo, la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial es perjudicial para su función y puede ser una causa importante de la generación excesiva de ROS (Peng and Jou 2010). También se observó que neuronas que exhiben estrés oxidativo aumentado en la EA, exhiben un aumento del daño mitocondrial y de la autofagia (Hirai, Aliev et al. 2001, Moreira, Siedlak et al. 2007). Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la fragmentación mitocondrial inducida por los A $\beta$ O puede ser prevenida tanto por la inhibición de RyR como también por el uso del antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC). Esto demuestra que la fragmentación mitocondrial inducida por los A $\beta$ O es dependiente de la liberación de Ca<sup>2+</sup> mediada por RyR y de la presencia de ROS en el citoplasma (Paula-Lima, Adasme et al. 2011, Sanmartín, Adasme et al. 2012).

## **1.6. Oligómeros del péptido $\beta$ -amiloide alteran los niveles y producción basal de ROS**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son importantes moléculas de señalización en el aprendizaje y la memoria en mamíferos. Juegan un rol central en la generación de LTP promoviendo la activación de PKC (Knapp and Klann 2000) y la modulación de canales  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Li, Segui et al. 1998). Sin embargo, son más conocidos por sus efectos dañinos. El desbalance y aumento de la producción de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) han sido implicados en el proceso neurodegenerativo subyacente en la EA (Abramov, Canevari et al. 2004, Kishida and Klann 2007).

Con anterioridad se ha reportado que el péptido  $\text{A}\beta$  altera los niveles de ROS neuronales cómo también se ha propuesto a la mitocondria como su principal fuente a través de la alteración de su actividad redox (Behl, Davis et al. 1994, Hensley, Carney et al. 1994). La mitocondria es la mayor fuente de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la célula, incluso bajo condiciones fisiológicas, debido a la actividad de la cadena transportadora de electrones (Mari, Morales et al. 2009). Ante lo anterior, la mitocondria presenta una serie de defensas contra el estrés oxidativo. La enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte el radical superóxido en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , molécula mucho menos reactiva que  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pero con mayor vida media y con la capacidad de difundir a través de las membranas. Si no se limita la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , este puede difundir hacia el citosol (Golden and Patel 2009, Mari, Morales et al. 2009). La mitocondria carece de enzima catalasa, por lo que la degradación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  está dada por glutatión peroxidasa, enzima que depende del cofactor tripeptídico glutatión (GSH) (Mari, Morales et al. 2009).

En cerebros de pacientes con EA se ha evidenciado un aumento del estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y posterior muerte celular (Mari, Morales et al. 2009, Huang, Aluise et al. 2010), esto acompañado de una mayor producción de ROS, reducción de GSH y reducción de enzimas antioxidantes mitocondriales como glutatión peroxidasa (Huang, Aluise et al. 2010, Mazzetti, Fiorile et al. 2015). Así, los  $\text{A}\beta\text{Os}$  podrían contribuir al daño neuronal a través del aumento de la

generación de ROS y se ha propuesto que este daño puede ser prevenido por medio del uso de algunos antioxidantes (Behl, Davis et al. 1994, Mattson and Goodman 1995).

### **1.7. Moléculas antioxidantes podrían bloquear los efectos deletéreos de los A $\beta$ Os.**

El NAC es una molécula con propiedades antioxidantes gracias a su grupo tiol, además provee cisteína, reactivo limitante para la síntesis de GSH (Mazzetti, Fiorile et al. 2015). La incubación de neuronas hipocampales *in vitro* con NAC previene completamente el aumento aberrante de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> inducido por los A $\beta$ Os (Paula-Lima, Adasme et al. 2011). Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que los agentes reductores suprimen la activación por Ca<sup>2+</sup> de RyR en neuronas corticales (Bull, Finkelstein et al. 2007) y que la estimulación de campo de alta frecuencia en neuronas corticales e hipocampales promueven liberación de Ca<sup>2+</sup> mediada por Ca<sup>2+</sup> a través de los RyR, lo que es prevenido por la preincubación con el antioxidante general NAC (Riquelme, Alvarez et al. 2011). Así, lo anterior se condice con que la administración de NAC por medio de agua potable a un modelo de ratón transgénico de AD (ratón APP/PS-1) suprimió la oxidación proteica y nitrosilación en el cerebro de ratones envejecidos de 9 y 12 meses (Huang, Aluise et al. 2010).

Por otro lado, antioxidantes catalíticos son mucho más potentes en la reducción de ROS dado que presentan la ventaja de no actuar de manera estequiométrica con las diferentes especies oxidantes. Entre ellos se encuentran los compuestos EUK, los que tienen actividad catalítica mimética de SOD/catalasa. Estas moléculas contienen un átomo manganeso coordinado por cuatro ligandos axiales, el cual es clave para ejercer su actividad catalítica (Golden and Patel 2009). Los compuestos EUK han demostrado tener propiedades mitoprotectoras (Doctrow, Liesa et al. 2012), y de proteger contra la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivos *in vitro* (Mohammadi and Yazdanparast 2010). En un modelo ratón transgénico de la EA (3xTg-AD) redujo los niveles de lipoperoxidación de la mano de un aumento en el desempeño del ensayo de

aprendizaje por condicionamiento al miedo en ratones envejecidos de 9 y 12 meses (Clausen, Xu et al. 2012).

En esta tesis se estudió la posible relación causal entre el aumento en los niveles de ROS mitocondrial con la fragmentación mitocondrial y con la disminución de los niveles de expresión de la isoforma de RyR2 gatillados por A $\beta$ Os. Se estudió la posibilidad de que el NAC y el antioxidante mitoprotector EUK-134, pudiesen revertir efectos sinaptotóxicos de los A $\beta$ Os en cultivos primarios maduros de neuronas de hipocampo de rata.

## **2. Hipótesis**

“Los antioxidantes NAC y EUK-134 previenen la generación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) mitocondrial inducida por los oligómeros del péptido A $\beta$  (A $\beta$ Os), evitando el efecto deletéreo de los A $\beta$ Os sobre la expresión de RyR2 y la dinámica mitocondrial en neuronas primarias de hipocampo.”

## **3. Objetivo General**

Investigar el posible rol protector de antioxidantes NAC Y EUK-134 sobre los efectos deletéreos de los A $\beta$ Os en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales, la fragmentación de la red mitocondrial y en la disminución de la expresión de RyR2 en neuronas primarias de hipocampo de rata.

### **3.1. Objetivos Específicos**

- 1) Evaluar si los antioxidantes NAC y EUK-134 ejercen efectos protectores en la generación mitocondrial de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  inducida por los A $\beta$ Os.
- 2) Evaluar si el antioxidante EUK-134previene la fragmentación de la red mitocondrial inducida por los A $\beta$ Os.
- 3) Evaluar si el antioxidante NAC previene la disminución de la expresión de la isoforma 2 del receptor de ryanodina (RyR2) inducida por los A $\beta$ Os.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

Los reactivos usados se obtuvieron de los siguientes proveedores:

- Amersham Pharmacia Biotech: Reactivo de quimioluminiscencia (ECL). Películas fotográficas.
- Ambion: ADNasa Turbo ADN-free™ kit.
- Bachem: Péptido A $\beta$  (1-42).
- BioRad: Membrana de PVDF.
- Cayman chemical: EUK-134.
- Costar: Pipetas plásticas desechables de 5 mL y 10 mL.
- Dako North America: Dako medio de montaje.
- Evrogen: Plásmido que codifica para la proteína sensora HyperMito.
- Falcon: Placas de cultivo 60 mm y 35 mm, tubos de centrifuga plásticos 15 mL y 50 mL.
- Gibco™: Suplemento B27 (con antioxidantes), fungizona, penicilina, estreptomicina, suero fetal bovino y suero de caballo.
- Invitrogen: Medios Neurobasal y *Dulbecco`s modified essential medium*(DMEM), Glutamax™, tripsina-EDTA, Lipofectamine™ 2000 reagent, Trizol y DNA binding dye SyBrGreen.
- Marienfeld: Cubre objetos de 25 mm y 12 mm.
- Merck: Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes.
- Molecular Probes: MitoTracker Orange CMTMRos, MitoSox.
- Promega: Transcriptasa reversaImprom-II™.
- Sigma-Aldrich: 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFP), dimetilsulfóxido (DMSO).
- Thermo: Placas de cultivo de 4 pocillos.

#### **4.1.1. Material biológico**

Se utilizaron embriones de ratas Sprage-Dawley obtenidos de ratas preñadas de 18 días de gestación, provenientes del Bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Todos los estudios se realizaron de acuerdo al protocolo CBA# 0431 FMUCH aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

#### **4.1.2. Equipos**

- Microscopio Confocal Carl ZeissAxiovert 200M-LSM Pascal 5
- Espectrofotómetro Biophotometer plus Eppendorf.
- Lector de micro-placa Biotek, modelo Synergy 2 (Winooski, VT).
- Incubador CO<sub>2</sub> Series 8000 WL Thermo Scientific.
- Microcentrifuga refrigerada Jouan CR3i Multifunction Thermo Scientific.
- Real Time MX3000P, Stratagene.
- Sala de Cultivo Celular con campana de flujo laminar certificada para uso, incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>.
- Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler.

## **4.2. MÉTODOS**

### **4.2.1. Cultivo primario de hipocampo de rata**

Los cultivos se preparan a partir de embriones de ratas Sprague-Dawley con 18días de gestación. Las ratas se eutanizan en una cámara con CO<sub>2</sub> a un flujo aproximado 20% del volumen de la cámara por minuto durante 5 minutos para la obtención de los embriones. Los cerebros extraídos de los embriones se mantuvieron en una solución salina HANKS balanceada a pH 7,4 a 4°C (NaCl 135 mM; KCl 5,4 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,33 mM; y D-glucosa 5,5mM). Posteriormente se retiraron las meninges bajo lupa en campana de flujo laminar y se disecaron los hipocampos, los cuales se lavaron tres veces con solución

HANKS. Después del segundo lavado el tejido fue incubado en solución HANKS suplementada con 0,25% tripsina por 8 min a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de tres lavados con HANKS, el tejido se disoció mecánicamente en medio de adhesión (DMEM, D-glucosa 19,4mM; NaHCO<sub>3</sub> 26 mM; suplementado con 10% de suero de caballo; 10 U/mL de penicilina; 10µg/mL de estreptomycin). Los fragmentos de tejido no disgregados se sedimentaron por centrifugación a 800 rpm durante 10 segundos, las células en suspensión se recuperaron y sembraron a una densidad de 40.000 células por cubreobjeto de 12 mm de diámetro o a una densidad de 1.500.000 células por placa de 60 mm, ambos previamente tratados con poli-Lisina(50 µg/mL). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% deCO<sub>2</sub>. Cuarenta minutos después de ser sembradas, el medio de adhesión se cambió por Neurobasal Completo (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 cultivo por 18 a 21 días *in vitro* (18-21 DIV) antes de los tratamientos.

