

**STAT3 neuronal como mediador de la toxicidad
de los astrocitos estimulados con oligómeros del
péptido β -amiloide**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ciencias Mención Biología Molecular, Celular y
Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Yorka Alejandra Muñoz Muñoz

Noviembre, 2018

**Director de Tesis Dr: Marco Tulio Nuñez
Co-tutora de tesis: Dra. Andrea Paula-Lima**



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

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

Yorka Alejandra Muñoz Muñoz

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología molecular, celular y neurociencias en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 25 de Julio del 2018

Directores de tesis:

Dr. Marco Tulio Nuñez (Tutor)

Dra. Andrea Paula-Lima (Co-tutora)

Comisión evaluadora

Dr. Christian González (Presidente)

Dra. María Rosa Bono

Dr. Nibaldo Inestroza

Dr. Felipe Court

Correo electrónico de contacto: mnunez@uchile.cl (Director de tesis),
acpaulalima@u.uchile.cl (co-tutora), yorka.munoz@ug.uchile.cl

*“La vida es como andar en bicicleta.
Para mantener el equilibrio, debe mantenerse
en movimiento...”*

Dedico esta tesis a mi familia y amigos...

Biografía



Mi historia comienza un 2 de diciembre de 1986 en Santiago, mi ciudad natal. A pesar de ser hija única siempre fui muy tranquila y con claras habilidades en las artes plásticas, las que se intensificaron a medida que fui creciendo y llegué a la adolescencia.

Definitivamente, el traslado al liceo de niñas N°7 de Providencia para iniciar la enseñanza media cambió mi vida. Conocí mucha gente interesante y ocupé prácticamente todo mi tiempo libre en practicar basquetball, aprender francés y en el desarrollo de diferentes técnicas de arte. Agradezco enormemente a la profesora Nelly Parra quien vio potencial en mí y cambió mi pensamiento, desde la física a una pasión por la biología. Cada vez surgieron más dudas acerca

del funcionamiento del cerebro y cómo esto se correlacionaba con su complejidad. Ahí supe que quería saber más sobre neurobiología y decidí estudiar Licenciatura en ciencias mención en Biología en la Universidad de Chile (2005), porque ahí estaba incluido el ramo de Neurobiología en la malla curricular.

Durante la Lic. en Biología, descubrí varias áreas de la biología que me fascinaron. Estudié cefalópodos en el museo de historia natural (Dr. Sergio Letelier), desarrollo temprano de un embrión (con el Juan Fernández), memoria y aprendizaje (Magdalena Sanhueza), glías (Alejandro Roth) y finalmente fototransducción (Juan Bacigalupo). En esta última área realicé mi tesis de magíster con el Dr. Juan Bacigalupo, quien en el tiempo se ha transformado en un gran amigo, a quien tengo mucha estima. En el doctorado me cambié al área de neurodegeneración, específicamente Alzheimer, y después de 5 años puedo decir que sigo entusiasmada en el área.

A pesar de los años, seguí inquieta. Durante el doctorado cumplí dos sueños, aprendí alemán y viajé al extranjero, conocí lugares hermosos y culturas maravillosas.

Estoy convencida que no se puede hacer ciencia si no eres curioso y perseverante. Debes aprender a levantarte rápido, independiente de lo fuerte que sea tu caída.

Agradecimientos

“...La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado...”

Marie Curie

Esta tesis fue producto de un largo camino lleno de dificultades y tropiezos, por lo cual está llena de aprendizaje. No soy una persona sentimental así que mis agradecimientos pueden ser escuetos pero son sinceros.

Quiero partir agradeciendo a mi tutor, el Dr. Marco Tulio Nuñez, por recibirme en el laboratorio, por ser un buen guía, por su constante apoyo y por creer en mis capacidades. Agradezco sus palabras de apoyo como “vamos chica” y por darme la enorme libertad de hacer lo que quisiera. Agradezco su paciencia por apoyarme a cuanta beca paso por mis ojos y por sus cartas de recomendación.

A mi co-tutora, la Dra. Andrea Paula-Lima, por su enorme disposición en el desarrollo de esta tesis y por facilitarme el modelo de estudio de esta tesis.

Al Dr. Juan Bacigalupo quien pese a ser mi ex tutor estuvo presente durante todo el desarrollo de esta tesis, dándome siempre ánimos cuando lo necesitaba y por supuesto, excelentes cartas de recomendación que me permitieron viajar a varios cursos y congresos en el extranjero. Agradezco enormemente su constante preocupación y amistad incondicional.

Al comité de tesis, por todos los aportes realizados a lo largo de este doctorado que hicieron de ésta una mejor tesis: Dr. Christian González, Dra. María Rosa Bono, Dr. Nivaldo Inestroza y al Dr. Felipe Court. En especial a la Dra. Bono por su ayuda y preocupación en aspectos personales y de salud.

A mis compañeros que forman o formaron parte del laboratorio de Envejecimiento. A Vicky por su carisma, amistad y visión de la vida, a Pabla por su paciencia y su pensamiento crítico, a Carlos Carrasco por ser un partner, a Joaquín y Natalia por su buena onda y buenas vibras, y a Carlitos, quien siempre saluda cariñosamente y con una sonrisa. A mi amiga Lorena Saragoni por las largas conversaciones que tuvimos mientras sacaba las imágenes de microscopía y por sus sabios consejos.

A Pedro, Pablo y Bárbara por su ayuda en la preparación de los oligómeros del péptido β -amiloide. A Pepe y Jaime por su amistad y a Jami por su buena disposición siempre.

A mis amigos del alma, a Sofia Z y a Carlos Rubilar R quienes siempre me apoyaron en los buenos y malos momentos de la vida. A mis queridos amigos de alemán: Feña, Edgardo y Marcelo, con quienes compartí grandiosos momentos, una amistad incondicional. A mi querido amigo Willy quien siempre se acuerda de mi en la distante Nueva Zelanda. A mi querida amiga Rocio y su novio Isaac quienes siempre tienen una palabra de aliento desde el lejano México. A mi amiga Priscila por esas largas conversaciones y grandes carcajadas. A mi querida amiga Fabiola, quien siempre tuvo una palabra de apoyo mientras estuvo en Holanda y ahora en Chile. A mi amigo Kris B y al profe Ricardo Delgado por su apoyo y preocupación. A mi amiga Angie por su dulzura y buena onda. A Evelyn por su grata compañía durante los domingos. A mi amigo JC Pacheco quien me alegra cada vez que nos vemos con su positivismo y simplicidad.

A mis amigas del liceo, Valia, Vero, Cata y Dani, quienes a pesar del poco tiempo que disponen, siempre tienen tiempo para compartir las experiencias de la vida y su alegría.

A Angelo Canovas, por ser un buen compañero, amigo, pareja. Gracias por su enorme disposición, por siempre hacerse un tiempo para mí y por querer ayudarme siempre aunque sea en pequeños detalles. Gracias por creer en mi.

En especial quiero agradecerle a mi familia, a Olguita, mi abueli Lala y mi tía Gloria, quienes siempre me apoyaron y comprendieron a pesar de mis largas y extrañas jornadas de trabajo. Fueron un pilar fundamental durante todo este proceso, gracias por la paciencia, la buena voluntad y la alegría. Estoy consciente de todo el esfuerzo que hicieron para que pudiera estudiar y con ello tener un mejor estilo de vida. Gracias por el apoyo en las buenas y en las malas, por su ayuda en el cuidado de mi amado perro Dunkel y por sus deliciosas comidas.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis no podría haberse llevado a cabo sin las siguientes fuentes de financiamiento:

-Beca CONICYT doctorado nacional N°21130445 y extensión de beca doctoral.

-Proyecto Anillo ACT-1114 del Programa de investigación asociativa de CONICYT (PIA, adjudicado por el Dr. Marco Tulio Núñez)

-Proyecto FONDECYT 1150736 (adjudicado por la Dra. Andrea Paula-Lima)

-Proyecto FONDECYT 1130068 (adjudicado por el Dr. Marco Tulio Núñez)

-Becas CONICYT de asistencia a congresos N°81140457 (2014) y N°81150376 (2015)

También quiero agradecer a las siguientes instituciones internacionales que gracias a sus becas me permitieron asistir a diferentes cursos de neurociencia y a congresos internacionales de alto nivel:

-International Society for Neurochemistry (ISN) por el financiamiento completo para asistir al curso “3rd ISN Latin American School of Advanced Neurochemistry” (Montevideo, Uruguay, 2014) y la beca para asistir al congreso “26th ISN-ESN biennial meeting” en Paris, Francia (2017).

-International Brain Research Organization (IBRO) por el financiamiento completo para asistir al curso “IBRO-USCRC 10th Canadian School of Neuroscience” (Montreal, Canadá, 2016) y al congreso “10th Annual Canadian Neuroscience Meeting” en Toronto (2016) y por la beca para asistir al congreso “13th Conference Alzheimer and Parkinson Disease” en Viena, Austria (2017).

-Français Société des Neurosciences-IBRO quienes financiaron mi viaje a Bordeaux, Francia para asistir al congreso “NeuroFrance 2017” y buscar postdoc.

-Grass Foundation, IBRO LATP y USCRC y a Society for Neuroscience quienes financiaron mi beca completa para participar en el curso: “Latinoamerican Training program 2018” en Valparaíso, Chile y quienes financiarán mi participación en el congreso Society for Neuroscience 2019 en Chicago, EEUU.

Gracias a todas estas entidades que me permitieron experimentar extraordinarias experiencias en el Chile y el extranjero, con las cuales establecí importantes redes de contacto y así conocí al Dr. Keith Murai con quien realizaré mi postdoc en la Universidad McGill en Montreal, Canadá.

INDICE DE MATERIAS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1 La enfermedad de Alzheimer y el estrés oxidativo	1
1.1.2 Rol de los astrocitos en la función cerebral y en la neurodegeneración	4
1.1.2.1 Los astrocitos como un célula clave del sistema nervioso central	4
1.1.2.2 Astrocitos en la enfermedad de Alzheimer	8
1.1.3 El factor de transcripción STAT3	10
1.1.4 Rol del calcio, receptor de ryanodina (RyR) y calcineurina en la enfermedad de Alzheimer	13
1.1.5 Glutamato y excitotoxicidad en la enfermedad de Alzheimer	16
1.1.6 Apoptosis y STAT3	18
1.2. Hipótesis de trabajo	21
1.3 Objetivo general	21
1.4 Objetivos específicos	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Materiales	25
2.2 Cultivos primarios	26
2.3 Preparación y caracterización de los oligómeros del péptido β -amiloide ($A\beta$ Os)	28
2.4 Medio condicionado de astrocitos ($MCA^{+A\beta Os}$)	30
2.5 Inmunocitoquímica	30
2.6 Análisis de Western blot	31
2.7 Preparación de extractos nucleares y citoplasmáticos	33

2.8 qPCR en tiempo real	33
2.9 Tratamientos con catalasa, hemoglobina y peróxido de hidrógeno	35
2.10 Determinación del peróxido de hidrógeno en el MCA ^{+AβOs} con Amplex Red®	36
2.11 Tratamientos con antioxidantes, quelantes de calcio e inhibidores del receptor de ryanodina (RyR)	38
2.12 Citoquímica-Redox	39
2.13 Detección de la generación de peróxido de hidrógeno con Hyper-Cyto	40
2.14 Determinación de las señales de calcio intracelular	41
2.15 Detección de citoquinas	42
2.16 Viabilidad celular. Ensayo MTT	42
2.17 Transducción de los cultivos primarios usando los adenovirus CAIN y calcineurina constutivamente activa (CN)	43
2.17.1 Medición de la eficiencia de la transducción de los adenovirus (Ad-LacZ)	44
2.17.2 Verificación de la actividad de calcineurina: NFATc4 y RCAN1	44
2.18 Detección de caspasa-3 activada y ensayo de TUNEL	45
2.19 Análisis Estadístico	47
3. RESULTADOS	48
3.1 Modelo experimental	48
3.1.1 Caracterización de la preparación de oligómeros del péptido β-amiloide	49
3.2 La distribución nuclear/citoplasmática de pSer-STAT3, pero no de pTyr-STAT3, es afectada por los oligómeros del péptido β-amiloide	51
3.3 Astrocitos median la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por los AβOs	55
3.4 Cultivos neuronales pobres en astrocitos tratados con AβOs no modifican los niveles de pSer-STAT3, STAT3 ni los niveles del ARNm de STAT3	60

3.5 El tratamiento de cultivos neuronales pobres en astrocitos con medio condicionado de astrocitos (MCA ^{+AβOs}) indujo la depleción nuclear de pSer-STAT3	61
3.6 Identificación de los posibles mediadores liberados tras la estimulación con los AβOs	64
3.7 El MCA ^{+AβOs} aumenta el tono oxidativo neuronal	70
3.8 El mecanismo de depleción nuclear de pSer-STAT3 es dependiente de calcio, del receptor de ryanodina y parcialmente dependiente de la fosfatasa calcineurina	76
3.9 El MCA ^{+AβOs} potencia la apoptosis inducida por un estímulo excitotóxico	90
4. DISCUSIÓN	100
4.1 Concentraciones subletales de AβOs producen la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas	100
4.2 La interacción astrocito-neurona media la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por los AβOs	102
4.3 Los mediadores liberados en el MCA ^{+AβOs} producen aumentos del tono oxidativo neuronal	104
4.3.1. Los mediadores	104
4.3.2 El MCA ^{+AβOs} aumenta el tono oxidativo neuronal	109
4.4 Las señales de calcio neuronales mediadas por el RyR y la calcineurina median la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA ^{+AβOs}	113
4.5 El MCA ^{+AβOs} disminuye los ARNm de Bcl-2 y survivina y potencia la muerte apoptótica inducida por un estímulo excitotóxico	119
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES	124
6. ANEXO	127
6.1 Caracterización de los adenovirus (Ad)	127
7. BIBLIOGRAFIA	131

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracterización de los cultivos primarios de rata	48
Figura 2. Caracterización de la preparación de oligómeros del péptido β -amiloide ($A\beta$ Os)	50
Figura 3. Los $A\beta$ Os inducen una disminución de la marca nuclear de pSer-STAT3, pero no de pTyr-STAT3 o STAT3, en cultivos neuronales ricos en astrocitos.	53
Figura 4. Efectos de dosis-respuesta de los $A\beta$ Os en la marca nuclear de pSer-STAT3	54
Figure 5. La depleción nuclear de la pSer-STAT3 neuronal inducida por los $A\beta$ Os en los cultivos neuronales mixtos depende de los astrocitos	57
Figure 6. Los astrocitos de los cultivos neuronales se vuelven reactivos en presencia de los $A\beta$ Os	59
Figura 7. Los $A\beta$ Os no afectan la fosforilación de Serina 727, los niveles de la proteína o del ARNm de STAT3 en cultivos neuronales pobres en astrocitos	60
Figura 8. El tratamiento de cultivos ricos en astrocitos con $A\beta$ Os y cultivos pobres en astrocitos con $MCA^{+A\beta Os}$ induce defosforilación nuclear y citoplasmática de pSer-STAT3	63
Figura 9. El peróxido de hidrógeno producto de la estimulación con los $A\beta$ Os genera la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas	66
Figura 10. Los astrocitos estimulados con $A\beta$ Os aumentan significativamente la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF α pero sólo IL-6 presenta un aumento en su secreción en el $MCA^{+A\beta Os}$	68
Figura 11. El óxido nítrico inducido por los $A\beta$ Os produce una depleción parcial de pSer-STAT3 en las neuronas	69
Figura 12. El tratamiento con el $MCA^{+A\beta Os}$ aumenta significativamente el tono oxidativo en las neuronas y distintos agentes antioxidantes abolen este efecto	72
Figura 13. El $MCA^{+A\beta Os}$ produce un aumento del peróxido de hidrógeno en el soma y en las neuritas	74
Figura 14. Los antioxidantes EUK-134, MCI-186 y DMTU abolen parcialmente la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el $MCA^{+A\beta Os}$	75

- Figura 15.** El MCA^{+AβOs} induce señales de calcio mediadas por aumento del tono oxidativo. La quelación de calcio evita la depleción nuclear de pSer-STAT3 78
- Figura 16.** El receptor de ryanodina media el aumento de calcio inducido por el MCA^{+AβOs} 80
- Figura 17.** La inhibición de calcineurina abole o previene la depleción nuclear de pSer-STAT3. La expresión de una calcineurina constitutivamente activa causa una disminución de pSer-STAT3 nuclear 86
- Figura 18.** La fosforilación del residuo 727 de STAT3 no aumenta ni disminuye significativamente con la infección de los adenovirus Ad-CAIN y Ad-CN comparado con las muestras sin infectar. La sobreexpresión o inhibición de calcineurina no afecta significativamente los niveles de la proteína STAT3 89
- Figura 19.** El MCA^{+AβOs} promueve una disminución de la expresión de los genes blancos de supervivencia de STAT3, Bcl-2 y survivina, y aumenta la razón pro-apoptótica Bax/Bcl-2 en las neuronas. Sin embargo, la co-incubación del MCA^{+AβOs} con EUK-134 no recupera los niveles de expresión de esos genes 93
- Figura 20.** El MCA^{+AβOs} potencia el efecto de altas concentraciones de NMDA de promover la activación de caspasa-3 en las neuronas 97
- Figura 21.** El MCA^{+AβOs} potencia el efecto de altas concentraciones de NMDA al aumentar el número de núcleos apoptóticos 99
- Figura 22.** Determinación del índice de multiplicidad (MOI) y tiempo de transducción de los adenovirus 128
- Figura 23.** La expresión del péptido inhibitorio (CAIN) y una forma constitutivamente activa de calcineurina (CN) promueven cambios en los niveles de RCAN1 y afectan la translocación nuclear de NFATc4 en cultivos neuronales pobres en astrocitos 130

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad-CAIN	Adenovirus conteniendo la secuencia del péptido inhibitorio CAIN
Ad-CN	Adenovirus conteniendo la secuencia de calcineurina constitutivamente activa
Ad-LacZ	Adenovirus conteniendo la secuencia del gen de la β -galactosidasa
A β Os	Oligómeros del péptido β -amiloide
Acinus	Caspasa-3-activada requerida para la condensación de la cromatina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AraC	1- β -D arabinofuranosil citosina
Asp	Ácido aspártico
BAPTA-AM	Quelante de calcio
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Linfoma de células B
Bcl-xL	Linfoma de células B extra largo
BLS-D	Blessed-Dementia Scale
BSA	Albúmina de suero bovino
Cat	Catalasa
CFS	Líquido céfalorraquídeo
4-CMC	4-cloro-m-cresol, activador RyR.
Cph	Cultivo primario de neuronas hipocámpales de rata
CREB	Protein de unión al elemento de respuesta a AMPc
CPP32	Caspasa-3-activada
CSF	Líquido cerebroespinal
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DFF45/ICAD	Factor de fragmentación del ADN-45/DNasa activada por caspasa
DMTU	Dimetil-tio-urea
DNA-PK	Proteína quinasa nuclear dependiente de ADN
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
EA	Enfermedad de Alzheimer
EUK-134	Mimético de la SOD y la catalasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GSH	Glutatión
Hem	Hemoglobina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IL-1 β	Interleuquina 1 β
IL-6	Interleuquina 6
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP3R	Receptor de inositol 1,4,5 trifosfato
IRAK1	Quinasa 1 asociada al receptor de Interleuquina 1
LPS	Lipopolisacárido
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MCA ^{Control}	Medio condicionado de astrocitos sin A β Os
MCA ^{+AβOs}	Medio condicionado de astrocitos luego del tratamiento con A β Os
MCI-186	3-Metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona
MOI	Multiplicidad de infección

MTT	Ensayo de reducción del tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidio)
NFATc4	Factor nuclear de células T activadas citoplasmático 4
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
NMN	Medio neurobasal suplementado con B27
NOX	NADPH oxidasa
NuMA	Proteína del aparato nuclear mitótico
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
PKA	Proteína quinasa A
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa cuantitativa
RCAN1	Regulador de calcineurina 1
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rTdT	Enzima recombinante deoxinucleotidil terminal transferasa
Rb	Proteína del retinoblastoma
RyR	Receptor de ryanodina
SNC	Sistema nervioso central
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
S-H	Grupo tiol
SOD	Superóxido dismutasa
S-S	Enlace disulfuro
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butil-hidro-peróxido
Tempol	1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxipiperidina
TLR	Receptor de tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TRAF6	Factor relacionado al receptor de TNF 6
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
U1 snRNP	Partícula ribonucleoproteína nuclear pequeña U1

RESUMEN

El estrés oxidativo y la desregulación de la señalización de calcio son señales importantes en una variedad de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA). El factor de transcripción STAT3 tiene un rol crucial en el desarrollo y mantención del sistema nervioso. Recientemente, la pérdida de la actividad transcripcional de STAT3 ha sido ligada a la EA. En este trabajo, tratamos astrocitos primarios con los oligómeros del péptido β -amiloide ($A\beta$ Os), los cuales muestran una potente actividad sinaptotóxica, y estudiamos los efectos de los mediadores presentes en el medio condicionado de astrocitos tratados con $A\beta$ Os ($MCA^{+A\beta Os}$) en la depleción nuclear de STAT3 fosforilado en el residuo 727 (pSer-STAT3) en las neuronas. El tratamiento de los cultivos neuronales ricos en astrocitos con 0,5 μ M de $A\beta$ Os indujo en las neuronas una disminución significativa de pSer-STAT3, pero no de fosfotirosina 705-STAT3, la otra forma fosforilada de STAT3. Esta disminución no ocurrió en cultivos neuronales pobres en astrocitos revelando un rol fundamental de los astrocitos en esta respuesta. Para probar si los mediadores, liberados por los astrocitos en respuesta a los $A\beta$ Os, induce la depleción nuclear de pSer-STAT3, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron tratados con $MCA^{+A\beta Os}$, lo que causó depleción nuclear de pSer-STAT3 pero no modificó los niveles totales de STAT3. El uso de catalasa y hemoglobina extracelular previno la depleción nuclear de pSer-STAT3 causada por el $MCA^{+A\beta Os}$, indicando que posiblemente el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico son los mediadores liberados por los astrocitos involucrados en esta respuesta. Además, el $MCA^{+A\beta Os}$ indujo un aumento significativo de la expresión y la secreción de la citoquina pro-inflamatoria IL-6. El $MCA^{+A\beta Os}$

aumentó el tono oxidativo neuronal y generó en las neuronas señales de calcio mediadas por el receptor de ryanodina, que son esenciales para la depleción nuclear de pSer-STAT3. Usando adenovirus, se demostró que la inhibición de calcineurina abolió la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA^{+AβOs}. También se demostró que la activación de calcineurina produjo un leve aumento de la depleción nuclear y mayor defosforilación de pSer-STAT3 en las neuronas, revelando que si bien calcineurina participa en la depleción nuclear de pSer-STAT3, no es el único componente involucrado en el proceso. En suma, el MCA^{+AβOs} generó una disminución significativa de los niveles de ARNm de genes de sobrevivencia Bcl-2 y survivina y un aumento de la razón pro-apoptótica Bax/Bcl-2. No obstante, el MCA^{+AβOs} no promovió la apoptosis por si solo. El MCA^{+AβOs} sensibilizó a la neuronas hacia la muerte apoptótica pero solo en presencia de NMDA a concentraciones excitotóxicas. Esta es la primera descripción que el MCA^{+AβOs} promueve señales de calcio neuronales que regulan la distribución nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas. En esta tesis se propone que los AβOs inducen la producción de peróxido de hidrógeno, óxido nítrico e IL-6, lo cual aumenta el tono oxidativo neuronal, generando una señal de calcio que activa la fosfatasa calcineurina, la cual causa (en parte) la depleción nuclear de pSer-STAT3 y la pérdida de la actividad transcripcional protectora de STAT3.