#### **4.2.2. Preparación de oligómeros del péptido Aβ**

La preparación de oligómeros se realizó según descrito en (Paula-Lima et al., 2011, San Martin y cols., 2012). El péptido Aβ (1-42) se solubilizó en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) frío para obtener una solución final de 1 mM. Luego, 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 una película de Aβ que se guardó a -20°C. En el momento del uso, se descongelaron las películas de Aβ y se disolvieron con dimetilsulfóxido (DMSO) 100% a concentración de 5 mM. Luego se agregó tampón fosfato salino (PBS) estéril para obtener la concentración de 100 µM, y se incubó por 24 h a 4°C. Luego, se centrifugó por 10 minutos a 14.000 g a 4°C para eliminar los agregados insolubles y se traspasó el sobrenadante, conteniendo los oligómeros solubles del péptido Aβ (AβOs), a tubos limpios que se guardaron a 4°C. Sólo AβOs preparados frescos (no más de 48 horas) se utilizaron para todos los experimentos.

#### **4.2.3. Cuantificación de neuronas con mitocondrias fragmentadas**

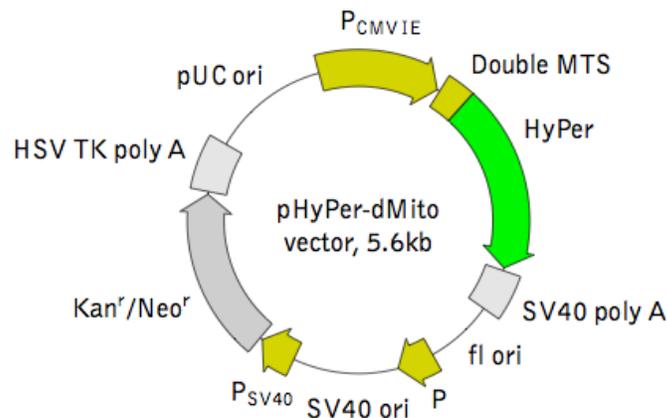
Las neuronas primarias hipocampales de 21 DIV mantenidas y tratadas en cubreobjetos de 12 mm se incubaron con 50 nM de la sonda fluorescente con destinación mitocondrial MitoTracker Orange CMTMRos por 20 min a 37°C y se fijaron con PFA 4% por 5 min a 37°C. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS y los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjeto con el medio de montaje DAKO. Las células se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM Pascal 5. Las imágenes se adquirieron con un objetivo de inmersión en aceite 40X. De acuerdo a la morfología mitocondrial, se contó el número de neuronas presentando la red mitocondrial fragmentada y el número de neuronas presentando la red continua, evaluándose 10 diferentes campos ópticos por condición, contándose aproximadamente 15 neuronas en cada una de las condiciones evaluadas, en tres experimentos independientes.

#### **4.2.4. Determinación de peróxido de hidrógeno mitocondrial**

Las neuronas hipocampales sembradas en cubreobjetos de 25 mm se mantuvieron entre 14-16 DIV en cultivo, y luego se evaluaron los niveles relativos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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, ver esquema a continuación) con lipofectamina 2000 según las recomendaciones del fabricante, con una proporción de µg de ADN y µL de lipofectamina de 1:2. Al día siguiente de la transfección, las neuronas se sometieron a tratamientos con NAC 10 mM por 30 min, EUK-134 20 µM por 2 horas o Rya 50 µM por 1 hora. 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<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) y fueron llevadas al microscopio confocal, donde se midió 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 AβOs. 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.

#### Plamidio HyperMito



(Figura extraída de: (<http://www.evrogen.com/vector-descriptions/pHyPer-dMito/pHyPer-dMito.pdf>).

#### 4.2.5. Determinación de superóxido mitocondrial

Las neuronas hipocampales sembradas en cubreobjetos de 25 mm se mantuvieron en cultivo entre 14-16 días. A continuación, se evaluó la generación de  $O_2^-$ -mitocondrial, en distintas condiciones, por microscopía confocal. Para ello, se incubaron las neuronas con NAC 10 mM por 30 min, EUK-134 20  $\mu$ M por 2 horas o Rya 50  $\mu$ M por 1 hora. Luego se cargaron durante 20 minutos a 37°C con 1  $\mu$ M MitoSOX™ (Excitación: 514nm.Emisión: 580 nm) (Molecular Probes, CA), preparada en medio extracelular Tyrode. Una vez terminado el tiempo de carga, se lavaron con medio Tyrode y las neuronas fueran transferidas al microscopio

confocal para determinación de los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial. Las imágenes se adquirieron cada 15 segundos en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM Pascal 5 utilizando el objetivo de 63X de inmersión en aceite. Para cada condición, se delimitaron 3-10 regiones de interés (ROIs) en 1 – 3 neuronas por campo. Se determinó la fluorescencia de MitoSox por 200 segundos hasta lograr estabilización de la señal basal y a continuación se registraron los cambios en la intensidad de fluorescencia al agregar 0,5  $\mu$ M de A $\beta$ Os. Los experimentos se repitieron en triplicado utilizando tres cultivos distintos. La variación en los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  se monitoreó a través de los cambios de fluorescencia de MitoSox y se presentó como la razón  $F_1/F_0$ , donde  $F_1$  corresponde a la fluorescencia experimental y  $F_0$  a la fluorescencia basal previa estimulación. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

#### **4.2.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Neuronas hipocampales mantenidas en placas de 60 mm se trataron con el antioxidante NAC por 30 min, a continuación se incubaron con 0,5  $\mu$ M de A $\beta$ Os durante 6 horas. El mRNA total de los cultivos tratados en distintas condiciones se aisló con el reactivo Trizol, como descrito en trabajos anteriores (Adasme, Haeger et al. 2011, Paula-Lima, Adasme et al. 2011). Se digirió el DNA genómico contaminante con enzima DNAsa del kit Ambion DNA-free. La pureza del RNA se evaluó por la razón entre absorbancias 260/280. El cDNA se sintetizó a partir de 1  $\mu$ g de RNA usando el kit de transcripción inversa ImProm-II Reverse Transcriptase. Se usaron 25 ng de cDNA en un volumen final de 20  $\mu$ L para su amplificación por PCR (Applied Biosystems Thermal Cycler). La amplificación se realizó usando condiciones detalladas en (Paula-Lima, Adasme et al. 2011). Los niveles de mRNA de RyR2 se determinaron por uso de los siguientes partidores específicos:

(RyR2 sentido/anti-sentido; 5'-AATCAAAGTGGCGGAATTTCTTG-3'/5'-TCTCCCTCAGCCTTCTCCGGTTC-3').

( $\beta$ -actina sentido/anti-sentido; 5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3'/5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3').

El PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) se realizó en triplicado en un sistema de amplificación (MX3000P; Stratagene, La Jolla, CA) usando la sonda de unión a DNA, SYBR Green. Los niveles de mRNA de RyR2 se calcularon mediante el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Pfaffl 2001), y se normalizó con respecto a los niveles mRNA de  $\beta$ -actina. Las curvas de disociación se analizaron para verificar la pureza de los productos.

#### **4.2.7. Análisis estadístico**

Se expresaron los resultados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. El análisis de significancia estadística de los resultados se evaluó con el programa Graph Pad Prism 5. Para las comparaciones múltiples se utilizó análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis posterior con el Test de Tukey. En el caso de las cinéticas de generación de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  se utilizó ANOVA de dos vías seguido de un análisis posterior con el test de Bonferroni.

## 5. RESULTADOS

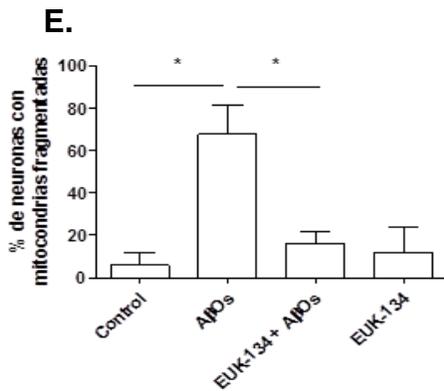
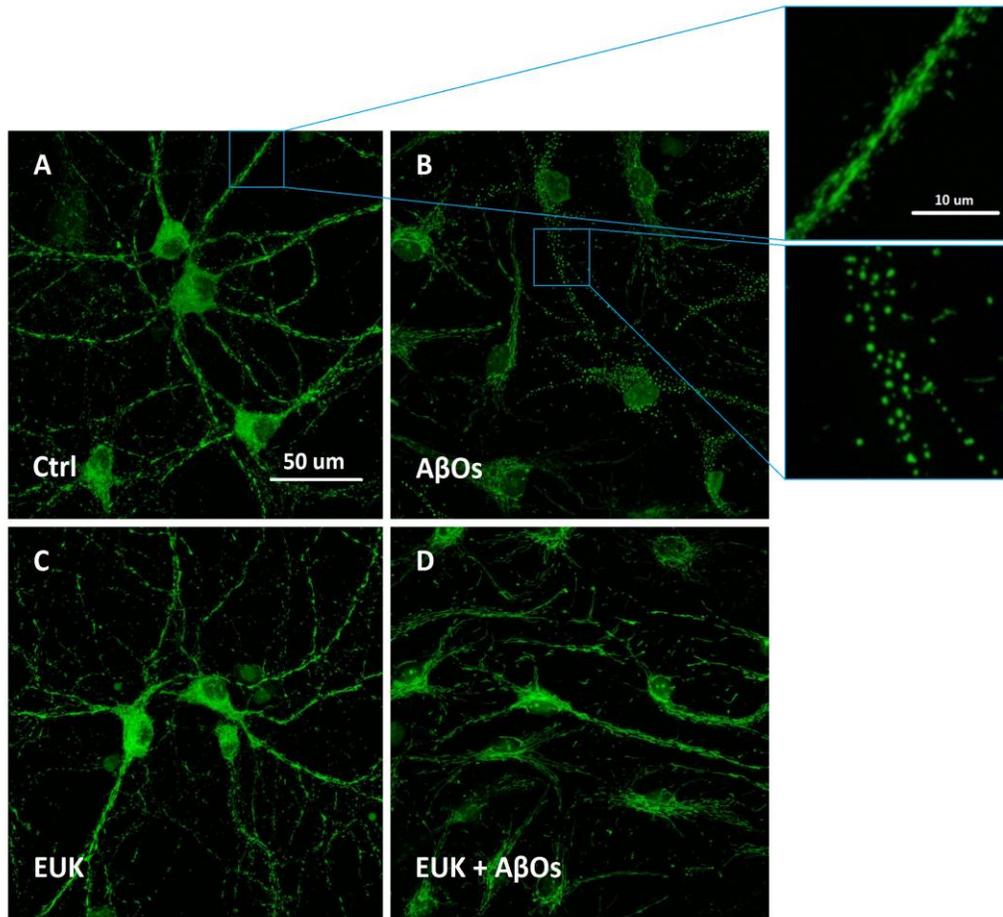
### 5.1. Participación de ROS en la fisión mitocondrial inducida por A $\beta$ Os

Los A $\beta$ Os inducen señales de Ca<sup>2+</sup> anormales provocando la fragmentación de la red mitocondrial neuronal (Wang, Su et al. 2009, Sanmartin, Adasme et al. 2012). Datos de nuestro grupo han demostrado que la activación de los RyR es requerida para la fragmentación mitocondrial inducida por los A $\beta$ Os (Paula-Lima, Adasme et al. 2011, Sanmartin, Paula-Lima et al. 2014). En concordancia, en un trabajo más reciente, demostramos que la activación de los RyR por el agonista farmacológico 4-Cloro-metilcresol (4-CMC) promueve la fragmentación de la red mitocondrial, alterando su capacidad de captación de Ca<sup>2+</sup> (Sanmartin, Paula-Lima et al. 2014).

La actividad y liberación de Ca<sup>2+</sup> mediada por RyR es regulada por sus modificaciones redox (Hidalgo and Donoso 2008). Nuestro grupo demostró que la preincubación con NAC previene la fragmentación de la red mitocondrial inducida por los A $\beta$ Os (Sanmartin, Adasme et al. 2012). En esta tesis, evaluamos si la fragmentación mitocondrial inducida por los A $\beta$ Os podría prevenirse también por el antioxidante EUK-134. Para esto, se preincubaron las neuronas por 2 horas con el antioxidante EUK-134 previo al tratamiento por 24 horas con 0,5  $\mu$ M A $\beta$ Os. Luego del tratamiento con A $\beta$ Os, las neuronas se cargaron con la sonda de destinación mitocondrial, MitoTracker Orange CMTMRos (Molecular Probes) y observaron al microscopio confocal. Las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 40X como se describe en la sección materiales y métodos, se determinó el porcentaje de neuronas que presentaban mitocondrias fragmentadas de acuerdo a la morfología de la red mitocondrial.

El análisis de los campos ópticos obtenidos de las diferentes condiciones experimentales reveló que las neuronas hipocampales maduras exhiben en su mayoría morfología mitocondrial filamentosa de largo variable (Fig. 1. A). Sólo un 6% de las células presentaron mitocondrias puntiformes (Fig. 1. E). Cuando los cultivos neuronales se incubaron con 0,5  $\mu$ M A $\beta$ Os por 24 horas (Fig. 1. B), el número de neuronas que presentó mitocondrias puntiformes cambió

significativamente, aumentando en promedio a un 68% de la población total (Fig.1. E). Sin embargo, en neuronas que se incubaron con 20  $\mu$ M del antioxidante EUK-134 por 2 horas de manera previa y simultánea a la incubación con 0,5  $\mu$ M de A $\beta$ Os por 24 horas (Fig. 1. C), solo un 16% de la población mostró mitocondrias fragmentadas (Fig. 1. E). En otras palabras, se observó un 52% menos de neuronas con la red mitocondrial fragmentada en esta condición, cuando comparadas a la situación control. Finalmente, solo 12% de las neuronas incubadas con 20  $\mu$ M EUK-134 por 2 horas presentaron red mitocondrial puntiforme (Fig. 1. D), no mostrando diferencias significativas en comparación con el control. La cuantificación se presenta como el porcentaje de neuronas con mitocondrias fragmentadas en cada condición en la Fig.1.E. Estos resultados apoyan los datos previos de nuestro laboratorio que muestran que el antioxidante NAC previene los efectos deletéreos de los A $\beta$ Os sobre la red mitocondrial (Sanmartin, Adasme et al. 2012), e indican que la fragmentación de esta red, gatillada por A $\beta$ Os en las neuronas, es mediada por ROS.



**Figura 1: El antioxidante EUK-134 previene la fragmentación de la red mitocondrial neuronal inducida por los AβOs.** A-D. Imágenes representativas de neuronas hipocámpales cargadas con MitoTracker Orange CMTMRos. A. Neuronas control. B. Neuronas incubadas con 0,5 μM AβOs por 24 horas. C. Neuronas preincubadas con 20 μM EUK-134 por 2 horas y tratadas con 0,5 μM AβOs por 24 horas. D. Neuronas incubadas con EUK-134 20 μM por 2 horas. Barra de escala 50 μm y 10 μm. E. Cuantificación del porcentaje de neuronas que presentan mitocondrias fragmentadas. Los valores representan el promedio ± error estándar de tres diferentes experimentos realizados (n=3). Se visualizaron diez campos ópticos por cada condición contado 15 neuronas aprox. por cada campo. Análisis estadístico fue realizado con ANOVA/Bonferroni post test, \*p<0,05.

## **5.2 Los A $\beta$ O<sub>2</sub> inducen aumento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la mitocondria**

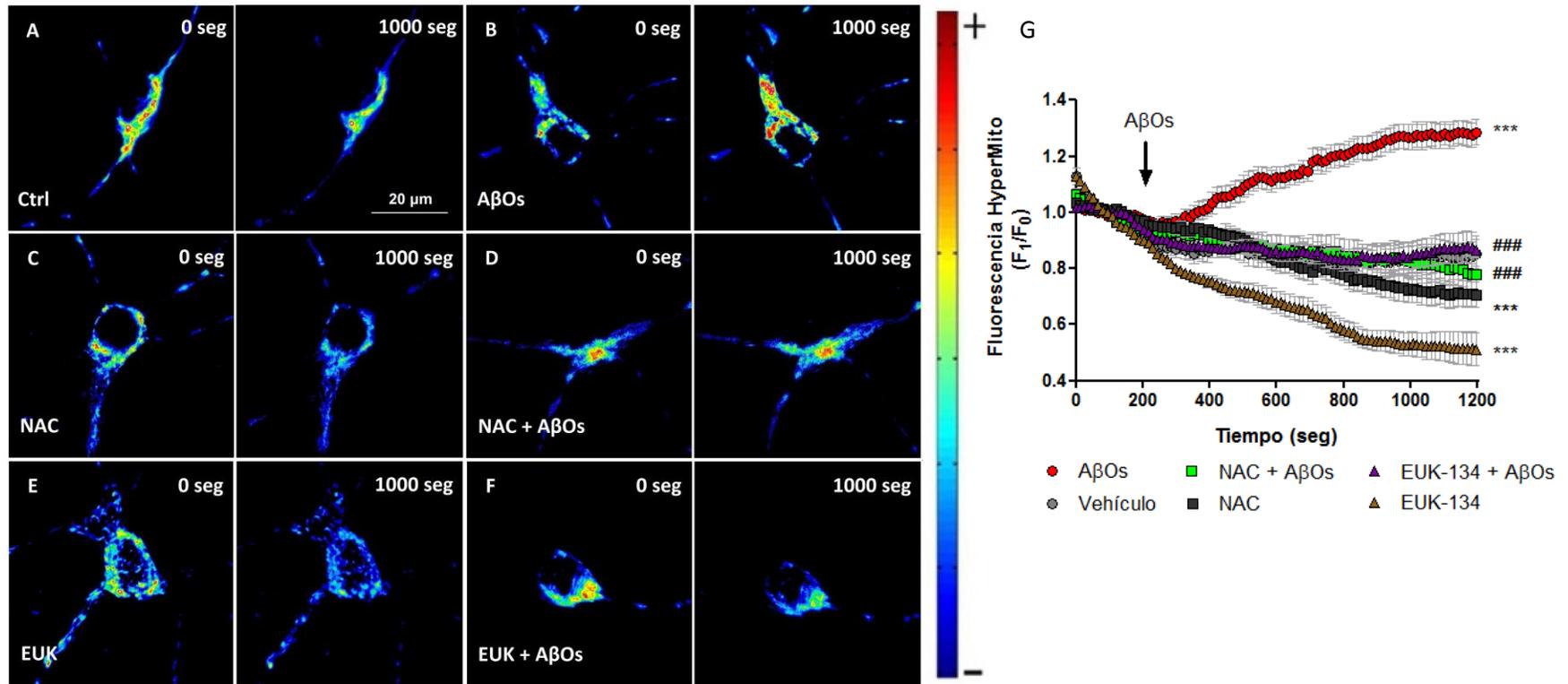
Evaluamos los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial en neuronas estimuladas con A $\beta$ O<sub>2</sub>. Para ello, se transfectaron las neuronas hipocampales con HyPerMito, un plásmido que codifica una proteína fluorescente sensora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con una secuencia de destinación mitocondrial (ver metodología). Veinticuatro horas después de la transfección, los cultivos se observaron al microscopio confocal, donde se adicionaron los diferentes estímulos. En menos de 1 minuto desde la adición de 200  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observó un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia, que fue medida en el soma de las neuronas, comparado con los niveles de fluorescencia detectados en las neuronas control, tratadas con vehículo (Resultados no mostrados). Este experimento permitió verificar que la proteína codificada por el plásmido HyperMito detectaba eficientemente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en nuestro modelo de estudio. A continuación, estudiamos el efecto de los A $\beta$ O<sub>2</sub> sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial. En la Figura 2 A-F se muestran las imágenes obtenidas antes (izquierda) y 800 segundos después (derecha) del estímulo con los 0,5  $\mu$ M A $\beta$ O<sub>2</sub> o vehículo. La cuantificación de estos resultados se muestra graficada en la Fig. 2. G como la razón de la fluorescencia sobre la fluorescencia basal, en el tiempo. El estímulo de las neuronas con A $\beta$ O<sub>2</sub> provocó un aumento significativo de los niveles de fluorescencia a partir de los 100 segundos transcurridos desde su adición. Este aumento se mantuvo en el tiempo, en comparación con las neuronas control tratadas con vehículo, en las cuáles se observó una leve disminución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo (Fig. 2A, B, G). Estos resultados indican que los A $\beta$ O<sub>2</sub> inducen la generación mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en neuronas de hipocampo.