ABSTRACT

Oxidative stress and dysregulation of calcium signaling are pivotal signs in a variety of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). The transcription factor STAT3 has a crucial role in the development and maintenance of the central nervous system. Recently, the loss of transcriptional activity of STAT3 has been linked to AD. In this work, we treated astrocytes with amyloid beta peptide oligomers (A β O), which display potent synaptotoxic activity, and studied the nature and effects of astrocyte-conditioned medium treated with A β O on the nuclear depletion of neuronal serine-727-phosphorylated STAT3 (pSer-STAT3). Treatment of mixed neuron-astrocyte cultures with 0.5 μ M A β O induced in neurons a significant decrease of nuclear pSer-STAT3, but not of phosphotyrosine-705 STAT3, the other form of STAT3 phosphorylation. This decrease did not occur in astrocyte-poor neuronal cultures revealing a pivotal role for astrocytes in this response. To test if mediators released by astrocytes in response to A β O induce pSer-STAT3 nuclear depletion, we used conditioned medium derived from A β O-treated astrocyte cultures (ACM^{+A β O}). Treatment of astrocyte-poor neuronal cultures with ACM^{+A β O} caused pSer-STAT3 nuclear depletion but did not modify overall STAT3 levels. Extracellular catalase and haemoglobin prevented the pSer-STAT3 nuclear depletion caused by A β O, indicating that reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide could mediate this response. Besides, ACM^{+A β O} produced an increase of production and secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-6. Also, ACM^{+A β O} increased the neuronal oxidative tone and calcium signals in neurons, leading to a ryanodine-sensitive intracellular calcium signal that proved to be essential for pSer-STAT3 nuclear depletion. Using adenoviruses we

showed that calcineurin inhibition abolished the nuclear depletion of pSer-STAT3 induced by ACM^{+A β Os} and that calcineurin activation produced just a mild increase of the nuclear depletion of pSer-STAT3 in neurons, revealing that calcineurin participate in nuclear depletion of pSer-STAT3, however, it is not the only component involved in the process. In addition, ACM^{+A β Os} generated decreased Bcl-2 and Survivin transcription and significantly increased Bax/Bcl-2 ratio but ACM^{+A β Os} did not execute apoptosis itself. ACM^{+A β Os} sensitized neurons to apoptotic death when it was incubated in presence of NMDA at an excitotoxic concentration. This is the first description that ACM^{+A β Os} and neuronal calcium signals jointly regulate pSer-STAT3 nuclear distribution in neurons. We propose that A β Os induce hydrogen peroxide, nitric oxide and IL-6 production, which by increasing the neuronal oxidative tone, generate a calcium signal that activates the phosphatase calcineurin, which cause (in part) pSer-STAT3 nuclear depletion and loss of STAT3 protective transcriptional activity.

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes bibliográficos

1.1.1 *La enfermedad de Alzheimer y el estrés oxidativo*

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más frecuente de demencia en los adultos mayores. Si bien existen casos de Alzheimer hereditario, esta enfermedad neurodegenerativa es principalmente idiopática (De-Paula et al., 2012; Han et al., 2016). En los casos de EA familiar se han identificado diversos genes que se encuentran mutados, los cuales han servido de base para el desarrollo de innumerables modelos transgénicos que han permitido entender mecanismos que podrían producir la enfermedad. Sin embargo, es relevante tener en consideración que ningún animal transgénico desarrolla todas las características claves de la enfermedad observada en humanos (Bilkei-Gorzo, 2014). Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de memoria y alteración de cognición, afectando en primera instancia la corteza cerebral, entorrinal y el hipocampo, y posteriormente esparsiéndose por la corteza cerebral frontal. Según la hipótesis de la cascada amiloide, la escisión de la proteína precursora amiloide (APP) por los complejos β - y γ -secretasa, genera la liberación del péptido β -amiloide ($A\beta$) en la región extracelular, generando agregados tóxicos del péptido $A\beta$ en estas regiones, lo que es considerado la causa primaria de la enfermedad (Selkoe and Hardy, 2016). Los agregados adquieren distintas conformaciones, las que incluyen los oligómeros de $A\beta$ ($A\beta$ Os), que son solubles y tóxicos y que pueden ser detectados en el líquido cefalorraquídeo, y los agregados fibrilares insolubles extracelulares, que son encontrados en las placas seniles. Estas

últimas son las lesiones que caracterizan histopatológicamente la enfermedad, junto a los ovillos neurofibrilares los cuales están constituidos por agregados intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada (Lashley et al., 2018). Estudios que argumentaban en contra de la hipótesis amiloide original encontraron que los patrones de pérdida de sinapsis, más que los depósitos amiloides, correlacionan con los déficits cognitivos en los pacientes con la EA (DeKosky and Scheff, 1990; Katzman et al., 1988; Terry et al., 1991). Estudios posteriores en ratones modelos de la EA o el uso de preparaciones oligoméricas del péptido $A\beta$ in vitro indicaron que la plasticidad sináptica de las sinapsis excitatorias estaba alterada (Hsia et al., 1999; Kamenetz et al., 2003; Larson et al., 1999). Estudios subsecuentes indicaron que el tratamiento de rebanadas de cerebro con $A\beta$ O_s o la inyección de $A\beta$ O_s en los cerebros de roedores, indujeron pérdida sináptica, bloqueo de la potenciación a largo plazo (LTP) y una función cognitiva alterada (Cleary et al., 2005; Ferreira et al., 2015; Lacor et al., 2007; Mucke et al., 2000; Palop et al., 2007; Palop and Mucke, 2010; Selkoe, 2002; Selkoe, 2008; Shankar et al., 2007; Venkitaramani et al., 2007; Walsh et al., 2002).

Actualmente, hay consenso que la acumulación de $A\beta$ gatilla un estado neuroinflamatorio que juega un rol significativo en la EA (Heneka et al., 2015; Jevtic et al., 2017). Normalmente, los niveles de $A\beta$ en el cerebro son regulados por la respuesta inmune innata. El $A\beta$ puede activar una respuesta inflamatoria que finalmente conduce a las microglías y astrocitos a fagocitarlo y eliminarlo del cerebro (Colton et al., 2006; Jekabsons et al., 2006; Morgan, 2006). Estudios genéticos han identificado polimorfismos de nucleótidos únicos en genes pro-inflamatorios que son asociados con el riesgo de la EA, enfatizando el involucramiento de la inflamación en la patogénesis de ésta (Jin et al., 2015; Malik et al., 2015). Además, los monocitos de

pacientes con EA producen mayores niveles de citoquinas inflamatorias en respuesta a A β . Además, poseen más inflamasomas activados que individuos de la misma edad (Saresella et al., 2016).

También está ampliamente demostrado que el estrés oxidativo producto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), contribuye a la etiología de la EA (Patten et al., 2010). El cerebro es extremadamente sensible al estrés oxidativo a pesar de la abundante presencia de moléculas antioxidantes en éste (Clarke and Sokoloff, 1999). Los ROS/RNS pueden actuar como moléculas señalizadoras o como inductores de estrés oxidativo, dependiendo de la concentración en la que se encuentren en el interior celular. El balance entre generación de ROS y los sistema de eliminación es clave para determinar su contenido intracelular, así el estrés oxidativo se genera cuando existe una excesiva producción de ROS y/o una deficiencia en el sistema de defensa antioxidante (Hole et al., 2011; Ogasawara and Zhang, 2009).

El estrés oxidativo produce modificaciones oxidativas en las biomoléculas fundamentales, culminando en la pérdida de funciones vitales y en la muerte neuronal. Las citoquinas pro-inflamatorias inducen la producción de ROS y RNS (Urrutia et al., 2014) a través de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Grzybicki et al., 1996) y la NADPH oxidasa (NOX) en los astrocitos y las microglías. La iNOS se induce fuertemente durante la gliosis en situaciones patológicas, como la EA (Aliev et al., 2009; Smith et al., 1997; Vodovotz et al., 1996; Wallace et al., 1997). Diferentes isoformas de la NOX participan en la neuropatología de la EA (de la Monte and Wands, 2006; Shimohama et al., 2000). Se ha demostrado que el péptido A β se une a los astrocitos causando aumentos transitorios de calcio, los cuales se asociaron con el

aumento de la actividad de la NOX culminando en la muerte neuronal (Abramov et al., 2004b; Abramov and Duchen, 2005). Además, nuestro grupo demostró que la incubación de neuronas de hipocampo con gp91-ds-tat, un péptido inhibidor de la actividad de la NOX que imposibilita su ensamblaje, impidió la generación de señales de calcio en respuesta a A β Os (SanMartin et al., 2017), lo que sugiere que estos estimulan la actividad de NOX2, presumiblemente a través de la estimulación del receptor NMDA (Brennan et al., 2009).

1.1.2 Rol de los astrocitos en la función cerebral y en la neurodegeneración

1.1.2.1 Los astrocitos como un célula clave del sistema nervioso central

Los astrocitos son las células más versátiles y abundantes del sistema nervioso central (SNC) (Sofroniew and Vinters, 2010), siendo indispensables para el apropiado desarrollo del cerebro (Allen et al., 2012; Bialas and Stevens, 2013; Chung et al., 2013; Kucukdereli et al., 2011). Los astrocitos funcionan en dominios o territorios conectando la vasculatura con el tejido cerebral, participan en la sinapsis cuatripartita y se comunican estrechamente con los oligodendrocitos, microglías y otros astrocitos. Este intrincado sistema de conexiones le permite al astrocito ejercer el control sobre diversas funciones cerebrales incluyendo: la regulación de la barrera hematoencefálica, la entrega de nutrientes, energía y neurotransmisores al tejido nervioso (Sattler and Rothstein, 2006; Seifert et al., 2006; Simard and Nedergaard, 2004) y la mantención del balance de iones, agua y metabolitos (Haj-Yasein et al., 2011). Los astrocitos pueden propagar corrientes de calcio y liberar factores de crecimiento y/o mediadores inflamatorios (Choi et al., 2014; Malarkey and Parpura, 2008; Martineau et al., 2014).

Además, liberan neurotransmisores como glutamato, GABA y ATP, y neuromoduladores como D-serina y ácido quinurénico, los cuales modulan la señalización neuronal (Giaume et al., 2010; Henneberger et al., 2010; Panatier et al., 2006; Pangrsic et al., 2007; Parpura et al., 2010; Parpura and Zorec, 2010). La exocitosis de gliotransmisores es activada por un aumento del Ca^{2+} citosólico -al igual que en las neuronas- aunque con una cinética menor que en las neuronas (Kreft et al., 2004). La expresión de receptores de neurotransmisores en los astrocitos es altamente heterogénea y es probablemente regulada por el ambiente local. En el cerebro de los mamíferos se expresan al menos tres tipos de receptores ionotrópicos en los astrocitos, representados por los receptores tipo AMPA, NMDA y purinérgicos P2X (Lalo et al., 2011), siendo los del tipo AMPA los más abundantes en los astrocitos corticales, hipocampales y del cerebelo (Condorelli et al., 1999; Gallo and Ghiani, 2000; Seifert and Steinhauser, 2001). Estos receptores ionotrópicos son activados durante la transmisión sináptica formando la base de las corrientes sinápticas gliales las cuales dependen directamente de la liberación de neurotransmisor presináptico (Lalo et al., 2011).

Un astrocito único en el cerebro humano puede, dentro de su dominio, participar en 2 millones de sinapsis (Oberheim et al., 2009). Por esta razón, una perspectiva más apropiada de un astrocito sería visualizarla como una célula que integra la función de todas las otras células que componen el tejido nervioso. En nichos específicos del cerebro adulto como la zona subventricular, los astrocitos B1 son células madre quiescentes que funcionan como progenitores de neuroblastos destinados al bulbo olfatorio (Mamber et al., 2013), lo cual demuestra lo multifacéticos que son los astrocitos.

El rol fundamental de los astrocitos en el cerebro es proteger el SNC de cualquier tipo de daño y reparar el tejido nervioso después de una lesión. Esto se realiza de forma primaria a través de la “**astrogliosis**”, un evento evolutivo conservado que contribuye a la neuroprotección y aislamiento del tejido dañado a través de la formación de una cicatriz glial y la remoción del patógeno del SNC (Verkhratsky et al., 2010).

La astrogliosis ocurre cuando los astrocitos responden a lesiones en el SNC produciendo un espectro de cambios morfológicos y moleculares. Mediadores inflamatorios liberados por las microglías, neuronas, oligodendrocitos, células endoteliales, leucocitos y otros astrocitos en respuesta a un daño, inician los cambios asociados a la reactividad. Los cambios moleculares involucran un amplio espectro de genes, resultando en la expresión diferencial de proteínas estructurales, reguladores transcripcionales, componentes de la matriz extracelular, reguladores inflamatorios, reguladores vasculares y moduladores sinápticos. Interesantemente, esos cambios moleculares son altamente dependientes del contexto. Mientras hay un grupo de genes que son consistentemente sobreexpresados en diferentes modelos reactivos, aproximadamente el 50% de la expresión génica alterada varía dependiendo del tipo de lesión (Daginakatte et al., 2008; Zamanian et al., 2012). El cambio morfológico primario durante la astrogliosis reactiva es la hipertrofia de los procesos astrocíticos, lo cual está ligado al aumento de la expresión de filamentos intermedios, principalmente en la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y S100 β (Kamphuis et al., 2012; Wilhelmsson et al., 2006). Aunque la consecuencia funcional del aumento de expresión de GFAP no ha sido entendida del todo, parece ser crítica para limitar la formación de la placa de A β en la EA.

El impacto de la astrogliosis reactiva en el contexto de una enfermedad es complejo ya que los astrocitos reactivos pueden ser dañinos o beneficiosos para las células que los rodean y pueden empeorar o resolver el daño inicial al SNC. Notablemente, los astrocitos reactivos son necesarios para la formación de la cicatriz, la cual ayuda a contener la propagación de células inflamatorias, y para reparar lesiones de la barrera hematoencefálica. Los astrocitos reactivos rodean las placas de A β de una manera similar a la cicatriz glial y expresan receptores tales como: RAGE, proteína tipo receptor de lipoproteína de baja densidad, proteoglicanos asociados a membrana y receptores tipo-receptor scavenger que son conocidos por unir el péptido A β (Olabarria et al., 2010).

Los astrocitos son reguladores claves de la respuesta inflamatoria y la astrogliosis reactiva es observada en tejidos post-mortem de pacientes de EA y en modelos murinos de la enfermedad. Además, el grado de astrogliosis correlaciona con el déficit cognitivo (Beach and McGeer, 1988; Kashon et al., 2004; Mrak et al., 1996). Los astrocitos sufren complejos cambios región-específicos durante el transcurso de la EA. Si bien se cree que el número de astrocitos permanece constante en el cerebro durante la progresión de la enfermedad, algunas poblaciones cercanas a las placas seniles se vuelven reactivos mientras que otros astrocitos sufren atrofia (Rodriguez et al., 2014). La astrodegeneración, definida como una reducción en el volumen y área superficial y una disminución de los procesos protoplasmáticos, también ha sido observada en modelos murinos de la EA (Kulijewicz-Nawrot et al., 2012; Olabarria et al., 2010; Yeh et al., 2011) y se ha asociado a una respuesta tardía.

1.1.2.2 Astrocitos en la enfermedad de Alzheimer

Ambos, astrocitos basales o reactivos, son reguladores claves de la respuesta inflamatoria y son capaces de liberar y/o responder a un espectro de mediadores inmunes (Farina et al., 2007). Especialmente, los astrocitos secretan diversas citoquinas capaces de inducir inflamación: IFN γ , IL-1 β , TNF- α , IL-6 y TGF- β (Carrero et al., 2012; Constam et al., 1992; Hu et al., 1998; Johnstone et al., 1999; McGeer and McGeer, 1995). Varias de esas citoquinas pro-inflamatorias están sobreexpresadas en muestras de cerebros de pacientes con EA y en los modelos de ratones transgénicos (Abbas et al., 2002; Apelt and Schliebs, 2001; Benzing et al., 1999; Tan et al., 2002). TNF α , se ha vinculado a la inducción de la fase-aguda de la inflamación y se encuentra elevada en el suero de pacientes, líquido cefalorraquídeo y corteza (Tarkowski et al., 1999). El ratón transgénico Tg2576 deficiente en un gen del receptor de TNF llamado CD40, presenta una disminución de la actividad del complejo de la β -secretasa (BACE) y de la carga de A β y de la gliosis comparada con el ratón Tg2576, remarcando la importancia de TNF α en la progresión de la EA (Tan et al., 2002). IL-6 puede ser pro-inflamatoria o anti-inflamatoria y se ha reportado elevada en el plasma sanguíneo, líquido cefalorraquídeo y en el cerebro de pacientes con EA (Galimberti et al., 2008; Licastro et al., 2003; Licastro et al., 2000; Shibata et al., 2002). IL-1 β se expresa fuertemente en microglías y su liberación depende del procesamiento de pre-IL-1 β en el inflamasoma. Se ha identificado altos niveles de esta citoquina en áreas alrededor de las placas amiloides (Griffin et al., 1989; Licastro et al., 2000). Estas citoquinas actúan directamente en las neuronas, los astrocitos y las microglías amplificando las señales inflamatorias e induciendo efectos tóxicos en las neuronas (Glass et al., 2010), contribuyendo a la progresión y severidad del EA, al aumentar la muerte celular in vitro

e in vivo en modelos animales de la EA. Vasta evidencia relaciona la reactividad de los astrocitos a los A β O con la degeneración de las neuronas adyacentes en EA (Carrero et al., 2012; Hou et al., 2011; Narayan et al., 2014; White et al., 2005; Zhang et al., 2015). El tratamiento de los astrocitos con los A β O produce disfunción mitocondrial, activación de la NOX astrocítica e inducción de la iNOS (Abramov et al., 2004a; Abramov and Duchon, 2005; Abramov et al., 2005; White et al., 2005). Por lo tanto, la activación crónica de los astrocitos genera un ambiente inflamatorio, oxidativo y excitotóxico que altera el normal funcionamiento neuronal.

Por largo tiempo se pensó que las neuronas eran las únicas células capaces de producir el péptido A β (Laird et al., 2005). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los astrocitos expresan BACE1 en niveles suficientes para generar A β y que ésta expresión puede ser aumentada debido al estrés celular (Blasko et al., 2000; Jin et al., 2012; Leuba et al., 2005; Orre et al., 2014; Rossner et al., 2005; Zhao et al., 2011). Además, ciertas condiciones estresantes pueden aumentar la expresión de la proteína APP y por lo tanto, la secreción de A β . Incluso en cultivos primarios de astrocitos se detectó la expresión de APP, BACE1 y las subunidades de complejo γ -secretasa PS1, PS2, PEN2 y NCT (Grolla et al., 2013). Dado que en el cerebro los astrocitos son más abundantes que las neuronas, la identificación de factores ambientales (como por ejemplo la inflamación), la cual promueve la producción astrocítica del péptido A β (Brugg et al., 1995; Goldgaber et al., 1989; Heinrich et al., 1990), podría redefinir nuevas estrategias terapéuticas contra la EA.

1.1.3 El factor de transcripción STAT3

El factor de transcripción STAT3 (Signal transducer and Activator of Transcription 3) es un factor de transcripción latente que tras la activación transloca al núcleo donde promueve la transcripción de diversos genes blancos (Darnell, 1997; Dziennis and Alkayed, 2008; He and Karin, 2011; Yu et al., 2009). STAT3 es fundamental para el desarrollo y la mantención del sistema nervioso (Deverman and Patterson, 2009; Mehta et al., 2016; Takeda et al., 1997). Los embriones del ratón deficiente de STAT3 (-/-) mostraron una rápida degeneración y muerte entre los días de gestación E6,5 y 7,5, indicando que STAT3 es esencial para el desarrollo temprano de los embriones de ratón (Takeda et al., 1997). STAT3 ha sido involucrado en respuestas de sobrevivencia, inmunidad, inflamación y regeneración neuronal (Benito et al., 2017; Guo et al., 2008; Hillmer et al., 2016). Las proteínas STAT3 incluyen una forma no fosforilada (STAT3), y formas fosforiladas tanto en la tirosina 705 (pTyr-STAT3) como en la serina 727 (pSer-STAT3) (Qi and Yang, 2014; Stark and Darnell, 2012). En condiciones basales STAT3 se encuentra en el citoplasma en la forma no fosforilada (Darnell, 1997; Zhong et al., 1994). Citoquinas, principalmente de la familia de la IL-6, inducen la fosforilación de STAT3 en el residuo tirosina 705 (pTyrSTAT3) a través de la activación de las quinasas JAKs (Levy and Darnell, 2002; Rajan et al., 1996; Zhong et al., 1994), produciendo la dimerización, translocación al núcleo y unión a secuencias específicas del ADN, induciendo la expresión de genes neuroprotectivos y neurotróficos (Darnell, 1997; Dziennis and Alkayed, 2008; He and Karin, 2011; Yu et al., 2009). Factores tróficos y estrés ambiental producen la fosforilación del residuo serina 727 de STAT3 (pSer-STAT3), la cual es requerida para la máxima actividad transcripcional total de STAT3 (Decker and Kovarik, 2000; Wen et al., 1995). Ratones

que expresan a STAT3 con el residuo serina reemplazado por una alanina tienen un 50% de la respuesta transcripcional en sus fibroblastos comparado con células normales y presentan un disminuido número de timocitos asociado con un aumento en la muerte apoptótica (Shen et al., 2004). Análisis de expresión génica por ensayos de microarreglo revelaron que más de mil ARNm tienen sus niveles alterados en respuesta a un aumento en la expresión de STAT3 o de la forma mutada Tyr705Phe-STAT3 (Yang et al., 2005). Además, un anticuerpo que se une específicamente al sitio pTyr705, bloquea la acumulación nuclear de pTyr-STAT3 y la expresión de proteínas de respuesta de fase aguda inducida por IL-6, sin embargo, este anticuerpo no bloquea los efectos río abajo de pSer-STAT3 o de STAT3 no fosforilado (Koo et al., 2014), indicando que pSer-STAT3 exhibe una actividad transcripcional “independiente de pTyr-STAT3”. En suma, la expresión del mutante Tyr705Phe-STAT3 o de STAT3 en células que carecen de STAT3 reveló que la actividad transcripcional de STAT3 es independiente de pTyr-STAT3 (Yang and Stark, 2008) y que es la fosforilación del residuo serina 727 que aumenta la actividad transcripcional de STAT3 (Wen et al., 1995), sin aumentar la unión de STAT3 al ADN (Wen and Darnell, 1997). Esas observaciones, apuntan a una función aún indeterminada de pSer-STAT3, que permite el aumento de la actividad transcripcional de STAT3.

Varias líneas de evidencia sugieren que los cambios en el tono redox celular modifican la actividad de STAT3. En células no neuronales, las ROS inducen la fosforilación en la tirosina de STAT3 y la actividad de unión al ADN (Carballo et al., 1999; Maziere et al., 1999; Qu et al., 2013; Simon et al., 1998). Asimismo, otros reportes indican que STAT3 es un factor de transcripción susceptible al estrés oxidativo (Li et al., 2010; Li and Shaw, 2004; Maziere et al., 1999; Xie et al., 2009) y que tratamientos con peróxido de

hidrógeno inducen la oligomerización de STAT3 a través de la formación de enlaces disulfuro (Li et al., 2010; Li and Shaw, 2004; Sobotta et al., 2015). La oxidación de cisteínas conservadas en el dominio de unión al ADN dificultan esta unión, afectando su actividad transcripcional (Butturini et al., 2014; Li et al., 2010). Además, estrés oxidativo leve induce S-glutationilación de STAT3, disminuyendo su acumulación nuclear y perturbando la expresión de genes blancos (Butturini et al., 2013; Xie et al., 2009).

En respuesta a ROS, STAT3 juega un rol crítico en el desarrollo del cerebro y promueve la sobrevivencia de neuronas adultas bajo condiciones normales (Murase et al., 2012). No obstante, STAT3 también juega un rol pivote bajo condiciones patológicas (Jung et al., 2009; Schweizer et al., 2002). Un estudio previo propuso que oligómeros solubles del péptido β -amiloide producen problemas de memoria al perturbar el eje JAK2/STAT3 en las neuronas hipocampales (Chiba et al., 2009). Una disminución en la expresión o en la activación de STAT3 marcadamente atenuó la apoptosis neuronal inducida por $A\beta$, sugiriendo que la activación de STAT3 contribuye a la muerte neuronal seguida a la exposición al $A\beta$ (Wan et al., 2010). Además, se ha propuesto que la acetilación y fosforilación de STAT3 están involucradas en la capacidad de respuesta de la microglia al péptido $A\beta$ (Eufemi et al., 2015). Un reporte reciente demostró que la depleción de la alipoproteína E en los astrocitos a través de la inhibición de la señalización TGF- α /Smad2/STAT3, recupera el aprendizaje espacial y los déficit de memoria observados en el ratón APP/PS1, un ratón modelo de la EA (Zheng et al., 2017). El efecto pro-inflamatorio del $A\beta$ en los macrófagos ha sido relacionado a la inactivación de STAT1 y STAT3, y la vía JAK/STAT3 fue propuesta como un común inductor de la reactividad astrocítica en EA y la enfermedad de

Huntington (Ben Haim et al., 2015). Por lo tanto, diversas evidencias sugieren que STAT3 es un factor de transcripción sensible al estrés oxidativo, que podría ser un factor importante en la respuesta de sobrevivencia neuronal y un factor inductor de activación glial en condiciones patológicas, lo cual podría ser tremendamente perjudicial cuando se ejecuta de forma crónica al favorecer la degeneración neuronal.

1.1.4 Rol del calcio, receptor de ryanodina (RyR) y calcineurina en la enfermedad de Alzheimer

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo producen señales de calcio (Ca^{2+}) en neuronas primarias de hipocampo (Munoz et al., 2011) y en células PC12 (Hidalgo et al., 2007; Munoz et al., 2006). Diversos reportes han sugerido una contribución importante del retículo endoplasmático en la desregulación de la homeostasis del calcio en los procesos patológicos en la EA (Del Prete et al., 2014; Mattson, 2010), especialmente del receptor de ryanodina (RyR) (Chakroborty et al., 2009; Del Prete et al., 2014; Oules et al., 2012; Stutzmann et al., 2006; Stutzmann et al., 2007). El RyR es codificado por 3 genes: RyR1, 2 y 3. En el cerebro, RyR2 y 3 son expresados en niveles moderados a altos, mientras que RyR1 es expresado en bajos niveles (Hertle and Yeckel, 2007). Los niveles de RyR están aumentados en cerebros de pacientes con EA (Kelliher et al., 1999) mientras que en los modelos animales de la EA, las isoformas RyR2 y RyR3 están sobreexpresadas en las etapas tempranas y tardías, respectivamente (Chakroborty et al., 2009; Supnet et al., 2006; Supnet et al., 2010; Zhang et al., 2010a). El RyR es altamente sensible a cambios del tono oxidativo, sufriendo diversas modificaciones oxidativas como: 1) la oxidación reversible de cisteínas que estimulan la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Carrasco et al., 2004;

Hidalgo and Donoso, 2008), 2) S-glutathionilación mediada por peróxido de hidrógeno en cultivos primarios y 3) S-nitrosilación (Kemmerling et al., 2007), y 4) el remodelamiento del complejo macromolecular del RyR2, caracterizado por la depleción de la proteína reguladora calstabilina 2, resultando en un aumento de los niveles de calcio citosólico y estrés oxidativo mitocondrial (Bussiere et al., 2017; Lacampagne et al., 2017). Las modificaciones del RyR ocurren río abajo del A β a través de la cascada de señalización que activa a la PKA (Bussiere et al., 2017). Este conjunto de evidencias sugiere que frente a aumentos del tono oxidativo, el RyR debería aumentar los niveles de calcio citosólico, lo cual podría activar vías de señalización dependientes de calcio.

Las señales de Ca²⁺ también estimulan directamente, o vía el complejo Ca²⁺-calmodulina (CaM), la actividad de varias quinasas y fosfatasa involucradas en la señalización celular, entre ellas calcineurina, una serina/treonina fosfatasa dependiente de Ca²⁺ y CaM. La actividad de calcineurina está aumentada en muestras *post-mortem* de cerebros de pacientes con EA (Liu et al., 2005a; Liu et al., 2005b; Qian et al., 2011). Este aumento en la actividad está dado por un aumento en la formación de una subunidad A truncada de calcineurina (Liu et al., 2005b; Qian et al., 2011) producto de la activación de la proteasa calpaína (Wu et al., 2004), la cual remueve un dominio autoinhibitorio crítico llamado AID (Liu et al., 2005b). Sin el dominio AID la actividad de calcineurina se mantiene elevada de forma irreversible independiente de los niveles de calcio (Wu et al., 2004).

El aumento de la proteólisis de calcineurina se ha documentado en individuos con deterioro cognitivo leve y los A β Os también aumentan la proteólisis en neuronas

hipocampales de cultivo primario (Mohammad Abdul et al., 2011). La proteólisis de calcineurina es especialmente importante en astrocitos asociado con la patología $A\beta$ (Pleiss et al., 2016), permitiendo la hiperactivación de sustratos claves como NFAT (Mohammad Abdul et al., 2011), el cual está aumentado en las etapas tempranas de la EA, asociándose con el déficit cognitivo (Abdul et al., 2009) y está ligada a fenotipos gliales alterados y neuroinflamación (Fernandez et al., 2007; Nagamoto-Combs and Combs, 2010; Rojanathammanee et al., 2015). En concordancia, nuestro grupo demostró que el tratamiento de neuronas de hipocampo con $A\beta$ Os promueve la activación de NFAT, aumentando su translocación al núcleo (Lobos et al., 2016).

Asimismo RCAN1, una proteína que directamente se une el dominio catalítico de calcineurina y lo inhibe (Ermak et al., 2002; Fuentes et al., 2000; Kingsbury and Cunningham, 2000; Rothermel et al., 2000), está sobreexpresada en cerebros de pacientes con EA, síndrome de Down y en células expuestas a una aplicación exógena del péptido $A\beta_{1-42}$ (Fuentes et al., 2000; Ermak et al., 2001). Interesantemente, durante la adaptación al estrés oxidativo la inducción de RCAN1 resulta ser un proceso dependiente de calcio (Crawford et al., 1997; Leahy et al., 1999).

La truncación y activación de calcineurina aumenta la actividad de la caspasa-3 en el hipocampo del ratón transgénico Tg2576-APP^{swe} (D'Amelio et al., 2011). Esto concuerda con estudios que demuestran que calcineurina está involucrada en la muerte apoptótica neuronal (Asai et al., 1999; Honig and Rosenberg, 2000; Wu et al., 2004). También se ha implicado la activación de calcineurina en la inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP) inducida por $A\beta$ (Xie, 2004) y en la participación en la depresión a largo plazo (LTD) (Dacher et al., 2013; Jensen and Edwards, 2012; Yuan

and Burrell, 2012), al igual que STAT3 (Hofmann and Kirsch, 2012; McGregor et al., 2017; Nicolas et al., 2012). La calcineurina también es sensible al estrés oxidativo. El anión superóxido (O_2^-) inhibe a calcineurina (Rusnak and Mertz, 2000), ya que interactúa con su centro redox activo de Fe^{2+} - Zn^{2+} oxidándolo a Fe^{3+} - Zn^{2+} (Namgaladze et al., 2002), mientras que la SOD previene la inactivación de calcineurina, demostrado in vitro e in vivo (Wang et al., 1996). Por otra parte, la inactivación de calcineurina por H_2O_2 es dependiente de la concentración y es revertida por la enzima tioredoxina ditiol oxidoreductasa (Bogumil et al., 2000). La calcineurina también promueve la degradación de STAT3 mediante la vía ubiquitin-proteosoma, ya que la inhibición de calcineurina aumenta los niveles totales de STAT3 y sus formas activadas (Murase, 2013), sin cambiar los niveles de ARNm de STAT3 en ratones y cultivo primario (Yang et al., 2016). Así, la calcineurina podría ser un interesante blanco molecular involucrado en la desfosforilación del residuo serina 727 de STAT3, ya que su actividad cambia según los niveles de ROS y Ca^{2+} intracelular.

1.1.5 Glutamato y excitotoxicidad en la enfermedad de Alzheimer

La mayor parte de la neurotransmisión excitatoria en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos es mediada por el glutamato y sus receptores ionotrópicos: receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR), receptores de kainato y receptores delta. Esos receptores juegan importantes roles en la plasticidad sináptica, siendo fundamentales para los procesos de memoria y aprendizaje (Riedel et al., 2003). Una considerable cantidad de evidencias sugiere que la sobreactivación excitotóxica de los receptores de glutamato mediada por una excesiva entrada de Ca^{2+} , especialmente por

los del tipo NMDAR (Benarroch, 2011; Choi, 1987; Choi et al., 1988; Koh and Choi, 1991; Szydlowska and Tymianski, 2010; Tymianski et al., 1993), contribuye a la muerte celular en EA, ya que los NMDARs tienen una mayor permeabilidad por Ca^{2+} comparado con los otros receptores de glutamato ionotrópicos (Choi, 1992). Ese aumento patológico en los niveles de Ca^{2+} genera pérdida gradual de la función sináptica y en última instancia muerte celular, lo cual correlaciona clínicamente con disminución progresiva en la cognición y memoria en los pacientes con EA, racionalizando el uso clínico de memantina, un antagonista del NMDAR, como un tratamiento neuroprotectivo y sintomatológico para la EA (Danysz and Parsons, 2003; Danysz et al., 2000; Wenk, 2006).

La recaptura de glutamato y el sistema de reciclamiento son importantes factores que determinan la disponibilidad de glutamato para los procesos de señalización. Desafortunadamente, se ha observado que en pacientes con EA hay una disminución en la capacidad de transportar glutamato y una pérdida selectiva del transportador vesicular de glutamato (VGlut) (Kirvell et al., 2006; Li et al., 1997b; Masliah et al., 1996). Además, se ha reportado que el transportador excitatorio aminoacídico 2 (EAAT2) localizado en los astrocitos perisinápticos está alterado en la EA (Scott et al., 2011). Estudios con distintas especies del péptido $\text{A}\beta$ en cultivos neuronales apoyan la idea que el $\text{A}\beta$ tóxico podría permitir mayor disponibilidad de glutamato, alterando sus mecanismos de reciclaje y recaptura (Arias et al., 1995; Brito-Moreira et al., 2011; Fernandez-Tome et al., 2004; Parpura-Gill et al., 1997; Paula-Lima et al., 2011; Paula-Lima et al., 2013). Al respecto, se ha demostrado en astrocitos primarios que los $\text{A}\beta$ Os estimulan fuertemente la activación de NFAT y producen una reducción significativa de los niveles proteicos de EAAT2 (Abdul et al., 2009). Estos resultados sugieren que la

vía de señalización de NFAT está alterada selectivamente en la EA y que podría jugar un importante rol en la neurodegeneración inducida por los A β O. Además, los A β O inducen una disminución de la expresión del transportador de glutamato GLUT1 en la superficie celular de los astrocitos (Scimemi et al., 2013), aumentando el curso temporal de la recaptura del glutamato. Estas evidencias sugieren fuertemente que los A β O facilitarían un exceso de glutamato en el espacio extra-sináptico, debido a que estimulan cascadas de señalización en el astrocito que culminan en la desregulación de los transportadores de glutamato, generando un ambiente excitotóxico que conlleva finalmente a la muerte neuronal.

1.1.6 Apoptosis y STAT3.

La apoptosis es un tipo de muerte programada que ocurre normalmente en el desarrollo, durante el envejecimiento o como un mecanismo de defensa cuando las células son dañadas por una disfunción o por un agente tóxico (Norbury and Hickson, 2001). La apoptosis es un proceso coordinado que involucra una cascada de eventos moleculares que dependen de energía. Existen tres principales vías apoptóticas: 1) la vía extrínseca o apoptosis por receptor de muerte (Receptor Fas o receptor de TNF α), 2) la vía intrínseca o mitocondrial y 3) la vía perforina/granzima (B o A). Las tres vías convergen en la misma vía de ejecución la cual se inicia por el clivaje caspasas iniciadoras (caspasa -2, -8, -9, -10) y luego por clivaje de caspasas ejecutoras (caspasa -3,-6,-7), siendo el clivaje de caspasa-3 uno de los eventos más importantes ya que es parcial o totalmente responsable de la escisión proteolítica de diversas “proteínas clave” resultando en la mediación y amplificación de las señales de muerte. La activación de caspasa-3 resulta en la fragmentación del ADN y condensación de la

cromatina, degradación de las proteínas del citoesqueleto y nucleares, entrecruzamiento de proteínas, aparición de protuberancias en la membrana plasmática, pérdida del volumen celular y formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos de receptores presentes en las células fagocíticas y finalmente la captura por células fagocíticas. La granzima A activa en paralelo, una vía de muerte celular independiente de caspasa (Igney and Krammer, 2002; Martinvalet et al., 2005).

En la vía intrínseca, diversos estímulos producen señales intracelulares que activan blancos que inician eventos mitocondriales, tales como la apertura del poro de transición mitocondrial (MPTP), la pérdida del potencial de transmembrana y la liberación de dos grupos de proteínas pro-apoptóticas desde el espacio intermembrana al citoplasma (Saelens et al., 2004). El primer grupo consiste de citocromo-c, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, las cuales activan a la caspasa-9 y permiten la formación del apoptosoma (Cai et al., 1998; Du et al., 2000; Garrido et al., 2006; van Loo et al., 2002). El segundo grupo consiste de: factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G y CAD, las cuales son liberadas como un evento tardío después que la célula se ha comprometido a morir. El control y regulación de esos eventos mitocondriales ocurre a través de miembros de la familia Bcl-2, en donde algunos miembros son anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl.x, Bcl-XS, Bcl-w, BAG y otros son pro-apoptóticos, como Bax, Bad, Bcl-10, Bak, Bid, Bim, Bik y Blk (Cory and Adams, 2002).

STAT3 participa en la respuesta de sobrevivencia celular a través de la transcripción de diversos genes como: *Bcl-2*, *Bcl-xL* (Komine-Kobayashi et al., 2006; Konnikova et al., 2003; Solaroglu et al., 2006; Stephanou et al., 2000), *survivina* (Aoki et al., 2003; Kanda et al., 2004; Mahboubi et al., 2001), *Mcl-1* (Bhattacharya et al., 2005; Nam et al.,

2005), *cIAP2* (Solaroglu et al., 2006) y *Pim-1* (Shirogane et al., 1999). Bcl-2 y Bcl-xL impiden la liberación de factores pro-apoptóticos (Li et al., 1997a), mientras que survivina, quien es un miembro de la familia de las proteínas IAPs (inhibidor de la apoptosis), inhibe la activación de las caspasas (Tamm et al., 1998), por lo tanto regula la vía apoptótica intrínseca y extrínseca (Deveraux and Reed, 1999). Dado que STAT3 promueve la sobrevivencia de neuronas en condiciones patológicas (Jiang et al., 2014; Jung et al., 2009; Manickam and Tulsawani, 2014; Schweizer et al., 2002), éste podría ser un interesante blanco que podría mediar la respuesta de sobrevivencia de las neuronas en respuesta a los oligómeros del péptido A β .

1.2. Hipótesis de trabajo:

“Los oligómeros del péptido β -amiloide activan a los astrocitos induciendo la liberación de ROS y RNS, lo cual genera en las neuronas un aumento el tono oxidativo y la liberación de calcio a través del receptor de ryanodina, activando a la fosfatasa calcineurina. La activación de calcineurina resulta en la defosforilación del residuo serina 727 de STAT3, disminuyendo su localización nuclear y la expresión de genes blancos de supervivencia, finalizando en una mayor sensibilidad a estímulos excitotóxicos”.

1.3 Objetivo general

Evaluar la mediación de los astrocitos en las vías de señalización que promueven cambios adaptativos de expresión génica neuronales, en respuesta a los oligómeros sinaptóticos del péptido β -amiloide. Evaluar los mediadores liberados por los astrocitos reactivos, posibles cambios del tono oxidativo y en las señales de calcio en las neuronas. Determinar si la fosfatasa calcineurina participa en la defosforilación del residuo serina 727 de STAT3 en neuronas y si esto genera cambios en la expresión génica asociados a supervivencia y susceptibilidad a estímulos citotóxicos.

1.4 Objetivos específicos

1.4.1. Determinar el/los mediador(es) liberado(s) por astrocitos, después del tratamiento con los oligómeros del péptido β -amiloide ($A\beta$ Os), que induce(n) disminución de pSer-STAT3 nuclear en las neuronas. Evaluar la posible participación de:

1.4.1.1 Especies reactivas de oxígeno.

1.4.1.2 Citoquinas inflamatorias IL-6, IL-1 β o TNF α (se evaluará si aumentan su expresión y secreción)

1.4.1.3 Óxido nítrico.

1.4.2. Determinar si el medio condicionado de astrocitos tratado con $A\beta$ Os, produce un aumento del tono oxidativo en las neuronas.

1.4.2.1 Evaluar si hay cambios en la oxidación del soma neuronal. Para ello, medir si ocurre aumento de los niveles de tioles oxidados tras el tratamiento con el medio condicionado de astrocitos.

1.4.2.2 Determinar si hay aumento del peróxido de hidrógeno en el soma y neuritas.

1.4.2.3 Evaluar si diferentes antioxidantes abolen el efecto del medio condicionado tratado con $A\beta$ Os, reestableciendo la señal de pSer-STAT3 en el núcleo.

1.4.3. Evaluar si el mecanismo de re-distribución de pSer-STAT3 es dependiente de calcio, receptor de ryanodina y calcineurina.

1.4.3.1 Evaluar si el medio condicionado tratado con A β Os produce aumento del calcio intracelular en neuronas. En caso de que haya un aumento, evaluar si la quelación de calcio con BAPTA-AM revierte el efecto del medio condicionado de astrocitos.

1.4.3.2 Evaluar si la inhibición del receptor de ryanodina (RyR) revierte el efecto del medio condicionado de astrocitos tratado con A β Os.

1.4.3.3 Evaluar la posible participación de calcineurina como el regulador de la fosforilación de la serina 727 de STAT3. Para ello, evaluar si la expresión de un péptido inhibitorio de calcineurina revierte el efecto del medio condicionado de astrocitos tratado con A β Os y si la sobreexpresión de una variante constitutivamente activa de calcineurina exacerba el efecto del medio condicionado.

1.4.4. Evaluar si la disminución de pSer-STAT3 en el núcleo, producto del medio condicionado de astrocitos tratado con A β Os, correlaciona con una disminución en la expresión de genes blancos de supervivencia y/o una sensibilización a estímulos excitotóxicos.