## **5.3. El aumento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial inducido por los A $\beta$ O<sub>2</sub> es prevenido por NAC y EUK-134**

Para verificar si los antioxidantes NAC y EUK-134 previenen la generación de ROS mitocondrial, las neuronas transfectadas con HyPerMito se incubaron previamente con 10 mM NAC por 30 minutos (Fig. 2 C-D) o con 20  $\mu$ M EUK-134 por 2 horas (Fig. 2 E-F), y se estimularon con 0,5  $\mu$ M A $\beta$ O<sub>2</sub> (Fig. 2 D, F) o vehículo (Fig. 2 C, E). Los datos de fluorescencia fueron expresados como la razón de la

fluorescencia sobre la fluorescencia basal en el tiempo en la Fig. 2. G. En las neuronas incubadas con los antioxidantes se evidenció una ligera disminución de la fluorescencia relativa tanto en las neuronas tratadas con NAC (Fig. 2. C, G) como en las tratadas con EUK-134 (Fig. 2. E, G). Estos resultados sugieren que ambos antioxidantes reducen los niveles basales de  $H_2O_2$  mitocondrial en neuronas hipocámpales.

Al agregar  $0,5 \mu M$  de  $A\beta Osa$  las neuronas preincubadas con  $10 mM$  de NAC (Fig. 2. D) o con  $20 \mu M$  de EUK-134 (Fig. 2. F), los niveles de fluorescencia relativa se mantuvieron similares a los niveles de las neuronas control, tratadas con vehículo (Fig. 2. A, G). Estos resultados sugieren que tanto el NAC como el EUK-134 previenen el aumento en los niveles de  $H_2O_2$  en la mitocondria inducido por los  $A\beta Os$ .



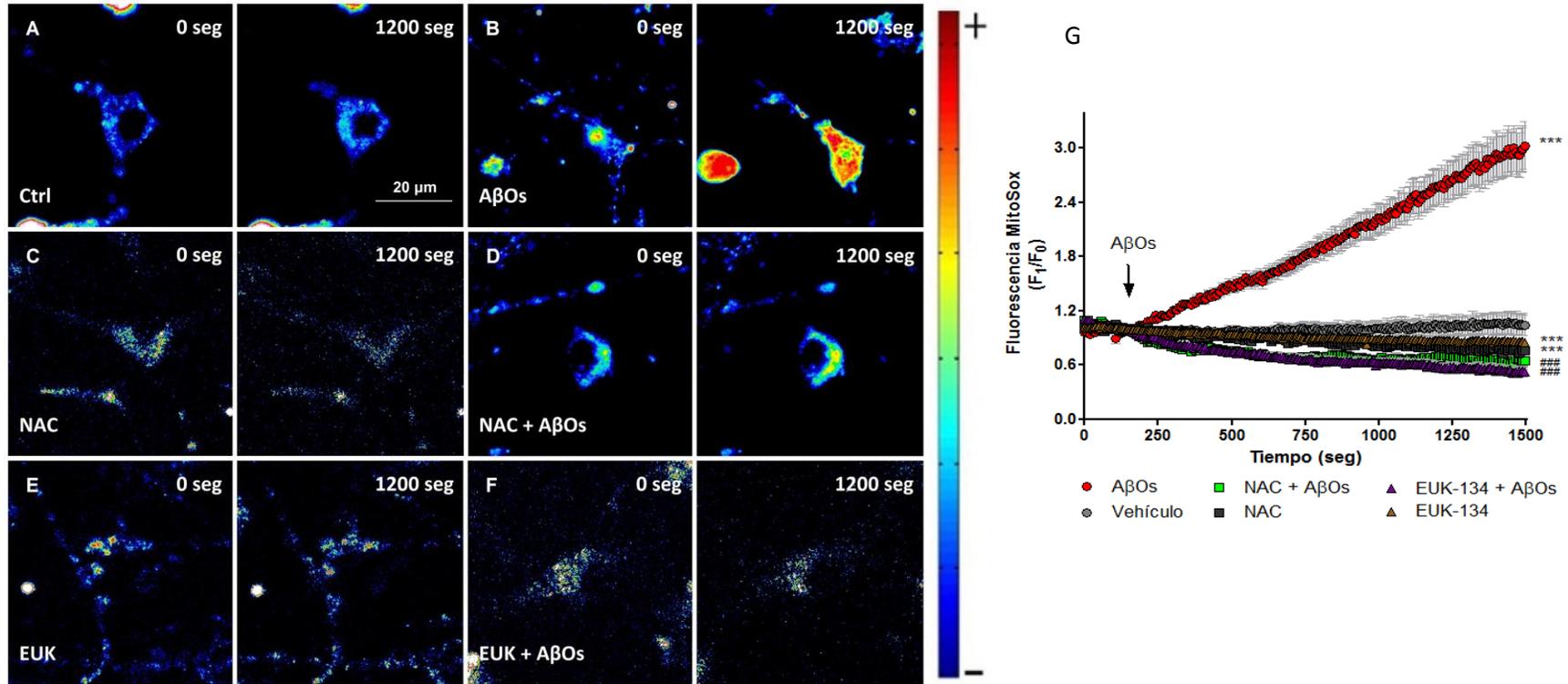
**Figura 2: Los antioxidantes NAC y EUK-134 previenen la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial inducida por los AβOs.** En A-F se muestran imágenes deconvolucionadas representativas de neuronas hipocámpales transfectadas con la proteína fluorescente sensora de peróxido mitocondrial, codificada por el plasmidio HyperMito con el cual las neuronas se transfectaron. A la izquierda están representadas las neuronas en las distintas condiciones 200 segundos antes del estímulo; a la derecha se muestran las imágenes de las mismas neuronas 800 segundos después del estímulo con AβOs o con vehículo, en el caso de las neuronas control. A. Neuronas control. B. Neuronas estimuladas con 0,5 μM AβOs. C. Neuronas preincubadas con NAC por 30 minutos. D. Neuronas preincubadas con 10 mM NAC por 30 minutos y estimuladas con 0,5 μM AβOs. E. Neuronas preincubadas con 20 μM EUK-134 por 2 horas. F. Neuronas preincubadas con 20 μM EUK-134 por 2 horas y estimuladas con 0,5 μM AβOs. Las imágenes se adquirieron con objetivo 63X y zoom de 1.4 en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5. La barra de escala en A corresponde a 20 μm. G. El gráfico representa la cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia en el tiempo en las diferentes condiciones evaluadas. La flecha indica el momento de la adición de 0,5 μM AβOs o vehículo. Para cada condición, se delimitaron regiones de interés (ROIs) en 1 – 3 neuronas por campo, con el fin de monitorear la producción de peróxido a nivel mitocondrial. Los experimentos se repitieron en triplicado utilizando al menos tres cultivos distintos (n≥3). Los cambios en la fluorescencia se graficaron como señal a lo largo del tiempo con respecto a la fluorescencia basal (F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub>) y expresados como el promedio ± error estándar. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una-vía/Bonferroni post test, comparando las distintas condiciones experimentales. \*\*\*, p < 0,001 comparado con control. ###, p < 0,001 comparado con AβOs.

#### **5.4. Los A $\beta$ O<sub>2</sub> inducen aumento en los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en la mitocondria**

Evaluamos los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial en neuronas estimuladas con A $\beta$ O<sub>2</sub>. Para ello, se cargaron las neuronas con 1  $\mu$ M con la sonda MitoSOX™ por 20 minutos y las neuronas se llevaron al microscopio confocal donde los cambios en los niveles de fluorescencia de la sonda se cuantificaron según descrito en metodología (Fig. 3. A-G). Los resultados muestran que en neuronas estimuladas con vehículo (Fig. 3. A) se evidencia un aumento sutil y progresivo en los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial (Fig. 3.G), lo que sugiere que existe una producción basal de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en las mitocondrias neuronales. La adición de los A $\beta$ O<sub>2</sub> promueve un elevación significativa en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que puede ser observada en la Fig. 3. B, donde se comparan sus niveles antes (izquierda) y 1000 segundos después de la adición de A $\beta$ O<sub>2</sub> (Fig. 3. B). La cuantificación de los niveles relativos de O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial en estas condiciones muestra que el aumento inducido por los A $\beta$ O<sub>2</sub> es inmediato y progresivo. (Fig. 3,G). Estos resultados muestran que los A $\beta$ O<sub>2</sub> inducen la generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial.

#### **5.5. NAC y EUK-134 previenen el aumento en los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup>-mitocondrial inducido por los A $\beta$ O<sub>2</sub>**