1.4.4.1 Determinar los niveles de ARNm de los genes Bcl-2, Bcl-xL y survivina y si ocurre cambio en la razón pro-apoptótica Bax/Bcl-2. Evaluar si un antioxidante recupera los niveles de ARNm de esos genes blancos

1.4.4.2 Evaluar si el medio condicionado de astrocitos tratado con A β Os aumenta la susceptibilidad de las neuronas a estímulos excitotóxicos, como NMDA o glutamato.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales

El péptido β -amiloide fue comprado en Bachem Inc. Los reactivos Hexafluoro-2-propanol (HFIP), FluorSave, peróxido de hidrógeno y MCI-186 fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). Dimetil sulfóxido (DMSO), *t*-butil-hidroperóxido, Catalasa (Cód. C1345) y Superóxido dismutasa (Cód. S5395), Hemoglobina (Cód. H2500), matriz CNBr-Sefarosa activada, 4-cloro-*m*-cresol (CMC), EUK-134, DMTU, Etil galato, Tempol, los anticuerpos anti-actina (A5441, ratón) y anti RCAN1 (D6694, conejo) fueron obtenidos en Sigma (St. Louis, MO). Las columnas para extraer el ARN total fueron compradas en Omega Bio-Tek (Norcross, GA). La enzima transcriptasa reversa MLV y Amplex® Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina), el factor de crecimiento neural (NGF), el medio neurobasal, HBSS, el suplemento B27, el medio mínimo esencial (MEM), medio mínimo esencial Dulbecco (DMEM), suero de caballo y lipofectamina 2000, BAPTA-AM, los anticuerpos secundarios: Alexa Fluor® 488 anti-conejo IgG (cabra), Alexa Fluor® 488 anti-ratón IgG (cabra), Alexa Fluor® 633 anti-ratón IgG (cabra), Alexa Fluor® 546 anti-pollo IgG (cabra), Alexa Fluor® 488 C5 Maleimida, Alexa Fluor® 555 C5 Maleimida, Fluo-4 AM, Fluo 3-AM y el kit de revelado SuperSignal chemiluminescence assay fueron adquiridos en Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) y el kit de qPCR KAPA SYBR® FAST Universal fue comprado a la empresa KAPA biosystems (Wilmington, MA). El suero fetal bovino (FBS) inactivado fue comprado en Biological Industries (Cromwell, CT). Los anticuerpos primarios: anti-fosfo serina727-STAT3 (#9134, conejo); anti-fosfo tirosina705-STAT3 (#9145, ratón), anti-STAT3 (#9139, ratón), anti-GFAP (#3670, ratón) y anti-caspasa 3-activada Asp175 (#9661,

conejo) fueron adquiridos en Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Los anticuerpos anti-histona H1 (ab11079, ratón) y anti-NFATc4 (ab62613, conejo) fueron comprados en Abcam (Cambridge, Reino Unido). Los anticuerpos anti-A β 6E10 (SIG-39320, ratón) y anti- β III-tubulina (TUJ, pollo) fueron adquiridos en Covance (Princeton, NJ) y Aves Lab (Tigard, OR), respectivamente. El reactivo Western Lightning Plus-ECL (NEL104001EA) fue adquirido en Perkin Elmer (Waltham, MA). El plásmido HyperCyto fue adquirido en Evrogen (Moscú, Rusia). El kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Cód. G3250) fue comprado en Promega (Madison, WI). Los kits de ELISA para detectar IL-1 β (Cat N° RLB00), IL-6 (Cat N° R6000B) y TNF α (Cat N° RTA00) fueron comprados en R&D systems (Minneapolis, MN).

2.2 Cultivos primarios

El comité de ética de la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile aprobó el protocolo de bioética usado en esta tesis. Todos los procedimientos fueron realizados en concordancia con la guía de cuidados y usos de animales de experimentación de los institutos de la salud de Estados Unidos. Los animales dispusieron de comida y agua *ad libitum* y fueron eutanasiados bajo profunda anestesia para evitar el sufrimiento en cada etapa del sacrificio.

El cultivo primario de neuronas hipocampales fue preparado de embriones E19-20 obtenidos de ratas preñadas Sprague-Dawley, como se ha descrito previamente (Paula-Lima et al., 2011) con algunas modificaciones. En breve, los cerebros fueron removidos y puestos en placas de petri que contenían una solución HBSS-HEPES. Las meninges fueron removidas, los hipocampos fueron disectados y se agregó tripsina

0,5% por 20 minutos para disgregar el tejido. Luego, las células fueron disociadas mecánicamente en una solución de HBSS-HEPES y fueron suspendidas en el medio de plaqueo (MEM suplementado con suero de caballo). Se realizó un conteo y las células disociadas fueron plaqueadas en placas o vidrios cubiertos con poli-lisina y se incubaron por 1 h a 37°C. Después, el medio MEM fue reemplazado por el medio neurobasal suplementado con B27 (medio de mantención). Las células fueron cultivadas por 7-8 días in vitro (7-8 DIV) a 37°C en una atmósfera humedecida en CO₂ al 5%. Esos cultivos estaban altamente enriquecidos en neuronas, como se logró evidenciar con el anticuerpo anti-βIII tubulina, con un contenido glial del 12% como fue revelado por tinción con el anticuerpo anti-GFAP (proteína glial acídica fibrilar, GFAP, Figura 1A). Para facilitar la nomenclatura, el cultivo de neuronas con 12% de astrocitos será referido como cultivo neuronal rico en astrocitos. Cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron obtenidos después de la aplicación de 1-b-D arabinofuranosil citosina (AraC) a las 24 horas posteriores a la siembra, a una concentración de 1,5 μM AraC por 24 horas. El AraC fue agregado para evitar la proliferación glial, los cultivos resultantes mostraron un 4% de contenido glial (Figura 1B).

El cultivo de astrocitos primarios de corteza de rata fue obtenido como se describe en (Viviani, 2006) con modificaciones. Brevemente, las cortezas cerebrales de ratas neonatas Sprague–Dawley de 1 a 3 días fueron disectadas en un medio HBSS-HEPES y digeridas usando Tripsina-EDTA 0,25% suplementada con DNasa I a una concentración de 0,5 mg/mL. Los cultivos de glia mixta fueron incubados en medio mínimo esencial Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Las células se pegaron en la superficie plástica (sin polilisina) por 3 días y luego se les cambió todo el medio. Después de 13 días en cultivo, las células fueron agitadas

vigorosamente en un agitador a 300 rpm por 72 horas para soltar las microglías y los oligodendrocitos. Después de la agitación, los astrocitos fueron tripsinizados y re-plaqueados en placas p6 o p35 y crecieron hasta alcanzar confluencia antes de ser usados en los experimentos (Figura 1C).

2.3 Preparación y caracterización de los oligómeros del péptido β -amiloide (A β Os)

Se preparó una capa con monómeros del péptido A β 1–42 usando hexafluoro-2-propanol (HFIP) y se alicuotó en tubos eppendorf de 1,5 mL. Los tubos fueron guardados a -80°C por un periodo superior a los 4 meses. Antes de usar, esta capa fue disuelta en DMSO estéril, preparando una solución stock de 5 mM. La preparación de los oligómeros se realizó según métodos estándares (Lacor et al., 2007; Paula-Lima et al., 2011). En resumen, la solución de 5 mM fue diluida hasta una concentración de 100 μ M con buffer fosfato salino (PBS) frío, se dejó a 4°C sin agitación toda la noche y al día siguiente se centrifugó a 14.000 g por 10 minutos a 4°C, para remover los agregados insolubles (protofibrillas y fibrillas). El sobrenadante conteniendo los oligómeros solubles fue transferido un tubo limpio, la concentración de proteínas fue medida por el método de microBCA y almacenado a 4°C hasta su uso con un tiempo límite de almacenamiento de 48 horas, ya que se trata de una preparación metaestable. La composición oligomérica de los agregados en las preparaciones frescas fue confirmada por análisis de western blot y microscopia electrónica, como ha sido descrito anteriormente (Paula-Lima et al., 2011). Sólo oligómeros frescos (hasta 2 días después de su preparación) fueron utilizados en los experimentos. En el western blot se utilizaron geles de Tris-Tricina de 3 fases, en donde las muestras fueron

denaturadas sólo con buffer de carga, lo cual permitió preservar las estructuras oligoméricas en la corrida electroforética. Las muestras consistieron de distintas cantidades de A β Os (0,4, 0,6 y 0,8 μ g) y se usaron estándares de peso molecular en los carriles localizados en los dos extremos, con el fin de comparar la migración electroforética de oligómeros de grandes a un lado y pequeños al otro lado del gel (Figura 2A). Las muestras fueron corridas 1 hora a 50 V, 2 horas a 80 V y 2 horas a 110 V (a temperatura ambiente) y 2 horas en hielo. Luego, la transferencia se hizo en una cámara semi-húmeda (0,63 A por 75 minutos) usando membranas de PVDF activadas previamente con metanol (7 minutos en agitación) y al término de esto, las membranas fueron hervidas por 2 minutos para exponer los epítopes. El bloqueo se realizó con leche descremada al 5% en una solución PBS-Tween 0,05% por 1 hora a temperatura ambiente y el anti-A β (1:5000 ratón, Covance) se incubó a 4°C con agitación durante toda la noche. Se usó un anticuerpo secundario anti-ratón Ig 1:7000 en leche 5% por 1 hora a temperatura ambiente, se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 0,05%, 2 lavados con PBS y las muestras fueron reveladas con el reactivo Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer). La caracterización mediante microscopia electrónica de contraste de fase consistió en analizar una muestra fresca de oligómeros, a los cuales se les agregó acetato de uranilo (coloración de contraste). En resumen, las grillas se des-ionizaron por 20 minutos con UV, se agregó 5 μ L de A β Os hasta que fue absorbido y luego se agregó 5 μ L de acetato de uranilo al 4% y se esperó que se absorbiera. Posteriormente las muestras fueron analizadas en el microscopio electrónico al día siguiente.

2.4 Medio condicionado de astrocitos ($MCA^{+A\beta Os}$)

El medio condicionado de astrocitos (MCA) primarios consistió en medio neurobasal suplementado con B27 (medio de mantención) tratado con los oligómeros del péptido β -amiloide ($MCA^{+A\beta Os}$) a una concentración de 0,5 μ M por 24 horas. Este medio condicionado sólo fue usado fresco (máximo 5 minutos luego de su obtención). En todos los experimentos que se usó ($MCA^{+A\beta Os}$), cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron incubados por 24 horas con este medio previo a la evaluación de los parámetros de estudio. El medio de astrocitos control fue obtenido de astrocitos tratados con medio de mantención sin los oligómeros del péptido β -amiloide ($MCA^{Control}$) por 24 horas.

2.5 Inmunocitoquímica

Cultivos neuronales ricos o pobres en astrocitos (DIV 7) fueron fijados con una solución de paraformaldehído (PFA) 4%/sacarosa 4% en PBS por 5 minutos, a una proporción 1:1 con el volumen del medio de tratamiento experimental (prefijación). Luego, esta solución fue reemplazada por PFA 4%/sacarosa 4% y las células fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, incubadas con Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 30 minutos y bloqueadas con PBS-BSA 10% por 1 hora. Las células fueron inmunomarcadas toda la noche a 4°C con diferentes anticuerpos diluidos en PBS-BSA 3%. Anti-fosfo serina 727-STAT3 (1:50, conejo), anti- β III-tubulina (1:1000, pollo), anti-GFAP (1:500, ratón), anti-fosfo tirosina 705-STAT3 (1:100, ratón) y anti-STAT3 (1:100, ratón) fueron los anticuerpos primarios usados. Después, las células fueron lavadas 5 veces con PBS e incubadas por 2 horas

a temperatura ambiente en una cámara húmeda con DAPI (1:10.000) y los siguientes anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488 anti-conejo (cabra), Alexa Fluor 633 anti-ratón (cabra), Alexa 488 anti-ratón (cabra), Alexa Fluor 546 anti-pollo (cabra), todos usados a una concentración de 1:300 en PBS-BSA 3%. Las células fueron visualizadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss Microscopy GmbH: Jena, Germany) usando el objetivo de inmersión 63x. Las imágenes fueron adquiridas digitalmente con el software ZEN (Zeiss). El programa Image J (National Institutes of Health, Baltimore, MD) se usó para los análisis de imágenes y la generación de proyecciones en el eje z desde stacks compuestos de 5-8 fotos (0,4- μm de grosor cada una). Se fotografiaron campos que contenían alrededor de 30-40 células. Usando la herramienta ROI manager, se seleccionaron las áreas totales de las neuronas usando el canal de la β III-tubulina y la densidad integrada de la marca de pSer-STAT3 fue medida en este canal usando la herramienta Overlay from ROI manager, la cual transfiere las áreas de interés (ROI) de un canal a otro en la misma posición. Luego, las áreas nucleares fueron seleccionadas a través de la marca del canal DAPI y esas áreas fueron transferidas al canal de la pSer-STAT3. La intensidad citoplasmática fue calculada como la diferencia entre la intensidad total de pSer-STAT3 y la intensidad nuclear de pSer-STAT3. La distribución es presentada como la razón de intensidad entre la fluorescencia nuclear y citoplasmática de pSer-STAT3. Todos los datos fueron normalizados respecto a la condición control.

2.6 Análisis de Western blot

Todos los extractos de proteína analizados provenían de cultivos neuronales pobres en astrocitos. Los extractos fueron preparados por lisis de las células con buffer RIPA 1x

(NaCl 150 mM, Na₂-EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NP-40 1%, sodio deoxicolato 1%) más una mezcla de inhibidores de proteasas e inhibidores de serina fosfatasas (Na₄P₂O₇ 10 mM, Na₃VO₄ 5 mM y NaF 40 mM); después de 10 minutos de incubación en hielo, se hizo una homogenización mecánica con una jeringa (12 veces) y 3 ciclos de sonicación de 20 segundos cada uno. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos y la concentración de proteínas de los sobrenadantes fue determinada por el método del BCA. Las proteínas fueron denaturadas a 95°C por 5 minutos y resueltas en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente con leche descremada al 5% (pSer-STAT3, STAT3, RCAN1, β-actina, α-tubulina) o BSA 5% (Histona 1) en un buffer TBS-Tween 0,1% (NaCl 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7.4). Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con agitación, con los siguientes anticuerpos: pSer-STAT3 (1:1.000, conejo), STAT3 (1:1.000, ratón), Histona H1 (1:1.000, ratón), RCAN1 (1:1.000, conejo), β-actina (1:5.000, ratón), α-tubulina (1:10.000, ratón). Un protocolo de stripping suave (Glicina 200 mM, SDS 0,1%, Tween-20 1%, pH 2.2) fue realizado en casi todos los experimentos. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (anti-conejo 1:10.000 y anti-ratón 1:5.000) se agregaron por 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Las bandas fueron visualizadas con el kit SuperSignal Chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen) y la cuantificación densitométrica se realizó con el programa Image J. β-actina fue usado como control de carga, Histona 1 fue usado como marcador nuclear. NGF fue usado como un control positivo.

2.7 Preparación de extractos nucleares y citoplasmáticos

Extractos nucleares y citoplasmáticos fueron preparados como se describió previamente (Garcia-Yague et al., 2013). En breve, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron lavados con PBS frío y 100 μ L de buffer A frío (HEPES 10 mM, pH 7.9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 0,5 mM, Nonidet P-40 0,05%, más inhibidores de serina fosfatasa: Na₃VO₄ 5 mM, NaF 40 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM) fue agregado e incubado por 20 minutos en hielo. El homogenizado fue centrifugado a 900 g por 10 minutos (el sobrenadante corresponde a la fracción citoplasmática). El pellet fue lavado 3 veces con 100 μ L de buffer A. El pellet nuclear fue resuspendido en 50 μ L del buffer B, el cual es un buffer hipertónico, (HEPES 5 mM, pH 7.9, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM, glicerol 26% (v/v), NaCl 300 mM más los inhibidores de las serina fosfatasa) y fue incubado por 30 minutos en hielo. Las proteínas nucleares fueron obtenidas por centrifugación a 20.000 x g por 20 minutos. Todas las muestras fueron diluidas con agua desionizada (1:1) y las proteínas fueron cuantificadas mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, Thermo Scientific-Pierce).

2.8 qPCR en tiempo real

Los cultivos de astrocitos primarios fueron tratados con o sin A β Os 0,5 μ M por 24 horas y los medios condicionados (MCA^{+A β Os} y MCA^{Control}) fueron recolectados y el ARNm de los astrocitos fue extraído usando el kit de extracción de Omega Bio-Tek. Igualmente, los cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron incubados con el MCA^{+A β Os} o MCA^{Control} por 24 h y después de eso, se obtuvo el ARNm con columnas de extracción de ARN (kit Omega Bio-Tek). La pureza de la extracción fue ensayada por

la razón de absorbancia 260/280 y la integridad del ARN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa. La primera hebra de cDNA fue sintetizada del ARN total (1 µg) usando la transcriptasa reversa M-MLV (invitrogen). La expresión de los niveles de ARNm de STAT3, los genes blancos de STAT3 y las citoquinas pro-inflamatorias fueron analizadas por PCR en tiempo real (pRT-PCR). En breve, 50 ng de cDNA en un volumen final de 10 µL fue usado para la amplificación de la reacción de PCR (Applied Biosystem Thermal Cycler). La amplificación fue hecha usando los apropiados partidores. Las secuencias de los pares de partidores (rata) fueron los siguientes:

- **STAT3** sentido/antisentido 5'-CAAAGAAAACATGGCCGGCA-3'/
3'-GGGGGCTTTGTGCTTAGGAT-5' (Hafez et al., 2015);
- ***β-actina*** sentido/antisentido 5'-AGGCCAACCGTGAAAAGATG-3'/
3'-ACCAGAGGCATACAGGGACAA-5' (Pang et al., 2016);
- ***Bcl-2*** sentido/ antisentido 5'-CTTCTCTCGTCGCTACCGTC-3'/
3'-CATGACCCACCGAACTCAA-5' (Hafez et al., 2015);
- ***Bcl-xL*** sentido/antisentido 5'-CCCAGAAGAACTGAACCA-3'/
3'-TCACTGAATGCTCTCCGGTA-5' (Singh-Mallah et al., 2017);
- ***Survivina*** sentido/antisentido 5'-TAAGCCACTTGTCCCAGCTT-3'/
3'-CTCATCCACTCCCTTCCTCA-5' (Fan et al., 2015);
- ***BAX*** sentido/antisentido 5'-TGCAGAGGATGATTGCTGA-3'/
3'-GATCAGCTCGGGCACTTTAG-5' (Singh-Mallah et al., 2017);
- ***18S rRNA*** sentido/antisentido 5'-GGGCCCAAGCGTTTACTTT-3'/
3'-TTGCGCCGGTCCAAGAATTT-5';

- ***IL-1 β*** sentido/antisentido 5'-TGTGATGAAAGACGGCACAC-3'/
3'-CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG-5';
- ***IL-6*** sentido/antisentido 5'-CCCTTCAGGAACAGCTATGAA-3'/
3'-ACAACATCAGTCCCAAGAAGG-5';
- ***TNF α*** sentido/ antisentido 5'-GCCCAGACCCTCACACTC-3'/
3'-CCACTCCAGCTGCTCCTCT-5'.

El reactivo KAPA™ SYBR Fast qPCR (KAPA Biosystems) fue usado en un equipo Step One Plus® real-time PCR (Applied Biosystems, Singapore) usando el siguiente protocolo: 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 3 segundos y 60 °C por 30 segundos, y finalmente una curva fue hecha a 95 °C por 15 segundos, por 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C, para detectar la formación de productos no específicos y amplificación de falsos positivos. Como control endógeno, la expresión de β -actina y del ARN 18S fueron cuantificadas. Las veces de cambio fueron cuantificadas usando el método 2(-Delta C(T)) (Livak and Schmittgen, 2001). Los niveles de ARNm de las citoquinas pro-inflamatorias fueron normalizadas con el ARNm 18S y la expresión del ARNm de STAT3 y de sus genes blancos se normalizó con la expresión del ARNm de la β -actina.

2.9 Tratamientos con catalasa, hemoglobina y peróxido de hidrógeno

En los experimentos de catalasa, SOD y hemoglobina se usaron cultivos neuronales ricos en astrocitos. En el experimento donde se aplicó peróxido de hidrógeno, se utilizaron cultivos neuronales pobres en astrocitos. Las enzimas neutralizadoras de

especies reactivas de oxígeno: Catalasa y Superóxido dismutasa fueron diluidas a 50 IU/mL con/sin A β Os, en un medio de mantención. Los cultivos fueron incubados por 24 horas con esas enzimas, las cuales no ingresan a células polarizadas que se encuentren intactas. Para determinar si la SOD posee actividad peroxidasa, se evaluó la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) mediante la sonda Amplex Red en un fluorímetro, el cual evidenció que había una contaminación de 35% de actividad peroxidasa, por lo tanto, los experimentos realizados con la enzima SOD fueron eliminados de la tesis. La hemoglobina es un scavenger de óxido nítrico y fue preparada como se describe en (Martin et al., 1985). La solución de hemoglobina reducida fue inmovilizada en una matriz de Sefarosa-CNBr siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación de hemoglobina-sefarosa inmovilizada fue almacenada en HCl 1 M por 2 semanas a 4°C con azida de sodio al 0,05%. Las concentraciones de hemoglobina fueron calculadas como se describe en (Hindley et al., 1997). Se agregaron 8 dosis de peróxido de hidrógeno (50 μ M) durante 24 horas y luego las células fueron fijadas. Se siguió el protocolo de inmunocitoquímica, tal como se describió antes.

2.10 Determinación del peróxido de hidrógeno en el MCA^{+A β Os} con Amplex Red®

Este ensayo se basa en la detección de H₂O₂ en una reacción que acopla a la peroxidasa de rabanita (HRP) y al compuesto Amplex Red® (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazino). Se ha probado que Amplex Red es una sonda de H₂O₂ altamente sensible y estable, y su producto de reacción llamado resorufina posee gran estabilidad y es fluorescente, por lo que puede detectarse entre los 571-585 nm (fluorescencia de emisión) (Zhou et al., 1997). La estequiometría del Amplex Red y el H₂O₂ es 1:1. Se

utilizó el amplex Red y la peroxidasa del kit ensayo de Amplex Red® Monoamino Oxidasa (kit A12214, Invitrogen). Para ello se preparó: 1) una solución stock de Amplex Red 20 mM utilizando DMSO como solvente (1 mg de Amplex en 200 μ L de DMSO) y se almacenó a -20°C protegido de la luz, 2) una solución de trabajo 1X del buffer de reacción, 3) una solución de 200 U/mL de la peroxidasa HRP disolviendo el vial con 1 mL de buffer de reacción 1X; y 4) una solución de H_2O_2 de trabajo a una concentración de 1 mM para hacer la curva de concentración, del cual se hicieron diluciones seriadas. Entonces, el cultivo de astrocitos primarios fue estimulado con o sin $\text{A}\beta\text{Os}$ por 24 horas y se recolectó el sobrenadante ($\text{MCA}^{+\text{A}\beta\text{Os}}$ o $\text{MCA}^{\text{Control}}$, respectivamente). Nótese que el medio fue preparado con Neurobasal sin rojo fenol. A una placa de 96 pocillos se agregó 10 μ L del medio condicionado (en sextuplicado) más 90 μ L del buffer de reacción 1X. Se preparó una curva de concentración de H_2O_2 desde los 100 nM hasta los 5 μ M, diluyendo el stock de H_2O_2 1 mM en el buffer de reacción 1X generando un stock 100 μ M y otro 10 μ M. Como control negativo se usó buffer de reacción 1X sin H_2O_2 . Se preparó una solución de trabajo que incluía Amplex Red 50 μ M y HRP 1 U/mL y se agregó 90 μ L de ésta solución a los pocillos y luego la muestra (10 μ L) y de esta forma se comenzó la reacción (oscuridad). Las reacciones se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Luego de esto se midió la fluorescencia en el Biotek por 1 hora usando un rango de excitación de 530-560 nm y la emisión se midió a $600 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$. Las mediciones se realizaron cada 40 segundos. Se hizo un cálculo de la pendiente a los 10 minutos en la condición basal y luego ese valor fue restado a las pendientes experimentales obtenidas en los 10 minutos. Luego, se determinó el promedio de los sextuplicados y se calculó la concentración de H_2O_2 presente en las muestras según la ecuación obtenida por la curva estándar de H_2O_2 . Dado que la cinética de formación del producto (pendiente)

resorufina disminuye considerablemente después de los 10 minutos, sólo se consideró el valor de la pendiente a los 10 minutos iniciales de registro para hacer los análisis. Este experimento se realizó 4 veces de forma independiente.

2.11 Tratamientos con antioxidantes, quelantes de calcio e inhibidores del receptor de ryanodina (RyR)

En todos los experimentos se usaron cultivos neuronales pobres en astrocitos sembrados en cubreobjetos de 12 mm ($1,5 \times 10^5$ células/vidrio para inmunocitoquímica) y en placas p6 ($1,0 \times 10^6$ células/pocillo para extracción de ARN). Todos los antioxidantes: cloruro de manganeso 3-metoxi-N,N-bis(salicilideno)-etilendiamina (EUK-134, 20 μ M), Dimetil-tiourea (DMTU, 100 μ M), 3-Metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona (MCI-186, 50 μ M), etil galato (20 μ M) y 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxipiperidina (Tempol, 1 mM) fueron co-incubados con el MCA^{+A β Os} durante 24 horas y luego las células fueron fijadas. EUK-134 y tempol son compuestos miméticos de la enzima SOD (sintéticos) aunque EUK-134 tiene actividad catalasa también. DMTU y MCI-168 son neutralizadores del oxidante llamado radical hidroxilo y etil galato es un atrapador de radicales peroxil y peróxido de hidrógeno. El *t*-butil-hidroperóxido (5 μ M), es un pro-oxidante que no es metabolizable por las células, por lo cual se usó como control positivo de oxidación. El quelante de calcio BAPTA-AM (100 μ M) y ryanodina (50 μ M, concentración inhibitoria) fueron incubados por 1 hora (Paula-Lima et al., 2011) y luego se les agregó MCA^{+A β Os} o MCA^{Control} por 1,5 o 3 horas. Las células fueron fijadas como se describió anteriormente en el protocolo de inmunocitoquímica y el ARN fue extraído de las células, tal como se describió antes.

2.12 Citoquímica-Redox

Para determinar cisteínas oxidadas y reducidas se usó citoquímica redox como se describe (Horowitz et al., 2011). En breve, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron tratados por 24 horas con MCA^{+AβOs} o MCA^{Control}. Después las células fueron fijadas y permeabilizadas por 30 minutos con una solución de PFA 4%, etilmaleimida 1 mM, Alexa Fluor® 555 C5 maleimida 2 μM y Tritón X-100 0,05% preparados en PBS a pH 7.0 (este pH es crítico para el ensayo). Las células fueron lavadas 3 veces con PBS para remover el exceso de sonda que no reaccionó y entonces, los enlaces disulfuros fueron reducidos por 30 minutos con Tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) 5 mM en PBS. Ya que TCEP reacciona con las maleimidias, es necesario lavar las células con PBS rápidamente (< 30 segundos). Después de eso, las células fueron incubadas en N-etilmaleimida 1 mM en PBS y Alexa Fluor® 488 C5 maleimida 2 μM por 30 minutos. Después de 3 lavados con PBS, la tinción fue fijada. Las células fueron visualizadas en un microscopio Carl Zeiss LSM 710 usando el objetivo de inmersión en aceite 63x y las imágenes fueron digitalmente adquiridas usando el software ZEN (Zeiss). El programa Image J fue usado para el análisis de imágenes. Todas las imágenes fueron adquiridas con los mismos parámetros confocales. Usando la herramienta ROI manager, las áreas neuronales totales fueron seleccionadas en el canal Alexa Fluor® 488 (canal oxidado) y la fluorescencia integrada fue medida. Esas áreas fueron transferidas al canal Alexa Fluor® 555 (canal reducido) usando la herramienta Overlay y se hizo la misma medición. El nivel de oxidación fue calculado como la razón de intensidades entre el canal oxidado y reducido usando la herramienta Image Calculator.

2.13 Detección de la generación de peróxido de hidrógeno con Hyper-Cyto

Neuronas de cultivos neuronales pobres en astrocitos ($1,5 \times 10^5$ células/pocillo) crecidas en cubreobjetos de 12 mm fueron transitoriamente transfectadas con el plásmido Hyper-Cyto a los 7 días de cultivo in vitro (DIV7), usando una proporción de 1:2 DNA:Lipofectamina 2000 por 2 horas en neurobasal sin B27. En cada transfección se usaron 400 ng de plásmido y al finalizar la transfección se agregó una mezcla 2:3 de neurobasal/B27 antiguo: neurobasal/B27 nuevo precalentado. Hyper-Cyto es un sensor intracelular radiométrico que detecta la producción local de H_2O_2 (Lukyanov and Belousov, 2014). El MCA^{+A β Os} fue agregado a los cultivos después de 1 hora terminada la transfección y fue incubado por 24 horas. Las células fueron fijadas a las 25 horas post-transfección con PFA 4%/sacarosa 4% y fueron montados con el reactivo FluorSave. Las neuronas transfectadas fueron excitadas con el láser a una longitud de onda de 488 nm (oxidado) y 405 nm (reducido) y la emisión fue colectada a 505-530 nm. La fluorescencia de emisión de la excitación a 488 nm fue dividida por la fluorescencia de emisión de la excitación a 405 nm (razón 488:405) como una medida del contenido de H_2O_2 (Lukyanov and Belousov, 2014). La fluorescencia de emisión a una excitación 488 nm y excitación 405 nm varían inversamente (sonda radiométrica). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 710 usando el objetivo de inmersión en aceite 63x. El programa Image J fue usado para el análisis de imágenes. Una máscara con un umbral específico fue creada para el canal reducido (405 nm) y entonces, el canal reducido fue dividido por su máscara. La producción de H_2O_2 fue calculada como una razón entre el canal oxidado (488 nm) y el reducido (405 nm) usando la herramienta Image calculator. La imagen final (mapa de Hyper) fue cuantificada. El soma y las neuritas fueron analizados separadamente para

cada neurona transfectada.

2.14 Determinación de las señales de calcio intracelular

Cultivos neuronales pobres en astrocitos (5×10^5 células/pocillo) crecieron en cubreobjetos de 25 mm. Las células fueron lavadas 3 veces con buffer Tyrode (NaCl 129 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, Glucosa 30 mM, HEPES-Tris 25 mM, pH 7.3). En algunos experimentos se realizó una pre-incubación de 1 h con los antioxidantes EUK-134, MCI-186 y DMTU antes de cargar las células con Fluo 4-AM 2 μM por 20-30 minutos a 37°C . El BAPTA-AM (100 μM) y la ryanodina (50 μM) se pre-incubaron por 30 minutos y luego fueron co-incubados con Fluo 3-AM por 30 minutos más (Paula-Lima et al., 2011). El 4-cloro-m-cresol (CMC) se utilizó como un potente agonista del receptor de ryanodina (Herrmann-Frank et al., 1996). En los otros experimentos no hubo pre-incubación y las células fueron cargadas directamente con Fluo 4-AM o Fluo3-AM. Después se hizo un lavado con buffer Tyrode y fueron transferidos al microscopio con 100-200 μL de buffer Tyrode. Después de registrar la fluorescencia basal del Fluo 4 por 3 minutos, el $\text{MCA}^{+\text{A}\beta\text{Os}}$ o el $\text{MCA}^{\text{Control}}$ fueron agregados directamente sobre el cubreobjeto cuidadosamente hasta completar 1 mL. Las imágenes de fluorescencia de Fluo-4, que reflejan los niveles de calcio intracelular, fueron obtenidas en un microscopio confocal C2+ Spectral Nikon Eclipse TI (Plan Fluor 40X aceite DIC H N2; Fluo-4 excitación 488 nm, emisión 515-520 nm) y en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 710 usando el objetivo 40X, con captura de imágenes en intervalos de 5 o 3 segundos.. usando un programa de adquisición de datos incluido en el equipo. Las señales de calcio son presentadas como valores F/F_0 , donde F es la fluorescencia experimental y F_0 la fluorescencia basal. Los datos

presentados fueron normalizados con respecto al valor promedio de la basal de fluorescencia (promedio de aprox. 3 minutos). La fluorescencia máxima fue alcanzada después de la adición de un ionóforo de calcio, como ionomicina o A23187 (100 mg/mL o 200 mg/mL, respectivamente). En todos los casos, los tratamientos no saturaron la sonda. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

2.15 Detección de citoquinas

Las citoquinas IL-1 β , IL-6; TNF- α fueron detectadas mediante ELISA (Cat N° RLB00 para IL-1 β , Cat N° R6000B para IL-6, Cat N° RTA00 para TNF α ; R&D systems) desde los sobrenadantes de cultivos de astrocitos con y sin tratamiento con 0,5 μ M de A β Os durante 24 horas en medio neurobasal con B27, según instrucciones del fabricante. En resumen se agregó 50 μ L del diluyente, luego se adicionó 50 μ L del sobrenadante de los cultivos de astrocitos (MCA^{+A β Os} o MCA^{Control}) y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó con 400 μ L de buffer de lavado (4 veces), se agregó 100 μ L de la citoquina de interés conjugada y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Después se hicieron 4 lavados con el buffer de lavado y se agregó 100 μ L de la solución sustrato y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se protegió de la luz y luego se adicionó 100 μ L de solución de detención. Se determinó la densidad óptica dentro de los primeros 30 minutos a 450 nm.

2.16 Viabilidad celular. Ensayo MTT

Cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron sembrados en placas p96 (0,5 x 10⁵ células/pocillo) y se mantuvieron con medio neurobasal suplementado con B27. Al

DIV6 las células fueron infectadas con los adenovirus como se menciona en la siguiente sección. A las 48 horas post-transducción, la viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) como previamente descrito (Aguirre et al., 2017; Paula-Lima et al., 2011), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto formazán se detectó mediante un espectrofotómetro (Biotek) a una absorbancia de 570 nm.

2.17 Transducción de los cultivos primarios usando los adenovirus CAIN y calcineurina constitutivamente activa (CN)

Cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron sembrados en cubreobjetos de 12 mm en placas p24 (2×10^5 células/pocillo) o en placas p6 (1×10^6 células/pocillo). Al DIV6, a las células se les quitó el medio y se les agregó medio neurobasal sin B27, precalentado. Luego, las células fueron infectadas con 1.000 partículas virales/célula (MOI 1000) durante 8 horas a 37°C. Los virus fueron diluidos en buffer de dilución de virus (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, Sacarosa 5%) y se agregó: 30 µL de adenovirus a los pocillos p96, 70 µL de virus a los pocillos p24 y 300 µL a los pocillos p6. Al término de la transducción se agregó una mezcla de 2/3 del medio antiguo (neurobasal/B27) y 1/3 de neurobasal/B27 nuevo. El control negativo consistió en agregar igual volumen de buffer de dilución de virus por 8 horas. El MCA^{+AβOs} o el MCA^{Control} fueron agregados por 24 h y luego se procedió a la fijación. Todos los experimentos fueron replicados al menos 3 veces.

2.17.1 Medición de la eficiencia de la transducción de los adenovirus (Ad-LacZ)

La transferencia génica y expresión de la proteína reportera fueron detectadas por la presencia de la proteína β -galactosidasa, como se describe en (Parry et al., 1998). En breve, las células fueron lavadas con PBS a las 24 horas después de la infección viral y fueron fijadas con glutaraldehído al 0,5% por 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS por 10 minutos y teñidas con una solución que contenía X-gal. La solución de teñido contenía: $MgCl_2$ 1 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, ferrocianuro de potasio 5 mM y X-gal 1mg/mL en PBS, pH 7.4. Las células fueron incubadas con la solución de X-gal por 20 horas a 37°C. La eficiencia de transducción fue determinada contando el número de células teñidas de azul por 100 células, bajo microscopía de contraste de fase.

2.17.2 Verificación de la actividad de calcineurina: NFATc4 y RCAN1

Dado que los adenovirus Ad-CAIN y Ad-CN no poseen una secuencia génica que permita identificar las células transducidas, tal como GFP o β -galactosidasa, se tuvo que verificar la actividad de calcineurina a través de su inhibidor endógeno llamado RCAN1 y con NFATc4. Cuando la actividad de calcineurina aumenta: 1) se produce un aumento de la proteína RCAN1 y 2) se favorece la translocación del factor de transcripción NFAT al núcleo. NFAT es un factor de transcripción altamente fosforilado (Okamura et al., 2000), NFATc4 es una de las principales isoformas presentes en las neuronas, que transloca al núcleo en respuesta a la desfosforilación mediada por calcineurina. Como control positivo, se usó KCl 50 mM por 30 minutos para reducir la inactivación de la entrada de calcio por los canales dependientes de voltage (Ulrich et

al., 2012). La detección de RCAN1 se realizó por western blot y la traslocación de NFATc4 se identificó mediante inmunocitoquímica, tal como se describió anteriormente (Lobos et al., 2016).

2.18 Detección de caspasa-3 activada y ensayo de TUNEL

La caspasa-3 activada es uno de los principales “ejecutores” de la apoptosis y puede ser detectada mediante inmunocitoquímica utilizando un adecuado anticuerpo primario. La activación de la caspasa-3 requiere el procesamiento proteolítico de su zimógeno inactivo en los fragmentos p17 y p12. La escisión de la caspasa-3 requiere ácido aspártico en la posición P1 (Nicholson et al., 1995). El anticuerpo primario que se utilizó en esta tesis detecta niveles endógenos del fragmento largo (17/19 kDa) de la caspasa-3, resultado de un clivaje adyacente al residuo Asp175 (CST, #9661), el cual no reconoce la caspasa-3 sin clivar ni otras caspasas clivadas. Cultivos neuronales pobres en astrocitos (DIV 7) fueron tratados con MCA^{Control}, MCA^{+AβOs}, NMDA (50 o 100 μM) o co-incubación de NMDA con el MCA^{+AβOs}. El NMDA a esas concentraciones es excitotóxico (Beaman-Hall et al., 1998; Dugan et al., 1995). Como control positivo de apoptosis se usó taspigargina. El procedimiento de inmunocitoquímica se realizó tal como se describió antes. Para detectar la presencia de núcleos apoptóticos en los cultivos neuronales pobres en astrocitos, se utilizó el kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Código G3250, Promega). El ensayo TUNEL consiste en la incorporación del nucleótido dUTP-12-fluoresceína en el terminal 3' del ADN usando la enzima recombinante deoxinucleotidil terminal transferasa (rTdT). El ADN marcado con dUTP-12-fluoresceína se visualiza mediante microscopía de fluorescencia o citometría

de flujo. Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% en PBS (pH 7,4) por 25 minutos a 4°C, luego se realizaron 2 lavados con PBS, se permeabilizó con Tritón X-100 0,2% en PBS por 5 minutos y se hicieron 2 lavados con PBS a temperatura ambiente. Los cubreobjetos (12 mm) fueron trasladados a una cámara húmeda (cubierta con papel metálico) y se les agregó 50 µL de buffer de equilibrio a temperatura ambiente por 5-10 minutos. Mientras tanto, se preparó el buffer de incubación (50 µL por muestra), cuya composición para una muestra es la siguiente: 45 µL de buffer de equilibrio, 5 µL de la mezcla de nucleótidos y 1 µL de la enzima rTdT. La enzima rTdT y la mezcla de nucleótidos siempre deben mantenerse en hielo y protegidas de la luz. Luego, se agregó 50 µL del buffer de incubación y se colocaron plásticos rectangulares sobre los cubreobjetos para 1) asegurar que el buffer de incubación cubra toda la superficie del cubreobjetos y 2) evitar la evaporación del buffer. Se agregó papel empapado con agua en la cámara húmeda y las muestras se incubaron a 37°C por 1 hora. La reacción finalizó al absorber con papel el buffer de incubación y después agregar buffer SSC 2X por 15 minutos. Luego los cubreobjetos fueron lavados con PBS (3 veces) a temperatura ambiente, para eliminar el nucleótido 12-dUTP-fluoresceína no incorporado. Finalmente, se agregó DAPI (1:10.000) en una solución de PBS, para teñir el número total de núcleos, por 15 minutos en oscuridad. Las muestras fueron guardadas a 4°C hasta la observación en el microscopio. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 710 usando el objetivo de inmersión en aceite 63x. Se fotografiaron campos amplios de 50 células aproximadamente, 12 fotos por cada condición experimental. Los núcleos apoptóticos se identificaron usando el láser 488 y los núcleos totales usando el láser 405. El programa Image J fue usado para el análisis de imágenes.

2.19 Análisis estadístico

Todos los datos presentados son representativos de 3 o más experimentos independientes. El test de Shapiro-Wilk fue usado para la determinación de la distribución normal de los replicados. ANOVA de 1 vía con post-test Bonferroni o t-test fueron utilizados para establecer las diferencias estadísticas en los valores promedios, entre las diferentes condiciones experimentales. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1 Modelo experimental

Tres tipos de cultivo primario fueron utilizados para desarrollar los objetivos de esta tesis: un cultivo primario de neuronas hipocampales de rata rico en astrocitos (sin tratamiento con AraC) o pobre en astrocitos (tratado con AraC), y cultivo de astrocitos de corteza de ratas neonatas (Figura 1).

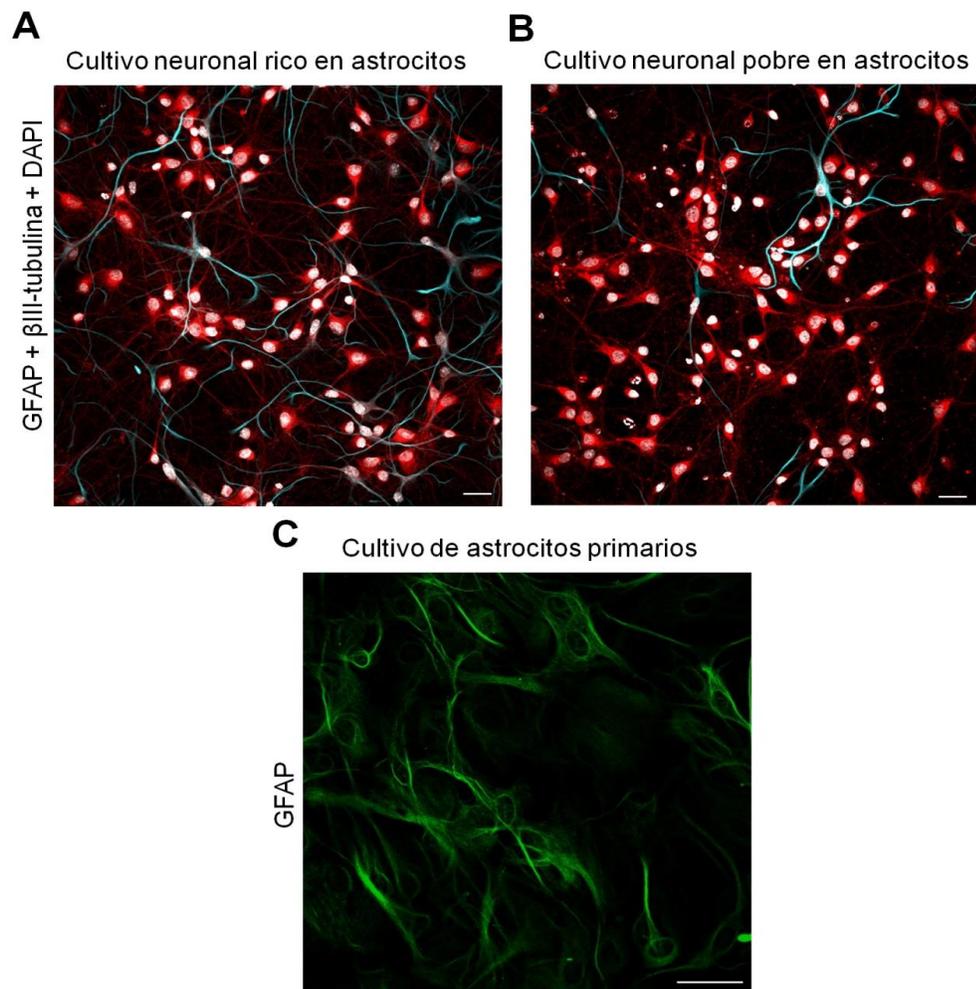


Figura 1. Caracterización de los cultivos primarios de rata utilizados. Inmunocitoquímica de un cultivo primario de hipocampo teñido contra el marcador neuronal β III-tubulina en rojo, el marcador astrocítico GFAP en celeste y los núcleos teñidos con DAPI en blanco. Barra: 20 μ m. (A), cultivos neuronales ricos en astrocitos

(sin AraC), **(B)** cultivos neuronales pobres en astrocitos (con AraC), **(C)** cultivo primario de astrocitos marcados con GFAP en verde. Barra 50 μm .