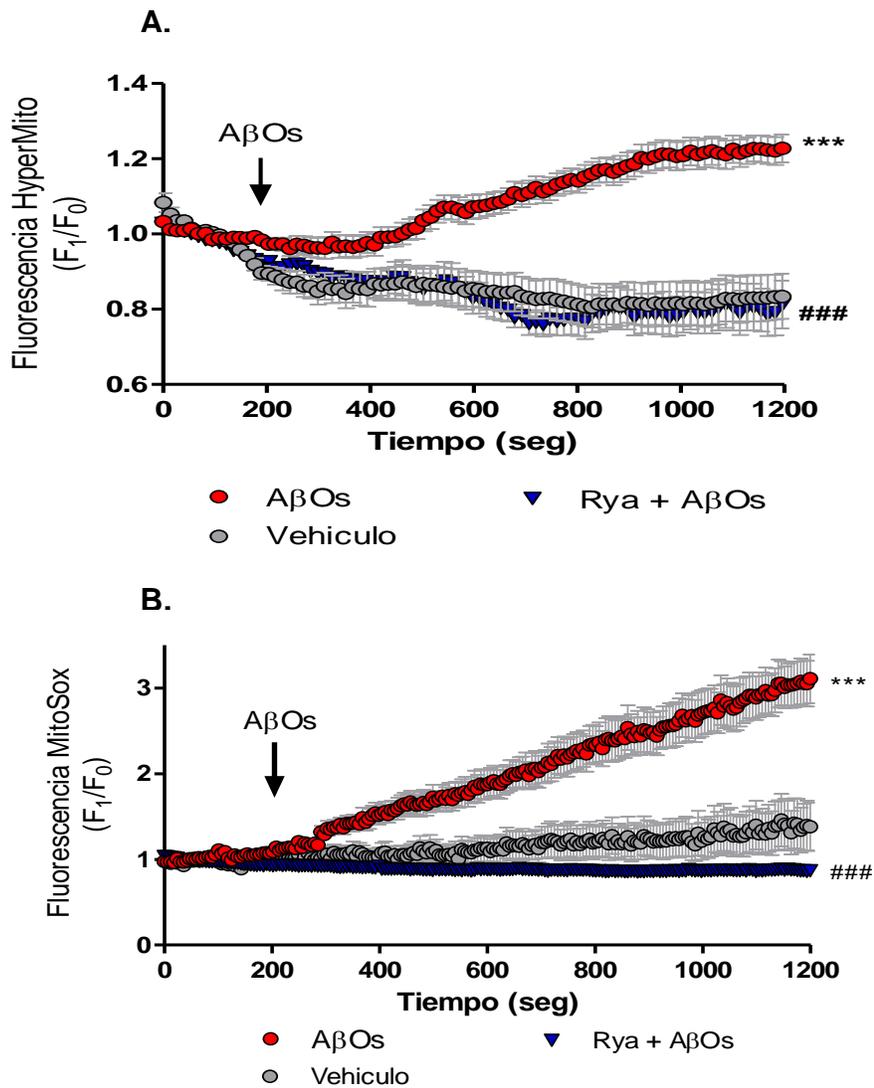
Para verificar el efecto de los antioxidantes sobre la generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial, las neuronas se incubaron con 10 mM NAC por 30 minutos o 20  $\mu$ M EUK-134 por 2 horas, y posteriormente cargadas con 1  $\mu$ M de MitoSOX por 20 minutos. En el microscopio, las neuronas se estimularon con 0,5  $\mu$ M de A $\beta$ O<sub>2</sub>. Las imágenes mostradas en la Fig. 3. A-F muestran las neuronas preincubadas en distintas condiciones antes (izquierda) y después del tratamiento con A $\beta$ O<sub>2</sub> (derecha), mientras la Fig. 3. G. muestra la cuantificación de estos datos. En las neuronas preincubadas con 10 mM NAC por 30 minutos (Fig. 3. C,D) o con 20  $\mu$ M EUK-134 por 2 horas (Fig. 3.E,F), se observó que los niveles de fluorescencia relativos de MitoSOX™ decayeron a niveles menores a los observados en las neuronas control no estimuladas, tratadas con vehículo (Fig. 3. C, E, G) o con A $\beta$ O<sub>2</sub> (Fig. 3. D, F, G). Estos resultados indican que tanto el NAC como el EUK-134 reducen la producción basal de O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial y que además previenen los aumentos en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial inducida por los A $\beta$ O<sub>2</sub>.



**Figura 3:** Los antioxidantes NAC y EUK-134 previenen la generación de superóxido mitocondrial inducida por los AβOs. En A-F se muestran imágenes deconvolucionadas representativas de neuronas hipocámpales cargadas con la sonda fluorescente sensora de superóxido mitocondrial, MitoSOX™. A la izquierda están representadas las neuronas en las distintas condiciones 200 segundos antes del estímulo. A la derecha se muestran las imágenes de las mismas neuronas 1000 segundos después del estímulo con AβOs o con vehículo, en el caso de las neuronas control. A. Neuronas control, tratadas con vehículo. B. Neuronas estimuladas con 0,5 μM AβOs. C. Neuronas preincubadas con NAC por 30 minutos. D. Neuronas preincubadas con 10 mM NAC por 30 minutos y estimuladas con 0,5 μM AβOs. E. Neuronas preincubadas con 20 μM EUK-134 por 2 horas. F. Neuronas preincubadas con 20 μM EUK-134 por 2 horas y estimuladas con 0,5 μM AβOs. Las imágenes se adquirieron con objetivo 63X y zoom de 1.4 en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5. La barra de escala en A corresponde a 20 μm. G. El gráfico representa la cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia en el tiempo en las diferentes condiciones evaluadas. Las neuronas se incubaron con 10 mM NAC o 20 μM EUK-134 por 30 minutos o 2 horas respectivamente. La flecha indica el tiempo de la adición de AβOs 0,5 μM o vehículo. Los cambios en la fluorescencia se registraron antes y después del estímulo, y se graficaron a lo largo del tiempo con respecto a la fluorescencia basal ( $F_1/F_0$ ), expresándose como el promedio  $\pm$  error estándar ( $n \geq 3$ ). Análisis estadístico se realizó con ANOVA una-vía/Bonferroni post test. \*\*\*;  $p < 0,001$  comparado con control. ###;  $p < 0,001$  comparado con AβOs.

## 5.6. La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial es dependiente de RyR

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la protección por NAC se relaciona a la posibilidad de que este antioxidante module negativamente la actividad de los RyR, bloqueando las señales de Ca<sup>2+</sup> inducidas por los AβOs. Para verificar si la liberación de Ca<sup>2+</sup> mediada por los RyR está involucrada en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial inducida por los AβOs, se incubaron las neuronas hipocámpales con Rya50 μM por 1 hora, condición en que los RyR se encuentran inhibidos (Adasme, Haeger et al. 2011), y en el microscopio confocal se estimularon con 0,5 μM AβOs. Se observó que la preincubación con Rya previno el aumento inducido por los AβOs en la intensidad de fluorescencia relativa de las neuronas transfectadas con HyPerMito (Fig. 4.A) o cargadas con MitoSOX™ (Fig. 4.B). En conjunto, estos resultados sugieren que los AβOs inducen un aumento en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> en la mitocondria, efecto que depende de la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplasmático mediada por los RyR, una vez que la inhibición de los RyR previno el aumento en los niveles de ambas ROS inducido por AβOs.

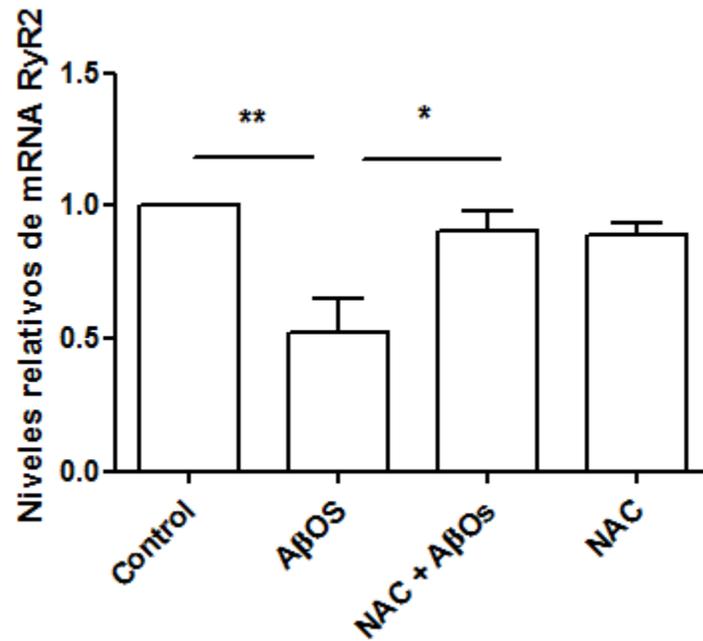


**Figura 4: Los incrementos en los niveles de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  mitocondriales inducidos por los AβOs requieren de las señales de  $Ca^{2+}$  mediadas por los RyR.** A. Las neuronas se incubaron con 50  $\mu M$  Rya por 1 hora, condición en que esta molécula se une e inhibe el RyR. La flecha indica el momento de la adición de AβOs 0,5  $\mu M$  o vehículo. Los cambios en la fluorescencia se registraron antes y después del estímulo, y se graficaron como señal a lo largo del tiempo con respecto a la fluorescencia basal ( $F_1/F_0$ ) y se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar ( $n \geq 3$ ). El análisis estadístico se realizó con ANOVA una-vía/Bonferroni post test. \*\*\*;  $p < 0,001$  comparado con control. ###;  $p < 0,001$  comparado con AβOs.

### **5.7. La disminución de los niveles de mRNA RyR2 inducida por AβOs es dependiente de ROS**

Nuestro grupo demostró previamente que una incubación de 6 horas con los AβOs induce una disminución en la expresión de RyR2 en las neuronas de hipocampo, tanto a nivel de mRNA como de proteína (Paula-Lima, Adasme et al. 2011). Para investigar si la alteración en los niveles transcripcionales de RyR2 inducida por los AβOs en neuronas puede ser también modulada por los ROS, como lo son las señales de  $Ca^{2+}$  (Sanmartin, Adasme et al. 2012), se preincubaron las neuronas de 21 DIV con el antioxidante 10 mM NAC por 30 minutos, y posteriormente se estimularon con 0,5  $\mu$ M AβOs por 6 horas. Los niveles de mRNA de RyR2, normalizados con el “housekeeping”  $\beta$ -actina y expresados como número de veces sobre el control, se determinaron por qPCR utilizando partidores específicos para RyR2 y  $\beta$ -actina, como se describe en la Metodología.

Tal como ha sido descrito (Paula-Lima, Adasme et al. 2011), en neuronas tratadas con 0,5  $\mu$ M AβOs por 6 horas se observó una disminución de los niveles de mRNA de RyR2 en aproximadamente 50% en comparación con los niveles control. En contraste, neuronas pre-incubadas con 10 mM NAC por 30 minutos y estimuladas con AβOs no presentaron una disminución del contenido de mRNA de RyR2. Neuronas incubadas solo con 10 mM NAC por 30 minutos no alteraron de manera significativa los niveles de mRNA de RyR2, comparado con las neuronas control (Fig. 5). Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de mRNA RyR2 inducida por AβOs es dependiente de ROS.



**Figura 5: El antioxidante NAC previene la disminución de los niveles de mRNA de RyR2 inducida por los AβOs.** Cultivos de neuronas hipocampales control o previamente incubadas con 10 mM NAC por 30 minutos se trataron con 0,5 μM AβOs o vehículo e incubadas por 6 horas. Se determinaron los niveles de mRNA de RyR2 por qRT-PCR. Los valores se obtuvieron de experimentos realizados en triplicado normalizado contra β-actina y se expresaron como promedio ± error estándar (n=5 cultivos independientes). El error entre los triplicados en cada experimento fue <0,25. El análisis estadístico se realizó con ANOVA/Bonferroni post test, \*p<0,05; \*\*p<0,01.