El AraC (1-b-D arabinofuranosil citosina) es un clásico inhibidor de la proliferación glial, que se agrega al cultivo después de sembrar las células y se retira a las 24 horas desde su aplicación. En los cultivos neuronales se evaluó el porcentaje de neuronas y astrocitos, evidenciándose que el AraC produce una disminución notoria de la cantidad de astrocitos del cultivo primario, generando un cultivo altamente enriquecido en neuronas (Figura 1B). El cultivo primario rico en astrocitos posee un $88,1 \pm 1,1\%$ de neuronas y un $11,9 \pm 1,1\%$ de astrocitos mientras que el cultivo primario pobre en astrocitos tiene un $96,0 \pm 1,3\%$ de neuronas y sólo un $4,0 \pm 1,3\%$ de astrocitos (Figura 1 A y B). El cultivo de astrocitos primarios se caracterizó con el clásico marcador astrocítico llamado proteína fibrilar acídica glial (GFAP) (Figura 1C). GFAP es una proteína fibrilar que es parte del citoesqueleto de los astrocitos, por lo que entrega información sobre la morfología de éstas células

3.1.1 Caracterización de la preparación de oligómeros del péptido β -amiloide

Dado que existe diversa literatura acerca de la toxicidad de los oligómeros del péptido β -amiloide ($A\beta$ Os) en forma dependiente de la conformación de sus agregados, fue necesario realizar una caracterización de la composición oligomérica de nuestra preparación, mediante western blot en geles de tris-tricina de tres fases y microscopía electrónica, para descartar la presencia de fibrillas. Ambos experimentos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Nivaldo Inestroza, de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

La composición de nuestras preparaciones de oligómeros del péptido β -amiloide ($A\beta$ Os), utilizadas hasta 48 horas post-preparación, incluyeron diversas especies oligoméricas, desde monómeros (1-mer) hasta oligómeros grandes (\cong 70-mer, Figura 2A). Sin embargo, las especies más abundantes fueron los oligómeros pequeños (monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros), tal como se muestra en la figura 2A. Entre los oligómeros grandes se distinguió la presencia de hexámeros (6-mers), nonámeros (9-mers) y dodecámeros (12-mers). Todas las especies oligoméricas identificadas han sido ligadas a los efectos tóxicos del péptido β -amiloide en la literatura (Benilova et al., 2012; Chen and Glabe, 2006; Hung et al., 2008; Klyubin et al., 2008; Lesne et al., 2006; O'Nuallain et al., 2011; Ono et al., 2009; Shankar et al., 2007; Shankar et al., 2008; Townsend et al., 2006). Adicionalmente, se realizó microscopía electrónica con tinción negativa de la preparación de oligómeros, la cual descartó la presencia de fibrillas del péptido β -amiloide en la preparación y permitió visualizar diversas estructuras oligoméricas (Figura 2B).

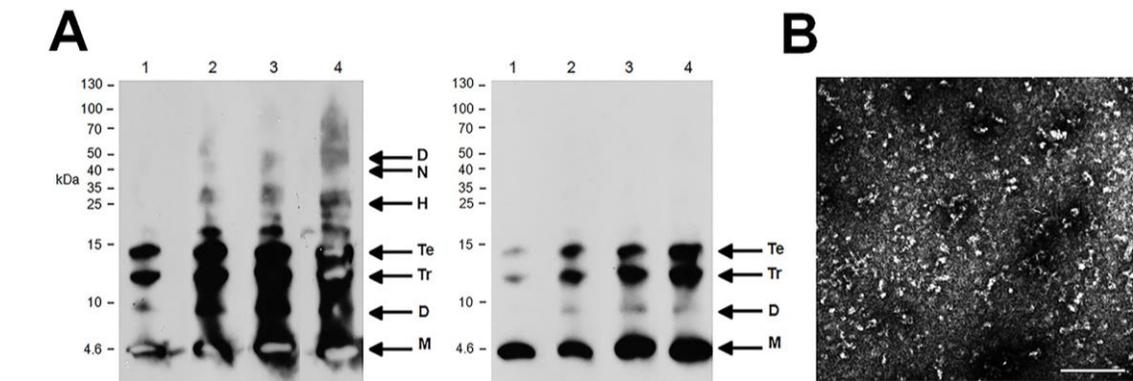


Figura 2. Caracterización de la preparación de oligómeros del péptido β -amiloide ($A\beta$ Os). (A), Composición de oligómeros del péptido β -amiloide analizada mediante Western blot. La sobreexposición de la placa (izquierda) muestra los oligómeros totales mientras que una menor exposición de la placa (derecha) discrimina sólo oligómeros pequeños, los cuales se encuentran en mayor abundancia. Las bandas 1, 2, 3 y 4 reflejan concentraciones crecientes de $A\beta$ Os: 0,2, 0,4, 0,6 y 0,8 μ g, respectivamente. M, monómero; D, dímero; Tr, trímero; Te, tetrámero; H, hexámero; N, nonámeros; D, dodecámero. (B), Microscopía electrónica con tinción negativa de la preparación de

A β O_s. La tinción descarta la presencia de fibrillas en la muestra. Barra: 100 nm.

La presencia de múltiples formas oligoméricas en la preparación asegura un efecto sinaptotóxico para las neuronas en cultivo in vitro, como previamente fue descrito en nuestro equipo de trabajo (Paula-Lima et al., 2011).

3.2 La distribución nuclear/citoplasmática de pSer-STAT3, pero no de pTyr-STAT3, es afectada por los oligómeros del péptido β -amiloide

Ya que la generación de A β O_s causa disfunción neuronal en modelos animales y en pacientes de la EA y STAT3 es un importante factor de transcripción involucrado en la sobrevivencia neuronal en condiciones patológicas, en esta tesis se examinó en primera instancia si los A β O_s afectan la distribución de STAT3 o de sus variantes fosforiladas: pSer-STAT3 y pTyr-STAT3.

El tratamiento de cultivos neuronales ricos en astrocitos (DIV 7, los cuales contienen un 12% de astrocitos) con una concentración de A β O_s 0,5 μ M (Forny-Germano et al., 2014; Paula-Lima et al., 2011), gatilló una significativa depleción nuclear de pSer-STAT3 (tinción verde) en las neuronas, identificadas por la tinción positiva contra β III-tubulina (Figura 3A y 3D). En contraste, el tratamiento con 0,5 μ M de A β O_s no afectó la marca nuclear de pTyr-STAT3 (Figuras 3B y 3E) o la de STAT3 total (Figuras 3C y 3F). La pTyr-STAT3 ha sido asociada a la clásica actividad transcripcional mediada por citoquinas de la familia de la IL-6 (Hirano et al., 2000; Takeda and Akira, 2000), mientras que pSer-STAT3 actúa como un modulador de la actividad transcripcional de STAT3 (Fu et al., 2004; Schuringa et al., 2001; Shen et al., 2004; Wen et al., 1995),

activada principalmente por factores tróficos (Decker and Kovarik, 2000; Wen et al., 1995). Recientemente, se ha evidenciado que pSer-STAT3 posee actividad transcripcional independiente de la fosforilación en el residuo tirosina 705 (Koo et al., 2014).

Además, la depleción de la marca nuclear de pSer-STAT3 inducida por los A β O_s en cultivos ricos en astrocitos ocurrió en un rango de concentración de 0,2-0,5 μ M y este efecto inhibitorio disminuyó en el rango 1-5 μ M de A β O_s (Figura 4). Este resultado es concordante con experimentos previos realizados en el laboratorio, donde los A β O_s a una concentración de 0,5 μ M produjeron el mayor efecto tóxico en las neuronas (Paula-Lima et al., 2011). Concentraciones de 1 a 5 μ M de A β O_s inducen una leve disminución nuclear de pSer-STAT3, con una predominante marca nuclear similar a la situación control. Es posible que los oligómeros a una alta concentración se agreguen más rápido formando fibrillas, lo cual disminuye la disponibilidad de oligómeros pequeños en el espacio extracelular, generando un efecto menos tóxico (Bernstein et al., 2009; Garai and Frieden, 2013; Podlisny et al., 1995). Esta explicación concuerda con estudios recientes que han descrito que las protofibrillas y las fibrillas insolubles son menos neurotóxicas que los oligómeros solubles y que éstos últimos, en presencia de núcleos de agregación de A β (dímeros-trímeros-tetrámeros) generan protofibrillas (Bieschke et al., 2011; Garai and Frieden, 2013; Tsigelny et al., 2014).

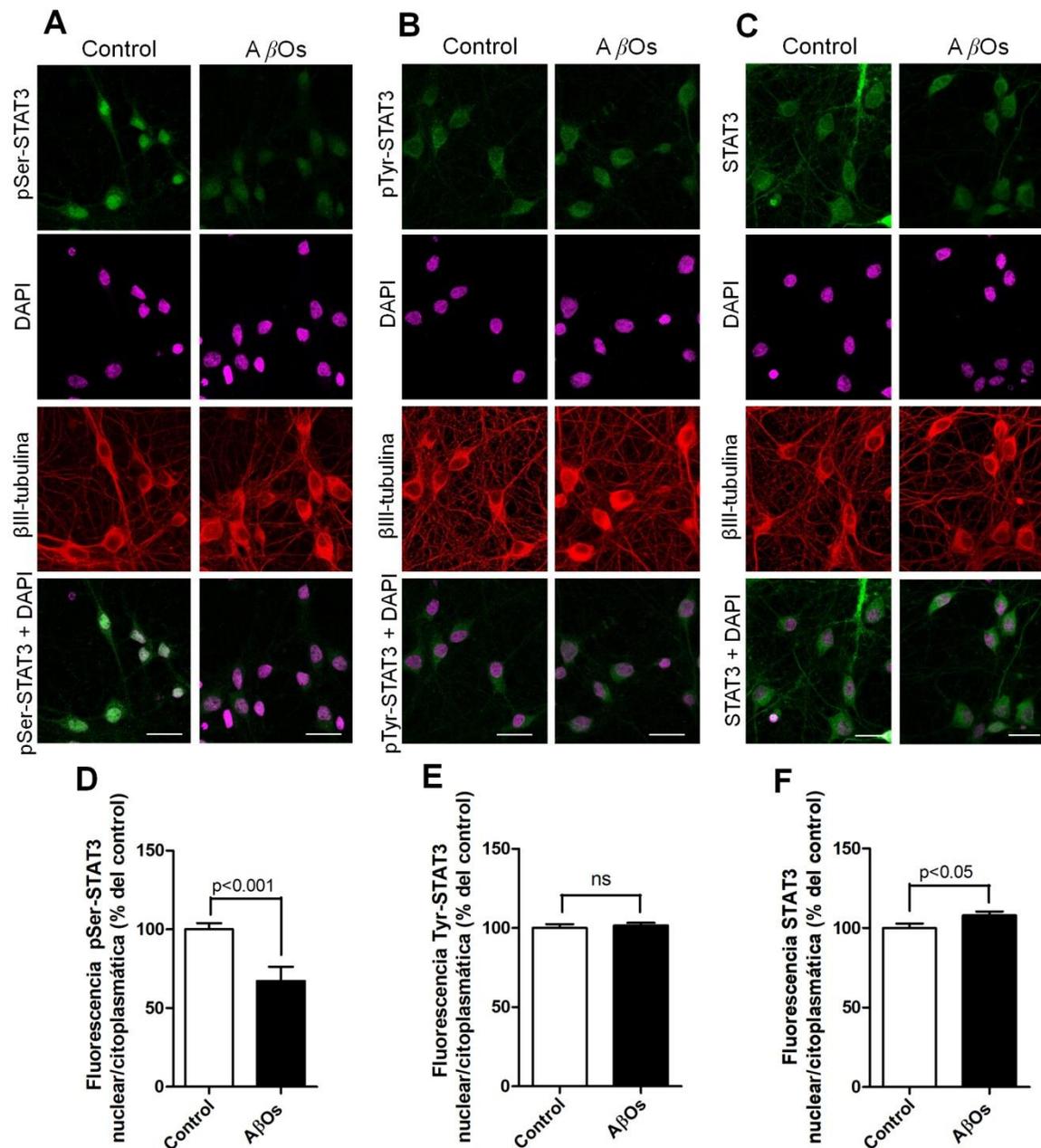


Figura 3. Los AβOs inducen una disminución de la marca nuclear de pSer-STAT3, pero no de pTyr-STAT3 o STAT3, en cultivos neuronales ricos en astrocitos. Paneles superiores: inmunotinción mostrando la distribución neuronal de pSer-STAT3 (A), pTyr-STAT3 (B) y STAT3 (C) en células no tratadas y después del tratamiento con AβOs 0,5 μM por 24 horas. La Beta-III tubulina (rojo) fue usada como marcador neuronal y el DAPI (magenta) como marcador nuclear. Cuantificación de la razón de inmunofluorescencia en el núcleo y citoplasma de pSer-STAT3 (D), pTyr-STAT3 (E) y STAT3 (F). Barra de escala: 20 μm. Los valores representan el promedio ± SEM de tres experimentos independientes, con 100 células evaluadas por cada condición

experimental. La significancia de las diferencias fue determinada por el t-test; ns, no significativo comparado con la condición control.

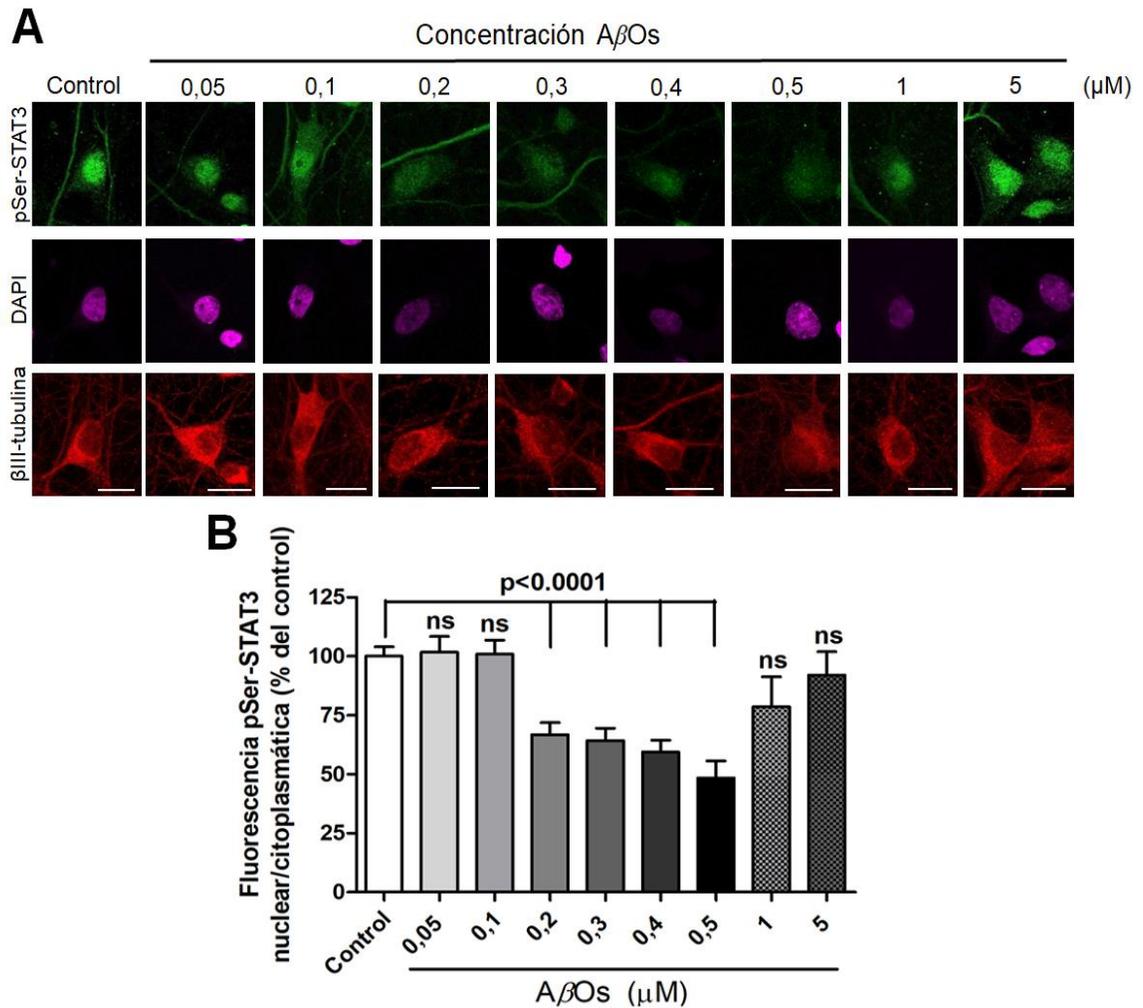


Figura 4. Efectos de dosis-respuesta de los A β O en la marca nuclear de pSer-STAT3. (A), Imágenes representativas de cultivos neuronales ricos en astrocitos incubados con diferentes concentraciones de A β O por 24 horas. La marca de pSer-STAT3 se observa en verde, β III tubulina fue usado como marcador neuronal (rojo) y DAPI como marcador nuclear (magenta). Barra de escala: 10 μ m. (B), Cuantificación de la inmunofluorescencia del núcleo y el citoplasma de pSer-STAT3 inducida con distintas concentraciones de A β O. Los valores representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes, con 100 células evaluadas por cada condición experimental. La significancia de las diferencias fue determinada por el test ANOVA 1 vía seguido del post-test Bonferroni; ns, no significativo comparado con la condición control.

3.3 Astrocitos median la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por los A β O s

Para determinar si los astrocitos reactivos juegan un rol crítico en la depleción nuclear de pSer-STAT3 producida por los A β O s , realizamos experimentos en paralelo en cultivos neuronales ricos y pobres en astrocitos. Para generar los cultivos neuronales pobres en astrocitos, incubamos los cultivos mixtos con AraC 1,5 μ M por 24 horas. El AraC es un conocido inhibidor de la proliferación glial y en estos cultivos disminuyó el porcentaje de astrocitos desde 12% (sin AraC) a 4% (con AraC), Figura 1A y B. El tratamiento con los A β O s (0,5 μ M) disminuyó significativamente la señal nuclear de pSer-STAT3 neuronal comparado con el medio control (67,18% vs 100,02%, respectivamente) en cultivos neuronales ricos en astrocitos (Figura 5A y 5C). Sin embargo, en cultivos neuronales pobres en astrocitos los A β O s no afectaron la marca nuclear de pSer-STAT3 comparado con el medio control (110,25% vs. 100,08%, respectivamente, Figura 5B y 5D).

Como segunda aproximación, a cultivos primarios de astrocitos se les agregó 1 dosis o 3 dosis de A β O s , en donde cada dosis correspondió a una concentración de 0,5 μ M por 24 horas y luego ese medio condicionado de astrocitos (MCA^{+A β O s}) fue colectado, agregado a cultivos neuronales pobres en astrocitos por 24 horas y posteriormente se realizó la inmunocitoquímica contra pSer-STAT3. El MCA^{+A β O s} colectado de aquellos astrocitos tratados con 3 dosis de A β O s produjo una disminución mayor de la marca nuclear de pSer-STAT3 neuronal comparado con el medio condicionado resultante del tratamiento con 1 dosis de A β O s (Figura 5E y 5F). Es importante notar que el efecto del medio condicionado en los cultivos neuronales pobres en astrocitos fue menor que el efecto de los A β O s en un medio rico en astrocitos.

Esos resultados combinados, más el dato presentado en la Figura 3, sugieren que la depleción nuclear de la proteína pSer-STAT3 en neuronas causada por los A β Os requiere la presencia de los astrocitos.

Ya que hay evidencia que los astrocitos se vuelven reactivos en presencia de los A β Os, como un control interno se evaluó si nuestra preparación de A β Os inducía reactividad en los astrocitos primarios, a través del aumento de expresión de marcadores de reactividad. Para ello, cultivos neuronales ricos en astrocitos fueron tratados con 1 dosis o 3 dosis de A β Os, en donde cada dosis fue de 0,5 μ M por 24 horas. La reactividad astrocítica se evaluó con dos marcadores: la proteína fibrilar astrocítica acidica GFAP y STAT3, ya que ambos son considerados proteínas claves en la reactividad de los astrocitos en diversas condiciones patológicas (Ben Haim et al., 2015; Hol and Pekny, 2015; Li et al., 2011; Liu et al., 2013; Nobuta et al., 2012; O'Callaghan et al., 2014; Shibata et al., 2010; Shiratori-Hayashi et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2013). El resultado se muestra en la Figura 6.