## 6. DISCUSIÓN

La “hipótesis de la cascada amiloide” (Haass and Selkoe 2007), la más aceptada para explicar los mecanismos de patogénesis de la EA, postula que la acumulación y agregación del péptido A $\beta$  es la causa de la enfermedad de Alzheimer. Las formas solubles de estos agregados, los A $\beta$ O<sub>s</sub>, gatillan una cascada de eventos dañinos en diferentes modelos experimentales (Ferreira and Klein 2011). Estos eventos incluyen desregulación en la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>, daño oxidativo, cambio en la expresión de genes sinápticos y fragmentación y disfunción mitocondrial, lo que resulta en disfunción sináptica, eliminación de sinapsis y por último muerte celular (Paula-Lima, Adasme et al. 2014). Particularmente, la disfunción mitocondrial es una característica prominente en la EA (Mattson, Gleichmann et al. 2008). En las neuronas piramidales de los cerebros afectados por la EA, las mitocondrias se redistribuyen alejándose de los axones y las neuronas responden perdiendo espinas dendríticas (Wang, Su et al. 2009). Estos antecedentes sugieren que alteraciones en la dinámica mitocondrial jugarían un importante rol en las anomalías sinápticas inducidas por los A $\beta$ O<sub>s</sub> (Wang, Su et al. 2009).

### 6.1. La fragmentación de la red mitocondrial inducida por los A $\beta$ O<sub>s</sub> depende de la generación de ROS

El número, distribución y morfología de las mitocondrias son características propias de cada tipo celular y poseen una relación directa con la función y las demandas energéticas de la célula (Knott, Perkins et al. 2008). En el caso de las neuronas, la distribución física y temporal de las mitocondrias responde a la alta demanda energética de todos los procesos dependientes de ATP que ocurren en el soma, axón y neuritas (Knott, Perkins et al. 2008), formando una red continua e interconectada en el soma y en la zona perinuclear y siendo significativa la presencia de mitocondrias de menores volúmenes en las neuritas (Li, Okamoto et al. 2004, Sanmartin, Paula-Lima et al. 2014).

Para poder responder a las demandas energéticas, las mitocondrias alteran su forma y tamaño en un proceso conocido como dinámica mitocondrial, en que

las mitocondrias sufren eventos de migración, división y fusión. En células saludables, la forma de las mitocondrias y su estructura se mantiene a través del balance de estos distintos eventos (Detmer and Chan 2007, Knott, Perkins et al. 2008). Bajo condiciones fisiológicas, la estructura de las mitocondrias sufre constantes cambios altamente dependientes de estímulos externos, como diferentes tipos de estrés (Kuznetsov, Hermann et al. 2009).

Se ha reportado que distintos factores inductores de estrés oxidativo y algunos agentes neurotóxicos aumentan la fisión mitocondrial *in vitro* (Rintoul, Filiano et al. 2003, Pletjushkina, Lyamzaev et al. 2006, Han, Lu et al. 2008) como también la traslocación de la proteína de fisión Drp-1 a la mitocondria (Rintoul, Filiano et al. 2003, Pletjushkina, Lyamzaev et al. 2006, Han, Lu et al. 2008, Sanmartin, Paula-Lima et al. 2014). Además, en neuronas granulares de cerebelo tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ha demostrado fisión mitocondrial como evento previo a la apoptosis (Jahani-Asl, Cheung et al. 2007). En neuronas corticales, se aumentó el número de mitocondrias, se redujeron su tamaño y disminuyeron los niveles de ATP celular al estimular con especies reactivas del nitrógeno (Barsoum, Yuan et al. 2006, Yuan, Gerencser et al. 2007).

Datos previos de nuestro laboratorio demostraron que la activación de RyRpor 4-CMC, un agonista de estos receptores, promueven fragmentación de la red mitocondrial y que esto puede ser prevenido por la preincubación de las neuronas con el antioxidante NAC (Sanmartin, Adasme et al. 2012). En una publicación reciente, demostramos que la generación de ROS estimulada por la adición de hierro a las neuronas, también produce fragmentación mitocondrial neuronal (Sanmartin, Paula-Lima et al. 2014). Estos antecedentes indican que la fragmentación mitocondrial requiere un aumento en la generación de ROS y señales de Ca<sup>2+</sup>-dependientes de la activación de RyR (Jahani-Asl, Cheung et al. 2007, Yu, Jhun et al. 2011).

La sobreexpresión de la proteína precursora amiloide (APP) en una línea celular de neuroblastoma induce la fragmentación mitocondrial, probablemente debido al aumento de la producción del péptido A $\beta$  secretado al medio de cultivo

(Wang, Su et al. 2008). Al investigar el efecto de la adición de 0,8  $\mu\text{M}$  A $\beta$ Os por 24 horas en cultivos de neuronas hipocampales, los autores observaron que estos inducen la pérdida de espinas dendríticas y fisión mitocondrial (Wang, Su et al. 2009), lo que fue corroborado por trabajos posteriores de nuestro laboratorio (Paula-Lima et al, 2011, San Martin et al., 2012). En cultivos primarios de hipocampo de rata incubados con 0,5  $\mu\text{M}$  de A $\beta$ Os por 24 horas se observó la fragmentación de la red mitocondrial y el aumento del contenido de la proteína de fisión Drp-1, en fracciones subcelulares enriquecidas en mitocondrias. Esto sugiere que los cambios morfológicos observados se correlacionan con la maquinaria molecular de la fisión mitocondrial. Además, se demostró que estos efectos son dependientes de la activación del RyR y de la presencia de ROS, ya que fueron prevenidos por Rya en concentraciones inhibitorias y por NAC, respectivamente.(Paula-Lima, Adasme et al. 2011, Sanmartin, Adasme et al. 2012).

En la Fig. 1 determinamos el número de neuronas con morfología mitocondrial puntiforme en diferentes campos ópticos a diferentes condiciones. Los resultados mostrados corroboran que tratamientos prolongados (24 horas) con A $\beta$ Os 0,5  $\mu\text{M}$  inducen fragmentación de la red mitocondrial en las neuronas. La incubación previa de las neuronas con EUK-134 redujo el número de neuronas exhibiendo mitocondrias fragmentadas, corroborando los hallazgos previos de nuestro laboratorio que muestran que en neuronas preincubadas con 10 mM NAC por 30 minutos no se observa la fragmentación mitocondrial inducida por A $\beta$ Os (Sanmartin, Adasme et al. 2012). Estos resultados indican que la fragmentación mitocondrial inducida por A $\beta$ Os es dependiente ROS.

## **6.2. Los A $\beta$ Os inducen un aumento en los niveles de ROS mitocondriales**

Ma y cols. mostraron que neuronas tratadas con 0,5  $\mu\text{M}$  de A $\beta$ Os durante 1 hora exhiben un aumento significativo de la generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .(Ma, Hoeffler et al. 2011), lo que fue medido en tiempo fijo (1 hora luego de la adición del estímulo). A diferencia de nosotros, estos autores no estudiaron la cinética de este proceso. En neuroblastomas, se sugirió que el péptido A $\beta$  ingresaría a la célula a partir de la

hora de incubación por mecanismos no del todo descritos (Jiao, Zhang et al. 2012) y en mitocondrias aisladas, fibrillas de A $\beta$  se unirían a los complejos I y III, desacoplando la cadena transportadora de electrones e induciendo una mayor producción de especies O $_2^{\cdot-}$  (Bobba, Amadoro et al. 2013).

Sin embargo, nuestros resultados indican que el estímulo de las neuronas con 0,5  $\mu$ M A $\beta$ Os, promueve una elevación de los niveles de O $_2^{\cdot-}$  y H $_2$ O $_2$  15 segundos después de agregado el estímulo en el caso de O $_2^{\cdot-}$ , y 50 segundos después en el caso de H $_2$ O $_2$ . El alza de concentración de estas dos especies en la mitocondria se mantuvo constante a lo largo del tiempo, alcanzando diferencias significativas comparadas a las condiciones control. No obstante, la preincubación de las neuronas con los antioxidantes NAC o EUK-134 inhibió significativamente el aumento de los niveles tanto de H $_2$ O $_2$  como de O $_2^{\cdot-}$  inducido por los A $\beta$ Os. Por primera vez, los resultados presentados en esta tesis sugieren que los A $\beta$ Os inducen un aumento de H $_2$ O $_2$  como de O $_2^{\cdot-}$  en la mitocondria segundos después de estimular a las neuronas, siendo prevenidos si se incubaba previamente a los cultivos con los antioxidantes NAC o con EUK-134.

### **6.3. Los aumentos de ROS mitocondriales generados por A $\beta$ Os se deben a la liberación de Ca $^{2+}$ mediada por RyR**

Otro de los efectos deletéreos de los A $\beta$ Os que toma parte en los mecanismos de disfunción neuronal es la generación de señales prolongadas de Ca $^{2+}$  (Camandola and Mattson 2011), la que está mediada por la activación aberrante de los NMDAR (Li, Hong et al. 2009, Decker, Jurgensen et al. 2010, Decker, Lo et al. 2010) y subsecuente activación por liberación de Ca $^{2+}$  mediada por Ca $^{2+}$  dependiente de RyR (Paula-Lima, Adasme et al. 2011).

Se ha propuesto que el aumento en los niveles intracelulares de Ca $^{2+}$  promueve la producción de ROS mitocondriales por medio de la estimulación del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (Das and Harris 1990, McCormack and Denton 1993, Mildaziene, Baniene et al. 1995, Hansford and Zorov 1998, Balaban 2002, Yan, Wei et al. 2006). Se ha reportado que tanto antagonistas de los NMDAR como el quelante de Ca $^{2+}$  BAPTA-AM son capaces de bloquear los

aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  como también la producción de ROS inducida por A $\beta$ Os (De Felice, Velasco et al. 2007). Sumado a lo anterior, resultados de nuestro laboratorio señalan que en neuronas de hipocampo controles, la activación de RyR por su agonista 4-CMC induce fragmentación mitocondrial (Paula-Lima, Adasme et al. 2011) y un rápido aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria (Sanmartin, Paula-Lima et al. 2014).

Los A $\beta$ Os inducen un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria (datos no mostrados) como también la fragmentación de la red mitocondrial mediada por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde RyR (Paula-Lima, Adasme et al. 2011, Sanmartin, Adasme et al. 2012). Dado que el tratamiento previo con el agente antioxidante NAC en las neuronas hipocámpales *in vitro* es capaz de prevenir tanto la fragmentación mitocondrial inducida por 4-CMC (Paula-Lima, Adasme et al. 2011), como el aumento de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria causado por los A $\beta$ Os (datos no mostrados), cabe suponer que NAC se encuentra actuando a nivel de RyR. NAC reduciría el canal RyR manteniéndolo cerrado, lo que impediría la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE a la mitocondria, y con ello el aumento de producción de ROS en la mitocondria. Además, el NAC es precursor de glutatión, que tiene una importante función en la degradación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en forma paralela al sistema antioxidante celular de la catalasa. El efecto protector de EUK-134, por otro lado, podría ser interpretado por su función de atrapador de ROS y mimético de la catalasa, que al causar una disminución de los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en las neuronas, podría conllevar a un estado de oxidación de RyR más reducido, lo que se asocia a la imposibilidad de activarse por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Para comprobar lo anterior, se midieron los niveles relativos de ROS en las neuronas preincubadas con el inhibidor de RyR, Rya, a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  por 1 hora, antes y después de estimular bajo microscopio con 0,5  $\mu\text{M}$  de A $\beta$ Os, observándose una inhibición en el aumento en la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Estos datos sugieren que los A $\beta$ Os inducen un aumento de la generación de ROS mitocondrial, la cual sería dependiente de la actividad de RyR y que podría

ser debida a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria, estimulando el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

#### **6.4. $\text{Ca}^{2+}$ y ROS median las alteraciones en la expresión de RyR inducidas por A $\beta$ Os**

Protocolos de entrenamiento de memoria espacial en ratas inducen un aumento en la expresión de RyR2 en hipocampo (Zhao, Meiri et al. 2000). Más aún, el *knock-down* selectivo de RyR2 o RyR3 a través de oligonucleótidos antisentido, afecta negativamente los procesos de memoria espacial (Balschun, Wolfer et al. 1999, Galeotti, Quattrone et al. 2008). Asimismo, la disminución de la expresión de RyR2 podría menoscabar la formación de memoria dependiente de hipocampo (para una revisión sobre el tema ver Paula-Lima et al., 2014).

Las células despliegan varios mecanismos moleculares que transforman las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático en cambios específicos controlados en la expresión génica (Mellstrom, Savignac et al. 2008). Estas señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluyendo las generadas por la liberación desde RE (Bardo, Cavazzini et al. 2006), activan cascadas de señalización que juegan un papel en la plasticidad sináptica y la formación de la memoria (Greer and Greenberg 2008). Sin embargo, incrementos prolongados en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, como los producidos por A $\beta$ Os, están relacionados con efectos dañinos en las neuronas (Gleichmann, Chow et al. 2011, Zundorf and Reiser 2011). Aun así, todavía no está del todo claro como las neuronas de hipocampo decodifican estas señales y menos aún en lo que respecta a la expresión del RyR.

Análisis *in silico* realizados en nuestro laboratorio, revelaron que la secuencia del gen para RyR2 contiene elementos de respuesta a CREB y NFAT, ambos factores transcripcionales son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , son activados por vías de señalización cascada debajo de NMDAR (Yamin 2009). En neuronas hipocampales estimuladas con A $\beta$ Os, estas vías son afectadas (Vitolo, Sant'Angelo et al. 2002, Knobloch, Farinelli et al. 2007, De Felice, Vieira et al. 2009, Gu, Liu et al. 2009, Wu, Hudry et al. 2010). Todo lo anterior indica que las

señales  $\text{Ca}^{2+}$  gatilladas por A $\beta$ Os y mediadas por RyR, generan cambios en la expresión de diversas proteínas, entre ellas, RyR2.

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que concentraciones subletales de A $\beta$ Os inducen la disminución de los niveles de RyR2 tanto a nivel de proteínas, como de sus niveles transcripcionales después de 6 horas de incubación. Al restringir el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los NMDAR con MK-801, o la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma por medio de la inhibición de RyR con Rya, se protege de manera parcial contra la disminución de RyR2 inducida por A $\beta$ Os (Paula-Lima, Adasme et al. 2011). Estos datos apoyan la idea de que las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por RyR podrían estar involucradas en la regulación de la expresión de la isoforma RyR2.

Tal como ya fue mencionado, la preincubación con el antioxidante NAC previno completamente la generación de señales  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por A $\beta$ Os (Paula-Lima, Adasme et al. 2011), lo que corrobora otros datos previos del laboratorio mostrando que agentes reductores inhiben la activación de RyR por  $\text{Ca}^{2+}$  en bicapas (Hidalgo and Donoso 2008). Por todo lo anterior, verificamos si la reducción de los niveles de RyR2 inducida por los A $\beta$ Os se previno por la incubación previa de las neuronas con el antioxidante NAC.

Los resultados presentados en esta tesis respaldan la idea de que la disminución de los niveles de mRNA de RyR2 ante la incubación de A $\beta$ Os por 6 horas puede prevenirse por el uso de agentes antioxidantes como NAC (Fig. 5). Lo anterior permite proponer a NAC como candidato para la regulación de diferentes factores transcripcionales activados por diferentes vías de señalización dependientes de ROS y  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales juegan un papel en plasticidad sináptica y memoria y son alterados por los A $\beta$ Os (Saura and Valero 2011).

## 7. CONCLUSIÓN

Nuestros datos permiten concluir que:

1) El antioxidante EUK-134 previene la fragmentación de la red mitocondrial neuronal inducida por los A $\beta$ Os. Estos resultados corroboran los datos previos del laboratorio que demostraron que el NAC previene la fragmentación de la red mitocondrial inducida por los A $\beta$ Os. En conjunto los resultados muestran que ésta fragmentación depende de ROS.

2) Los antioxidantes NAC y EUK-134 previenen la generación de O $_2^{\cdot-}$  y de H $_2$ O $_2$  mitocondrial inducida por los A $\beta$ Os. Estos datos podrían indicar una posible participación del O $_2^{\cdot-}$  y del H $_2$ O $_2$  generado en la mitocondria en respuesta a los A $\beta$ Os, sobre la fragmentación de la red mitocondrial observada a tiempos más largos de incubación de las neuronas con el péptido.

3) Los aumentos de los niveles de O $_2^{\cdot-}$  y H $_2$ O $_2$  mitocondriales inducidos por los A $\beta$ Os requieren de las señales de Ca $^{2+}$  mediadas por los RyR. Esta conclusión se desprende de los resultados obtenidos en presencia del inhibidor farmacológico de los RyR, que muestran un bloqueo total de los aumentos en los niveles de O $_2^{\cdot-}$  y H $_2$ O $_2$  mitocondriales inducidos por los A $\beta$ Os.

4) El antioxidante NAC previene la disminución de los niveles de mRNA de RyR2 inducida por los A $\beta$ Os. Esto podría estar relacionado al efecto del NAC sobre el estado de oxidación de RyR, ya que al reducirlo disminuiría su actividad y, por lo tanto, la liberación de Ca $^{2+}$  que se supone regula los mecanismos de expresión de la isoforma RyR2.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que los antioxidantes NAC y EUK-134 previenen la generación de ROS en la mitocondria, la fragmentación de la red mitocondrial y la disminución de los niveles transcripcionales de RyR2 inducidos por los A $\beta$ Os, efectos deletéreos que requieren la liberación de Ca $^{2+}$  mediada por RyR.

## 8. PROYECCIONES

El desarrollo de esta tesis permitió dejar planteadas algunas preguntas de gran relevancia que deberán ser abordadas en trabajos posteriores. Resulta interesante investigar: 1) Si los aumentos de ROS mitocondrial inducidos por A $\beta$ Os efectivamente se traducen en un aumento de la oxidación de RyR y si los antioxidantes NAC o EUK-134 prevendrían esta modificación redox. 2) Si los antioxidantes NAC o EUK-134 inhiben la translocación de Drp-1 a la mitocondria inducida por los A $\beta$ Os 3) Si la actividad, consumo de oxígeno y el potencial mitocondrial son afectados tras la estimulación de las neuronas con los A $\beta$ Os y si los antioxidantes previenen estos posibles efectos. 4) Si la disminución de los niveles transcripcionales de RyR2 inducida por los A $\beta$ Os se previene por la preincubación con EUK-134. 5) Si la disminución de los niveles de proteína RyR2 inducida por los A $\beta$ Os se previene por la preincubación con NAC o EUK-134.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abramov, A. Y., et al. (2004). "Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture." Biochim Biophys Acta **1742**(1-3): 81-87.
- Adasme, T., et al. (2011). "Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(7): 3029-3034.
- Alonso, M. T., et al. (2006). "Calcium microdomains in mitochondria and nucleus." Cell Calcium **40**(5-6): 513-525.
- Association, A. s. (2014). "2014 Alzheimer's Disease Facts and Figures." Alzheimer's & Dementia **10**(2).
- Balaban, R. S. (2002). "Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium." J Mol Cell Cardiol **34**(10): 1259-1271.
- Balschun, D., et al. (1999). "Deletion of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) impairs forms of synaptic plasticity and spatial learning." EMBO J **18**(19): 5264-5273.
- Bardo, S., et al. (2006). "The role of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store in the plasticity of central neurons." Trends Pharmacol Sci **27**(2): 78-84.
- Barsoum, M. J., et al. (2006). "Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons." EMBO J **25**(16): 3900-3911.
- Behl, C., et al. (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." Cell **77**(6): 817-827.
- Berridge, M. J. (2010). "Calcium hypothesis of Alzheimer's disease." Pflugers Arch **459**(3): 441-449.
- Bobba, A., et al. (2013). "Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by beta-amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively." Mitochondrion **13**(4): 298-311.
- Brito-Moreira, J., et al. (2011). "Aβ oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons." Curr Alzheimer Res **8**(5): 552-562.
- Bull, R., et al. (2007). "Effects of ATP, Mg<sup>2+</sup>, and redox agents on the Ca<sup>2+</sup> dependence of RyR channels from rat brain cortex." Am J Physiol Cell Physiol **293**(1): C162-171.
- Bull, R., et al. (1989). "Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum from frog muscle by nanomolar concentrations of ryanodine." Biophys J **56**(4): 749-756.
- Camandola, S. and M. P. Mattson (2011). "Aberrant subcellular neuronal calcium regulation in aging and Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1813**(5): 965-973.
- Carrasco, M. A. and C. Hidalgo (2006). "Calcium microdomains and gene expression in neurons and skeletal muscle cells." Cell Calcium **40**(5-6): 575-583.
- Clausen, A., et al. (2012). "Effects of the superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-207 in a mouse model of Alzheimer's disease: protection against and interruption of progression of amyloid and tau pathology and cognitive decline." J Alzheimers Dis **30**(1): 183-208.
- Crews, L. and E. Masliah (2010). "Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease." Hum Mol Genet **19**(R1): R12-20.
- Csordas, G., et al. (2010). "Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface." Mol Cell **39**(1): 121-132.
- Das, A. M. and D. A. Harris (1990). "Control of mitochondrial ATP synthase in heart cells: inactive to active transitions caused by beating or positive inotropic agents." Cardiovasc Res **24**(5): 411-417.
- De Felice, F. G., et al. (2007). "Aβ 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**(15): 11590-11601.