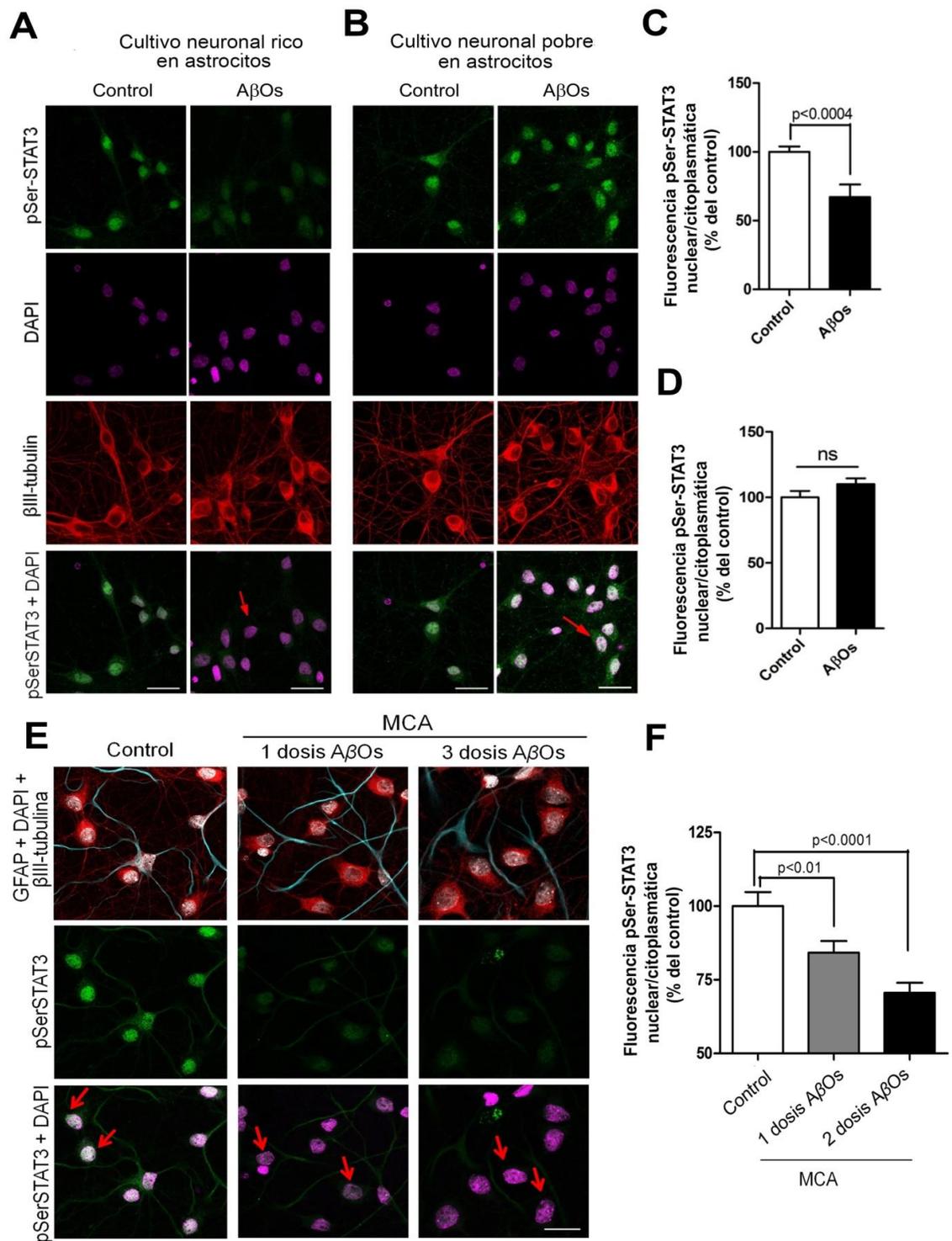


Figure 5. La depleción nuclear de la pSer-STAT3 neuronal inducida por A β Os en los cultivos neuronales mixtos depende de los astrocitos. Localización celular de pSer-STAT3 (verde) después de la adición de A β Os 0,5 μ M por 24 horas en cultivos neuronales ricos (A) y pobres (B) en astrocitos. β III-tubulina (rojo) se usó como

marcador neuronal y DAPI (magenta) como marcador nuclear. Barra de escala: 20 μm . (C) y (D) Cuantificación de pSer-STAT3 neuronal en el núcleo y citoplasma de los experimentos mostrados en (A) y (B), respectivamente. Los valores representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes, con 100 células evaluadas por cada condición experimental. La significancia de las diferencias fue determinada por t-test; ns, no significativo comparado con la condición control. (E), Imágenes representativas de cultivos neuronales pobres en astrocitos a los cuales se les agregó medio condicionado de astrocitos previamente tratados con 1 o 3 dosis de A β Os. La marca neuronal se observa con β III-tubulina (rojo), el marcador astrocítico GFAP (cyan) y DAPI (blanco). En el segundo panel pSer-STAT3 se observa en verde y DAPI en magenta. Barra de escala: 20 μm . (F) Cuantificación de la razón de inmunofluorescencia del núcleo y el citoplasma de pSer-STAT3 neuronal del experimento mostrado en (E). Los valores representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes, con 100 células evaluadas por cada condición experimental. La significancia de las diferencias fue determinada por el ANOVA de 1 vía.

En la condición control, GFAP se encuentra principalmente en el citoplasma y en las prolongaciones de los astrocitos y STAT3 se ubica principalmente en el núcleo y en las prolongaciones. La aplicación de dosis crecientes de A β Os generó aumentos de GFAP en el cuerpo celular de astrocitos y en el extremo distal de sus prolongaciones, mientras que STAT3 se acumuló predominantemente en el núcleo de los astrocitos. Esta translocación de STAT3 al núcleo tras el tratamiento con los A β Os concuerda con evidencias que muestran que hay un aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias que son blanco de STAT3, como IL-6, tras la aplicación exógena de A β (Ben Haim et al., 2015; Carrero et al., 2012; White et al., 2005). Por lo tanto, nuestra preparación de A β Os produce reactividad en los astrocitos primarios tal como se ha descrito anteriormente en la literatura.

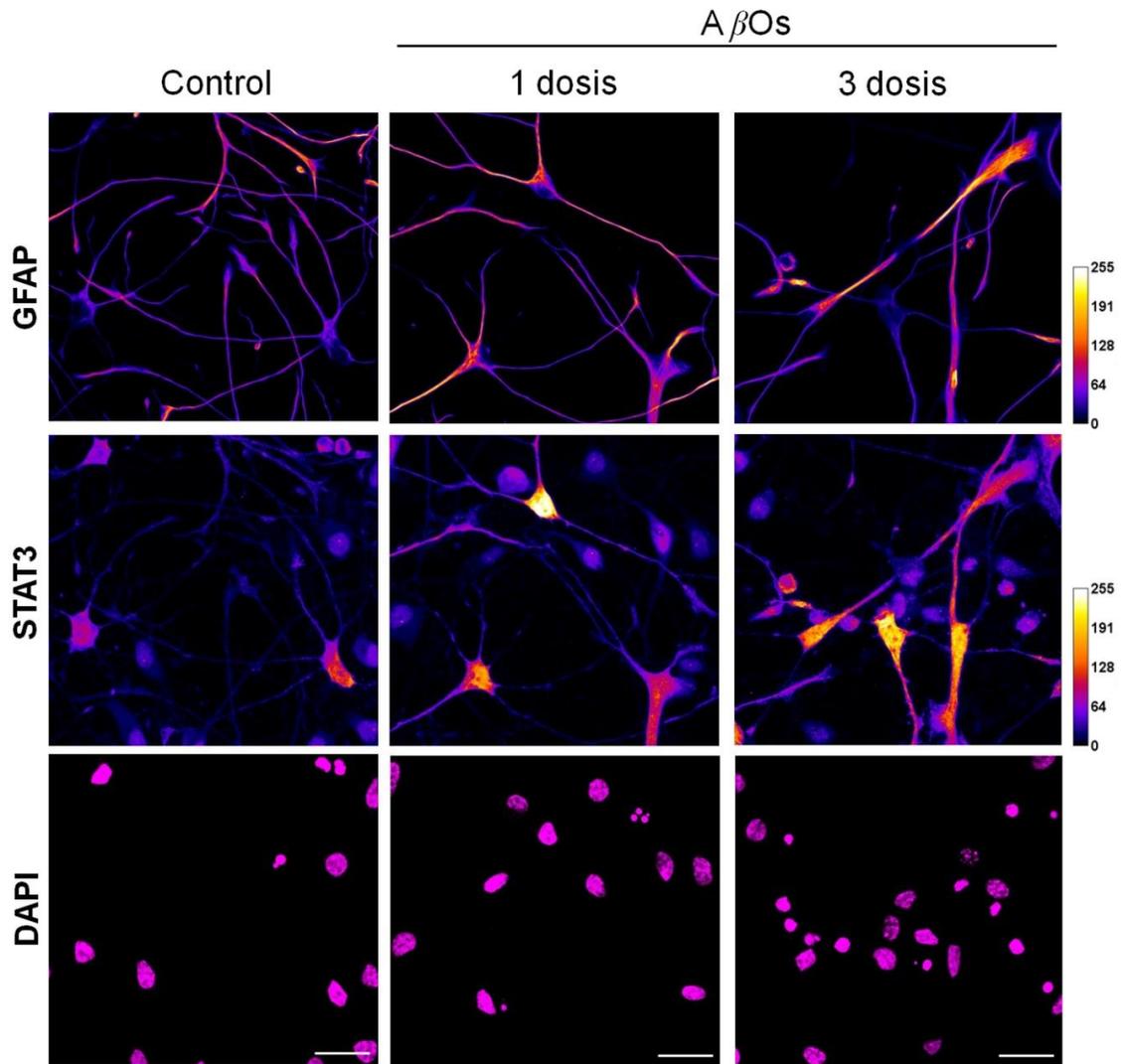


Figure 6. Los astrocitos de los cultivos neuronales se vuelven reactivos en presencia de los $A\beta$ Os. Localización celular de GFAP y STAT3 después de la adición de 1 o 3 dosis de $A\beta$ Os 0,5 μ M por 24 horas (en cada dosis) en cultivos neuronales ricos en astrocitos. GFAP fue usado como un marcador astrocítico, STAT3 fue usado como un marcador de reactividad y DAPI (magenta) como marcador nuclear. Barra de escala: 20 μ m. La intensidad de fluorescencia de GFAP y STAT3 fue transformada en una escala térmica con el programa Image J, en donde los cambios del azul al blanco indican aumento en la señal de fluorescencia (barra a la derecha de cada panel).

3.4 Cultivos neuronales pobres en astrocitos tratados con A β O_s no modifican los niveles de pSer-STAT3, STAT3 ni los niveles del ARNm de STAT3

Para explorar el putativo rol de los astrocitos en la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas, examinamos los efectos de los A β O_s sobre los niveles de la proteína y del ARNm de STAT3 en cultivos neuronales pobres en astrocitos. Dado que STAT3 se expresa en neuronas y en astrocitos, el uso de AraC fue fundamental para disminuir la contribución de STAT3 astrocítica en las muestras.

El tratamiento de los cultivos neuronales pobres en astrocitos con A β O_s 0,5 μ M por 24 horas no modificó de forma significativa la fosforilación del residuo 727 de STAT3 (Figura 7A y 7B) ni STAT3 total (Figuras 7C). La neurotrofina NGF produce un significativo aumento en la fosforilación del residuo serina 727 sin afectar los niveles de la proteína STAT3, tal como se había reportado anteriormente (Pellegrino and Habecker, 2013).

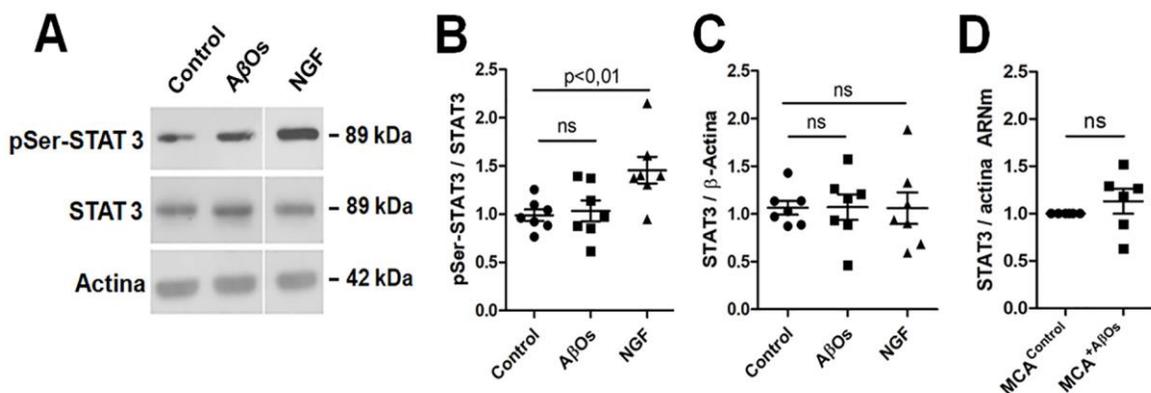


Figura 7. Los A β O_s no afectan la fosforilación de Serina 727, los niveles de la proteína o del ARNm de STAT3 en cultivos neuronales pobres en astrocitos. (A), Las proteínas pSerSTAT3, STAT3 and β -actina fueron identificadas por western blot en cultivos neuronales pobres en astrocitos. El NGF fue usado como un inductor de pSer-

STAT3 (control positivo). **(B)**, Cuantificación densitométrica de la razón pSer-STAT3/STAT3 y **(C)** cuantificación de la razón STAT3/ β -actina después del tratamiento con A β Os por 24 horas. Los datos son presentados como veces de cambio comparados con el nivel basal. Los valores representan el promedio \pm SEM. La significancia entre las diferencias en **(B)** y **(C)** fue determinada por ANOVA de 1 vía seguido del post-test Bonferroni (n = 7). **(D)**, Determinación de los niveles de ARNm de STAT3 tras el tratamiento con el medio condicionado de astrocitos (MCA^{+A β Os}). Cuantificación de la razón STAT3/ β -actina después del tratamiento con MCA^{+A β Os} por 24 horas. Los datos son presentados como veces de cambio comparados con el nivel basal. Los valores representan el promedio \pm SEM. La significancia fue determinada por t-test (n = 6).

3.5 El tratamiento de cultivos neuronales pobres en astrocitos con medio condicionado de astrocitos (MCA^{+A β Os}) indujo la depleción nuclear de pSer-STAT3

Para probar si los astrocitos secretan factores que promueven la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas, cultivos de astrocitos primarios fueron estimulados con A β Os 0,5 μ M por 24 horas y el sobrenadante, el cual es un medio condicionado de astrocitos que llamaremos de ahora en adelante MCA^{+A β Os}, fue colectado y utilizado para testear sus efectos en cultivos neuronales pobres en astrocitos.

La adición del MCA^{+A β Os} a los cultivos neuronales pobres en astrocitos no modificó los niveles de ARNm de STAT3 comparado con el medio condicionado control (MCA^{Control}) (Figura 7D). Sin embargo, el análisis de inmunofluorescencia de pSer-STAT3 en el núcleo y citoplasma después de la estimulación de cultivos neuronales ricos en astrocitos con A β Os, o cultivos neuronales pobres en astrocitos con MCA^{+A β Os} reveló una significativa disminución de la inmunotinción de pSer-STAT3 en ambos: núcleo y citoplasma (Figura 8A). Similarmente, la determinación de proteínas en núcleos y

citoplasma aislados mediante western blot, reveló que los niveles de proteína STAT3 estaban significativamente disminuidos en ambas fracciones (Figura 8B). La histona H1 fue utilizada como un control de carga nuclear y actina como un control de carga citoplasmático. Si bien actina es un clásico marcador citoplasmático cumpliendo roles esenciales en el citoesqueleto también ha sido ligada a varios procesos nucleares, tales como regulación de la expresión génica a través de factores de transcripción, la participación en complejos que regulan la cromatina y a las ARN polimerasas, y la organización del contenido nuclear para la mantención de la integridad genómica (Viita and Vartiainen, 2017; Virtanen and Vartiainen, 2017; Weston et al., 2012). Esto explica por que β -actina se visualiza en las fracciones nucleares y citoplasmáticas.

Entonces, aunque los cultivos neuronales pobres en astrocitos sean tratados con A β Os o con MCA^{+A β Os}, no se afectan los niveles del ARNm o de la proteína STAT3 (Figura 7). Sin embargo, la fluorescencia de la marca de pSer727-STAT3 disminuyó significativamente después del tratamiento con el MCA^{+A β Os}, demostrado tanto por inmunofluorescencia en cultivos ricos o pobres en astrocitos (Figura 8A), como por western blot, tras el análisis de las fracciones nucleares y citoplasmáticas de los cultivos pobres en astrocitos (Figura 8B). Esto sugiere fuertemente que existe un mecanismo asociado a la desfosforilación del residuo serina 727 de STAT3 relacionado a un mediador liberado por los astrocitos.

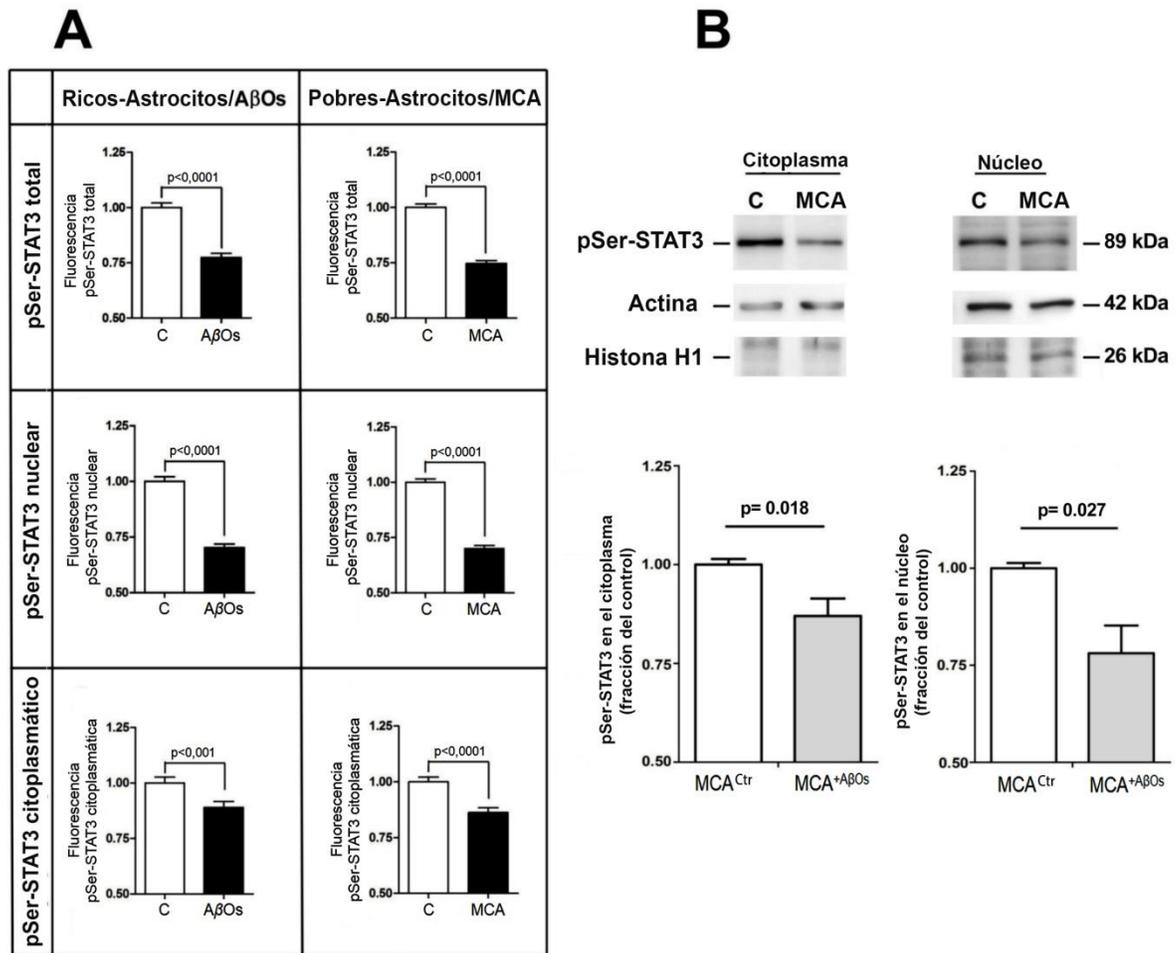


Figura 8. El tratamiento de cultivos ricos en astrocitos con A β O_s y cultivos pobres en astrocitos con MCA^{+A β O_s} induce defosforilación nuclear y citoplasmática de pSer-STAT3. (A) Cultivos neuronales ricos y pobres en astrocitos fueron tratados con A β O_s o con MCA (MCA^{+A β O_s}), respectivamente. C corresponde al medio control (panel izquierdo) y medio condicionado control (MCA^{Control}) en el panel de la derecha. La inmunotinción de pSer-STAT3 total, nuclear o citoplasmática fue cuantificada como se describe en la sección de Materiales y métodos. Un número promedio de 450-500 células fueron analizados por condición experimental. Los valores representan el promedio \pm SEM. La significancia entre las diferencias fue determinada por t-test. **(B)** Cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron tratados con C (MCA^{Control}) con MCA (MCA^{+A β O_s}). Las células fueron separadas en fracciones nucleares y citoplasmáticas y pSer-STAT3 fue determinado por western blot. Como control de carga se usó β -actina e histona H1 (H1) como un marcador para proteínas nucleares. Los valores del gráfico representan el promedio \pm SEM de 6 determinaciones independientes. La significancia entre los promedios fue evaluada por t-test.

3.6 Identificación de los posibles mediadores liberados tras la estimulación con los A β Os

Los astrocitos estimulados con A β Os, in vitro e in vivo, liberan ROS, citoquinas pro-inflamatorias y óxido nítrico (Abramov and Duchon, 2005; Wallace et al., 1997; White et al., 2005). Entonces, probamos si las ROS, las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF α o IL-1 β) o el óxido nítrico median la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas. Estos estudios fueron realizados a través del uso de enzimas neutralizadoras de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico, y de la medición de la producción y secreción de citoquinas pro-inflamatorias en el medio condicionado de astrocitos tras la estimulación con los A β Os.

Para determinar si los ROS median la distribución de pSer-STAT3, co-incubamos los cultivos ricos en astrocitos con A β Os 0,5 μ M y con la enzima catalasa (Cat, 50 UI/mL) por 24 horas. Se realizó el mismo experimento con la enzima superóxido dismutasa (SOD), sin embargo, mediante fluorimetría y utilizando el compuesto amplex Red $^{\circledR}$ se determinó que SOD poseía un 35% de actividad peroxidasa, por lo que estos datos se desestimaron en esta tesis. Debido a su gran tamaño, la catalasa no ingresa al interior de las células a menos que se las someta a una pre-depolarización (Saez et al., 1987), por lo tanto, se mantiene en el medio extracelular. La catalasa abolió de forma significativa la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por los A β Os (Figura 9A y 9B) llegando la señal nuclear de pSer-STAT3 a un nivel similar al observado en el control. Este ensayo no permite identificar la fuente de producción de peróxido, ya que astrocitos y neuronas expresan la NADPH oxidasa (NOX), la cual puede producir H₂O₂. El complejo NOX produce anión superóxido (O₂⁻) pero éste dismuta rápida y

espontáneamente a H_2O_2 , el cual es más estable y permea fácilmente la membrana celular.