De Felice, F. G., et al. (2009). "Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Aβ oligomers." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1971-1976.

Decker, H., et al. (2010). "N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid-beta peptide oligomers." J Neurochem **115**(6): 1520-1529.

Decker, H., et al. (2010). "Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3β in primary cultured hippocampal neurons." J Neurosci **30**(27): 9166-9171.

Detmer, S. A. and D. C. Chan (2007). "Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(11): 870-879.

Doctrow, S. R., et al. (2012). "Salen Mn Complexes are Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics that Protect the Mitochondria." Current Inorganic chemistry **2**(3): 325-334.

Ferreira, S. T. and W. L. Klein (2011). "The Aβ oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease." Neurobiol Learn Mem **96**(4): 529-543.

Ferreiro, E., et al. (2008). "The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway." Neurobiol Dis **30**(3): 331-342.

Galeotti, N., et al. (2008). "Different involvement of type 1, 2, and 3 ryanodine receptors in memory processes." Learn Mem **15**(5): 315-323.

Giannini, G., et al. (1995). "The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues." J Cell Biol **128**(5): 893-904.

Gleichmann, M., et al. (2011). "Homeostatic disinhibition in the aging brain and Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **24**(1): 15-24.

Gleichmann, M. and M. P. Mattson (2011). "Neuronal calcium homeostasis and dysregulation." Antioxid Redox Signal **14**(7): 1261-1273.

Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-890.

Golden, T. R. and M. Patel (2009). "Catalytic antioxidants and neurodegeneration." Antioxid Redox Signal **11**(3): 555-570.

Goussakov, I., et al. (2010). "NMDA-mediated Ca<sup>2+</sup> influx drives aberrant ryanodine receptor activation in dendrites of young Alzheimer's disease mice." J Neurosci **30**(36): 12128-12137.

Greer, P. L. and M. E. Greenberg (2008). "From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function." Neuron **59**(6): 846-860.

Gu, Z., et al. (2009). "β-Amyloid impairs AMPA receptor trafficking and function by reducing Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II synaptic distribution." J Biol Chem **284**(16): 10639-10649.

Haass, C. and D. J. Selkoe (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 101-112.

Han, X. J., et al. (2008). "CaM kinase I α-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology." J Cell Biol **182**(3): 573-585.

Hansford, R. G. and D. Zorov (1998). "Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation." Mol Cell Biochem **184**(1-2): 359-369.

Hensley, K., et al. (1994). "A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3270-3274.

- Hidalgo, C. and P. Donoso (2008). "Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications." Antioxid Redox Signal **10**(7): 1275-1312.
- Hirai, K., et al. (2001). "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease." J Neurosci **21**(9): 3017-3023.
- Huang, Q., et al. (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**(12): 2618-2629.
- Jahani-Asl, A., et al. (2007). "Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death." J Biol Chem **282**(33): 23788-23798.
- Jiao, Y., et al. (2012). "Direct observation of internalization and ROS generation of amyloid beta-peptide in neuronal cells at subcellular resolution." Chembiochem **13**(16): 2335-2338.
- Kelliher, M., et al. (1999). "Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and beta-amyloid pathologies." Neuroscience **92**(2): 499-513.
- Kishida, K. T. and E. Klann (2007). "Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory." Antioxid Redox Signal **9**(2): 233-244.
- Knapp, L. T. and E. Klann (2000). "Superoxide-induced stimulation of protein kinase C via thiol modification and modulation of zinc content." J Biol Chem **275**(31): 24136-24145.
- Knobloch, M., et al. (2007). "Abeta oligomer-mediated long-term potentiation impairment involves protein phosphatase 1-dependent mechanisms." J Neurosci **27**(29): 7648-7653.
- Knott, A. B., et al. (2008). "Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration." Nat Rev Neurosci **9**(7): 505-518.
- Kuznetsov, A. V., et al. (2009). "The cell-type specificity of mitochondrial dynamics." Int J Biochem Cell Biol **41**(10): 1928-1939.
- Lacor, P. N., et al. (2007). "Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease." J Neurosci **27**(4): 796-807.
- Lambert, M. P., et al. (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6448-6453.
- Laver, D. R. (2007). "Ca<sup>2+</sup> stores regulate ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels via luminal and cytosolic Ca<sup>2+</sup> sites." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(9): 889-896.
- Li, A., et al. (1998). "Oxidation regulates cloned neuronal voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels expressed in Xenopus oocytes." J Neurosci **18**(17): 6740-6747.
- Li, S., et al. (2009). "Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake." Neuron **62**(6): 788-801.
- Li, Z., et al. (2004). "The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses." Cell **119**(6): 873-887.
- Ma, T., et al. (2011). "Amyloid beta-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity are rescued by decreasing mitochondrial superoxide." J Neurosci **31**(15): 5589-5595.
- Marengo, J. J., et al. (1998). "Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels of excitable cells." Biophys J **74**(3): 1263-1277.
- Mari, M., et al. (2009). "Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant." Antioxid Redox Signal **11**(11): 2685-2700.
- Mattson, M. P., et al. (2008). "Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders." Neuron **60**(5): 748-766.

Mattson, M. P. and Y. Goodman (1995). "Different amyloidogenic peptides share a similar mechanism of neurotoxicity involving reactive oxygen species and calcium." Brain Res **676**(1): 219-224.

Mazzetti, A. P., et al. (2015). "Glutathione transferases and neurodegenerative diseases." Neurochem Int **82**: 10-18.

McCormack, J. G. and R. M. Denton (1993). "Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and the role of intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of energy metabolism." Dev Neurosci **15**(3-5): 165-173.

Mellstrom, B., et al. (2008). "Ca<sup>2+</sup>-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models." Physiol Rev **88**(2): 421-449.

Mildaziene, V., et al. (1995). "Calcium indirectly increases the control exerted by the adenine nucleotide translocator over 2-oxoglutarate oxidation in rat heart mitochondria." Arch Biochem Biophys **324**(1): 130-134.

Mohammadi, M. and R. Yazdanparast (2010). "Modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitogen-activated protein kinases activation and cell death in SK-N-MC cells by EUK134, a salen derivative." Basic Clin Pharmacol Toxicol **108**(6): 378-384.

Moreira, P. I., et al. (2007). "Increased autophagic degradation of mitochondria in Alzheimer disease." Autophagy **3**(6): 614-615.

Osteryoung, K. W. and J. Nunnari (2003). "The division of endosymbiotic organelles." Science **302**(5651): 1698-1704.

Parodi, J., et al. (2010). "Beta-amyloid causes depletion of synaptic vesicles leading to neurotransmission failure." J Biol Chem **285**(4): 2506-2514.

Paula-Lima, A. C., et al. (2014). "Contribution of Ca<sup>2+</sup> release channels to hippocampal synaptic plasticity and spatial memory: potential redox modulation." Antioxid Redox Signal **21**(6): 892-914.

Paula-Lima, A. C., et al. (2011). "Amyloid beta-peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca<sup>2+</sup> release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF." Antioxid Redox Signal **14**(7): 1209-1223.

Peng, T. I. and M. J. Jou (2010). "Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload." Ann N Y Acad Sci **1201**: 183-188.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

Pletjushkina, O. Y., et al. (2006). "Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 518-524.

Resende, R., et al. (2008). "Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death." Neuroscience **155**(3): 725-737.

Rintoul, G. L., et al. (2003). "Glutamate decreases mitochondrial size and movement in primary forebrain neurons." J Neurosci **23**(21): 7881-7888.

Riquelme, D., et al. (2011). "High-frequency field stimulation of primary neurons enhances ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release and generates hydrogen peroxide, which jointly stimulate NF-kappaB activity." Antioxid Redox Signal **14**(7): 1245-1259.

Sanmartin, C. D., et al. (2012). "The antioxidant N-acetylcysteine prevents the mitochondrial fragmentation induced by soluble amyloid-beta peptide oligomers." Neurodegener Dis **10**(1-4): 34-37.

Sanmartin, C. D., et al. (2014). "Ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release underlies iron-induced mitochondrial fission and stimulates mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in primary hippocampal neurons." Front Mol Neurosci **7**: 13.

Saura, C. A. and J. Valero (2011). "The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders." Rev Neurosci **22**(2): 153-169.

- Selkoe, D. J. (2008). "Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior." Behav Brain Res **192**(1): 106-113.
- Shankar, G. M., et al. (2008). "Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." Nat Med **14**(8): 837-842.
- Stutzmann, G. E., et al. (2006). "Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca<sup>2+</sup> disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice." J Neurosci **26**(19): 5180-5189.
- Supnet, C. and I. Bezprozvanny (2010). "The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease." Cell Calcium **47**(2): 183-189.
- Supnet, C., et al. (2006). "Amyloid-beta-(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function in neurons of TgCRND8 mice." J Biol Chem **281**(50): 38440-38447.
- Vitolo, O. V., et al. (2002). "Amyloid beta -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13217-13221.
- Wang, X., et al. (2009). "Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease." J Neurosci **29**(28): 9090-9103.
- Wang, X., et al. (2008). "Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(49): 19318-19323.
- Westermann, B. (2010). "Mitochondrial dynamics in model organisms: what yeasts, worms and flies have taught us about fusion and fission of mitochondria." Semin Cell Dev Biol **21**(6): 542-549.
- Wu, H. Y., et al. (2010). "Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation." J Neurosci **30**(7): 2636-2649.
- Yamin, G. (2009). "NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus." J Neurosci Res **87**(8): 1729-1736.
- Yan, Y., et al. (2006). "Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling." Acta Pharmacol Sin **27**(7): 821-826.
- Yu, T., et al. (2011). "High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission." Antioxid Redox Signal **14**(3): 425-437.
- Yuan, H., et al. (2007). "Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons." Cell Death Differ **14**(3): 462-471.
- Zhao, W., et al. (2000). "Spatial learning induced changes in expression of the ryanodine type II receptor in the rat hippocampus." FASEB J **14**(2): 290-300.
- Zundorf, G. and G. Reiser (2011). "Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection." Antioxid Redox Signal **14**(7): 1275-1288.