El siguiente paso fue determinar si los $A\beta$ Os inducen en los astrocitos primarios un aumento de la producción de H_2O_2 que sea detectable en el medio condicionado de astrocitos. Para ello, el medio condicionado de astrocitos proveniente de astrocitos estimulados con $A\beta$ Os ($MCA^{+A\beta Os}$) o de astrocitos no estimulados con $A\beta$ Os ($MCA^{Control}$) fue recuperado y la concentración de H_2O_2 fue rápidamente determinada mediante el kit Amplex Red®. El ensayo se basa en la detección del peróxido de hidrógeno en una reacción que acopla una peroxidasa y el reactivo Amplex Red® (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazino), el cual es una sonda fluorescente altamente sensible y estable que reacciona con el H_2O_2 en una estequiometría 1:1, generando un producto de oxidación fluorescente llamado resorufina, el cual puede ser detectado en un fluorímetro.

Entonces, determinamos la concentración de peróxido de hidrógeno presente en el $MCA^{control}$ y en el $MCA^{+A\beta Os}$ (Figura 9C). El ensayo reveló que el $MCA^{+A\beta Os}$ posee aproximadamente 3 veces más peróxido de hidrógeno ($13,1 \mu M$) que el $MCA^{Control}$ ($4,9 \mu M$), evidenciando que existe una liberación basal de peróxido de hidrógeno al medio y que los $A\beta$ Os inducen un aumento de la liberación de peróxido de hidrógeno por los astrocitos.

Para dilucidar si el peróxido de hidrógeno promueve la depleción nuclear de pSer-STAT3, se aplicó de forma exógena peróxido de hidrógeno comercial a una concentración final de $50 \mu M$. El peróxido de hidrógeno indujo una disminución de la

marca nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas de forma similar al efecto que produce el MCA^{+AβOs} (Figura 9D), con un efecto mucho menor que el observado en cultivos neuronales ricos en astrocitos tratados con AβOs.

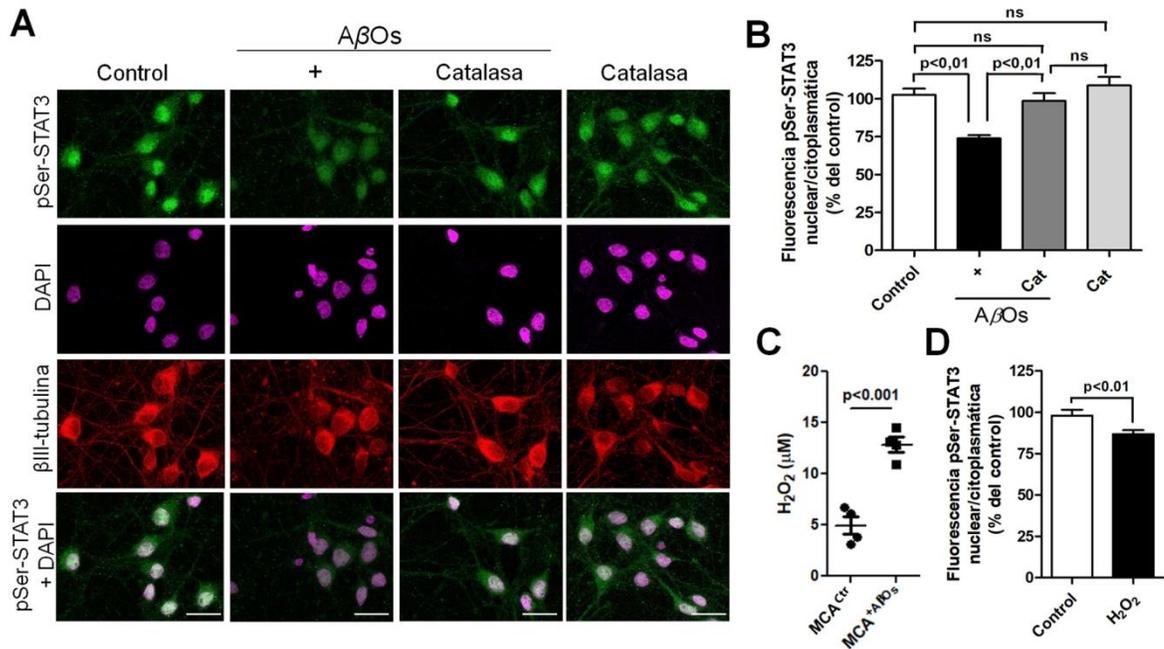


Figura 9. El peróxido de hidrógeno producto de la estimulación con los AβOs genera la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas. (A), Imágenes representativas de la co-incubación de cultivos neuronales ricos en astrocitos con AβOs y con catalasa (Cat), una enzima atrapadora de H₂O₂. Barra de escala: 20 μm. (B), Cuantificación de la razón de inmunofluorescencia de pSer-STAT3 en el núcleo y citoplasma después de la incubación con AβOs y en presencia de Cat. Los valores representan el promedio ± SEM de tres experimentos independientes, 100 células fueron analizadas por cada condición experimental. La significancia entre los promedios fue evaluada por ANOVA de 1 vía. (C) Cuantificación del peróxido de hidrógeno presente en el MCA^{Control} y en MCA^{+AβOs} usando el kit Amplex Red®. La significancia entre los promedios fue evaluada por t-test, en cuatro experimentos independientes. (D) Cuantificación de la inmunofluorescencia de pSer-STAT3 en el núcleo y en el citoplasma en cultivos neuronales pobres en astrocitos tratados con peróxido de hidrógeno 50 μM por 24 horas. Los valores representan el valor promedio ± SEM. La significancia entre los promedios fue evaluada por t-test.

Posteriormente, se evaluó la expresión y la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, TNF-α e IL-1β aumenta tras la incubación de astrocitos primarios

con A β Os. Para ello, cultivos primarios de astrocitos fueron estimulados con A β Os 0,5 μ M por 24 horas y luego el MCA^{+A β Os} y el MCA^{Control} (medio condicionado sin tratamiento con A β Os) fue colectado para analizar la secreción de las citoquinas mediante ELISA y los astrocitos fueron procesados inmediatamente para determinar los niveles de ARNm de las citoquinas pro-inflamatorias mediante qPCR.

Se observó que el tratamiento con los A β Os aumentó significativamente los niveles de ARNm de IL-6 y TNF- α (2,6 veces y 2,1 veces, respectivamente) en los astrocitos primarios (Figura 10A). No obstante, los A β Os no indujeron un aumento significativo de los niveles de mensajero de IL-1 β en los astrocitos primarios ($p < 0,0715$). Dado que IL-1 β es predominantemente expresada en microglías, este resultado era esperable.

Luego, mediante el ensayo ELISA, se analizó la secreción de estas citoquinas en el medio condicionado de astrocitos. Los medios MCA^{Control} y MCA^{+A β Os} fueron recolectados, centrifugados y los sobrenadantes utilizados para analizar la secreción de las citoquinas. Los astrocitos primarios secretaron basalmente 83,6 pg/mL de IL-6. El tratamiento con los A β Os incrementa este a 205,7 pg/mL ($p < 0,05$). Con respecto a TNF- α , la secreción basal fue 9,7 pg/mL y tras el tratamiento con los A β Os los niveles aumentaron a 11,1 pg/mL, el cual no fue un cambio significativo (ns, Figura 10B). En el caso de IL-1 β , no se observaron diferencias significativas en su secreción (83,8 pg/mL en el MCA^{Control} vs. 74,17 pg/mL en el MCA^{+A β Os}).

En resumen, los datos indican que los A β Os generan un fenotipo pro-inflamatorio en los astrocitos, aumentando la expresión de los ARN mensajeros de IL-6 y TNF- α pero sólo la secreción de IL-6 aumenta con este tratamiento.

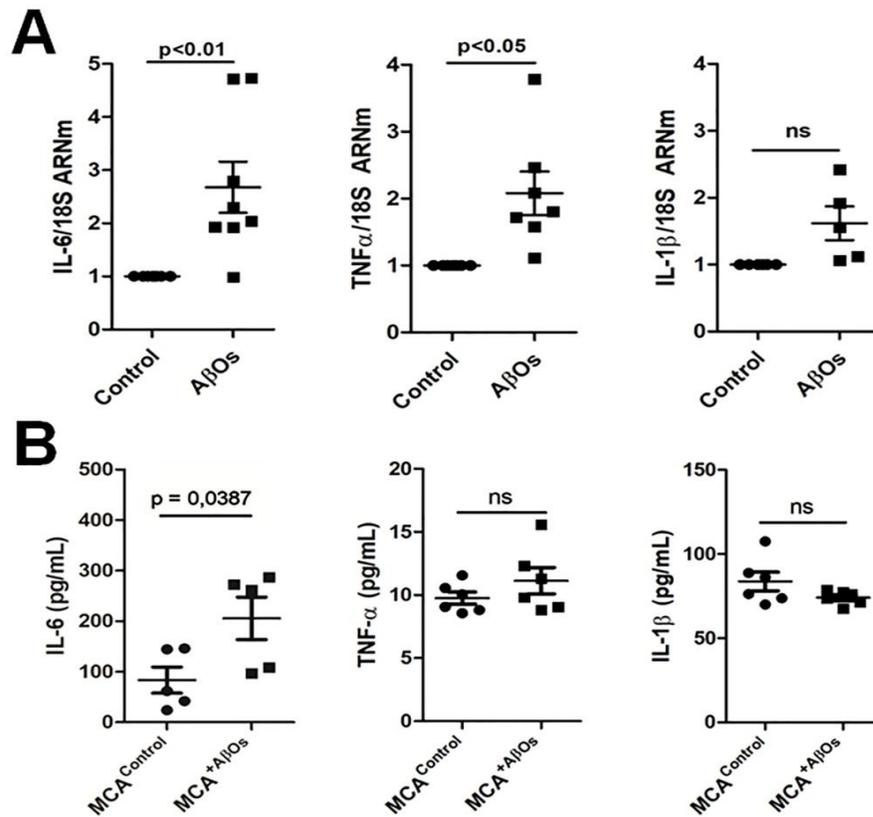


Figura 10. Los astrocitos estimulados con A β Os aumentan significativamente la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF α pero sólo IL-6 presenta un aumento en su secreción en el MCA^{+A β Os}. (A), Niveles de ARNm de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, TNF α e IL-1 β en cultivos de astrocitos primarios estimulados con A β Os cuantificados por RT-qPCR. Los niveles de ARNm fueron normalizados por los niveles del ARNm del 18S. Los valores representan el promedio \pm SEM de 5-7 experimentos independientes. La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por t-test. (B) Citoquinas secretadas por los astrocitos estimulados con los A β Os o con medio control medido por ELISA. Los valores representan el promedio \pm SEM de 6-7 experimentos independientes. La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por t-test.

La enzima productora de óxido nítrico, llamada óxido nítrico sintasa (NOS), está presente en el cerebro de los mamíferos en tres diferentes isoformas: 2 constitutivas (nNOS y eNOS) y una inducible (iNOS). Las tres están sobre-expresadas en la EA generando altos niveles de óxido nítrico (de la Monte and Bloch, 1997; Norris et al., 1996; Vodovotz et al., 1996; Yew et al., 1999). En muestras de cerebros de pacientes

con EA y del ratón transgénico APP23 hay un aumento de la iNOS en los astrocitos (Heneka et al., 2001; Luth et al., 2001; Wong et al., 2001).

Para examinar si hay un aumento de la producción de óxido nítrico tras el tratamiento con los A β O_s se usó hemoglobina, el cual es un potente neutralizador de óxido nítrico (Hindley et al., 1997). Al incubar cultivos neuronales ricos en astrocitos con A β O_s 0,5 μ M en la presencia o ausencia de 10 nM o 50 nM hemoglobina por 24 horas, se encontró que la hemoglobina produjo una protección parcial pero significativa contra el efecto de los A β O_s en la depleción nuclear de pSer-STAT3 (Figuras 11A y 11B).

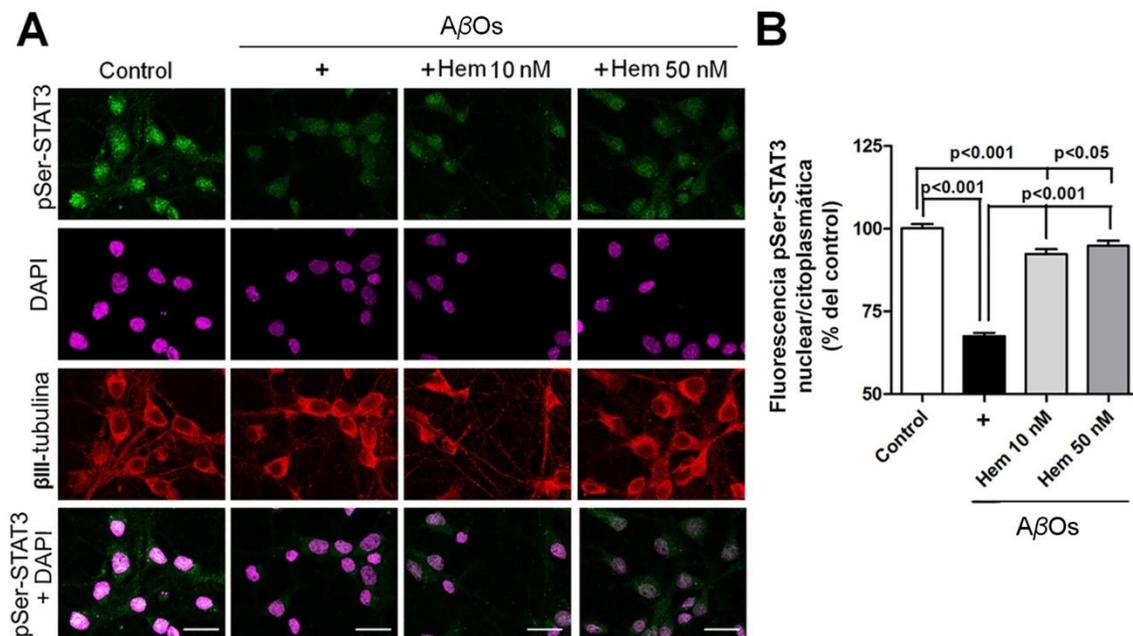


Figura 11. El óxido nítrico inducido por los A β O_s produce una depleción parcial de pSer-STAT3 en las neuronas. (A), Imágenes representativas de la co-incubación de cultivos neuronales ricos en astrocitos con A β O_s y la enzima neutralizadora de óxido nítrico, hemoglobina. Barra de escala: 20 μ m. (B), Cuantificación de la razón de inmunofluorescencia de pSer-STAT3 en el núcleo y citoplasma del experimento descrito en (A). Los valores representan el valor promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. La significancia de las diferencias fue determinada por ANOVA de 1 vía seguido del post-test Bonferroni.

Ya que la hemoglobina no generó una recuperación total de la señal nuclear de pSer-STAT3, este resultado sugiere que el óxido nítrico contribuye en menor medida que el peróxido de hidrógeno a los a los agentes oxidantes inducidos por el tratamiento con los A β Os. La recuperación parcial de la localización nuclear de pSer-STAT3 indica que existe otro componente, aparte del óxido nítrico, que genera una disminución de pSer-STAT3 en el núcleo.

En resumen, los resultados sugieren que los A β Os estimularon la producción de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico en los cultivos mixtos. Además, los A β Os indujeron en los astrocitos una mayor expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α a las 24 horas de tratamiento, aunque sólo la secreción de IL-6 aumentó en el MCA^{+A β Os}. Estos resultados concuerdan plenamente con lo descrito en la literatura, en donde la aplicación exógena de A β Os estimula la actividad de la NOX (en astrocitos y neuronas) e induce la expresión de la iNOS y la subsecuente producción de óxido nítrico.

3.7 El MCA^{+A β Os} aumenta el tono oxidativo neuronal

Los resultados anteriores sugirieron que posiblemente los ROS, IL-6 y óxido nítrico son los principales mediadores liberados por los astrocitos estimulados con los A β Os. Es sabido que ciertas citoquinas inducen la activación transcripcional del gen de la iNOs, generando un aumento del tono oxidativo (Grzybicki et al., 1996; Hewett and Hewett, 2012; Possel et al., 2000). Por esta razón, se evaluó si el MCA^{+A β Os} afecta el tono oxidativo en las neuronas. Para ello, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron tratados con el MCA^{Control} o con el MCA^{+A β Os} y el tono oxidativo neuronal fue medido

usando la técnica citoquímica redox, la cual permite detectar cambios en la oxidación de los grupos tioles de las proteínas en un rango fisiológico mediante el marcaje de las cisteínas reducidas y oxidadas con distintos fluoróforos. El tratamiento con el MCA^{+AβOs} produjo un aumento significativo en la oxidación de los grupos tioles de las proteínas de las neuronas comparado con el MCA^{control} (Figura 12A), sugiriendo un aumento del tono oxidativo de las neuronas. La oxidación fue determinada mediante la razón de los grupos tioles oxidados sobre los grupos tioles reducidos (Figura 12B).

La co-incubación de cultivos neuronales pobres en astrocitos con el MCA^{+AβOs} y con los agentes antioxidantes 3-Metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona (MCI-186, 50 μM), un atrapador de radicales libres; EUK-134 (20 μM), un mimético sintético de la Superóxido dismutasa/Catalasa; dimetil-tiourea (DMTU, 100 μM), un potente atrapador del radical hidroxilo; 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxipiperidina (Tempol, 1 mM), un mimético permeable de la superóxido dismutasa citosólica y etil galato (20 μM), un atrapador de peróxido de hidrógeno, disminuyó significativamente (en todos los casos) la oxidación neuronal inducida por el MCA^{+AβOs} (Figuras 12A y 12B). De notar, los antioxidantes por si solos no cambiaron los niveles de oxidación neuronal (Figura 12B), un indicativo que ellos contrarrestan las especies oxidantes dentro de las células producto de los mediadores presentes en el MCA^{+AβOs}. El pro-oxidante *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP, 5 μM), el cual es un oxidante no metabolizable por las células, fue usado como un control positivo de la oxidación de tioles (Figura 12B).

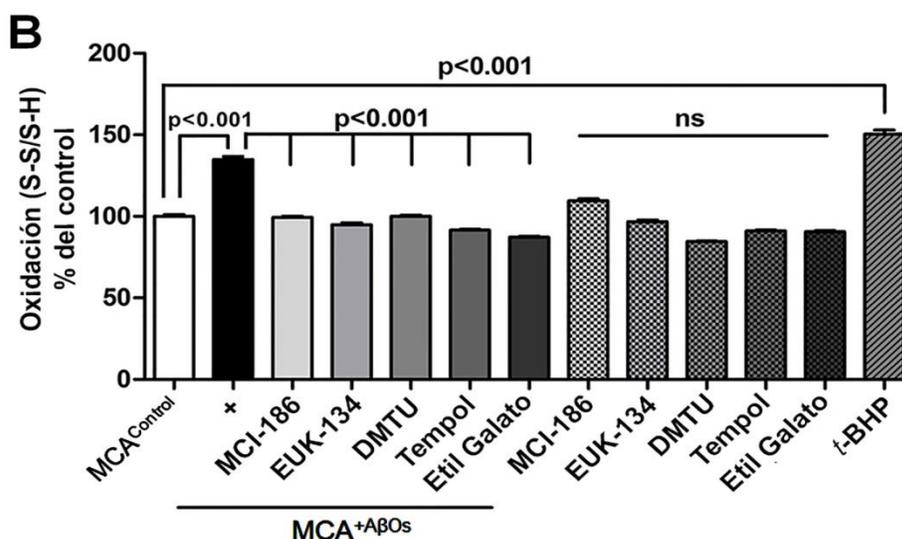
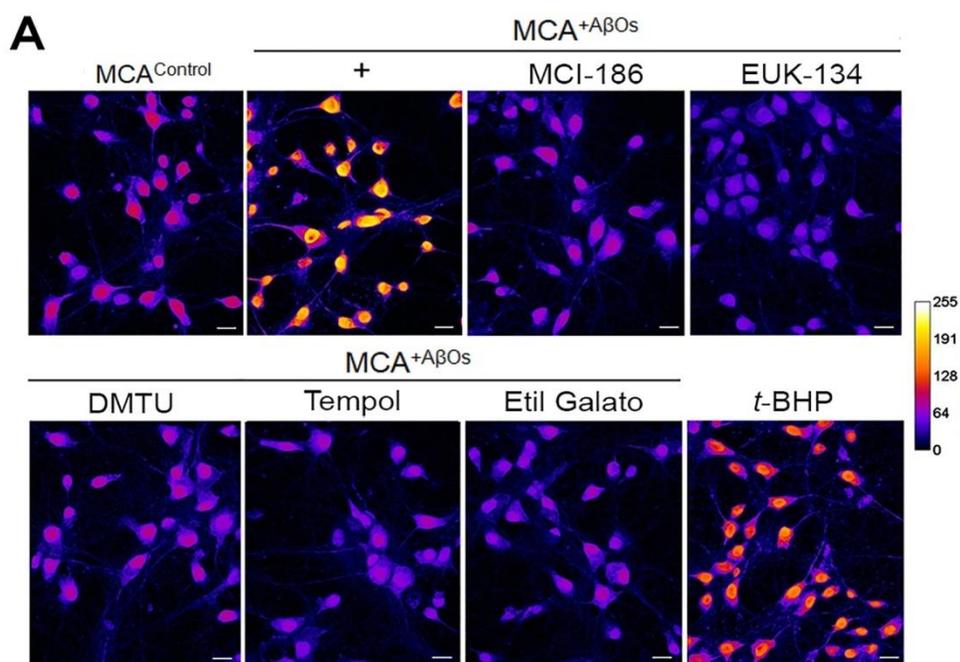


Figura 12. El tratamiento con el MCA^{+AβOs} aumenta significativamente el tono oxidativo en las neuronas y distintos agentes antioxidantes abolen este efecto. (A), Imágenes representativas colectadas en el canal que determina las cisteínas oxidadas (S-S) (ver métodos) después de la adición de MCA^{+AβOs} o MCA^{control}, en la ausencia o presencia de los antioxidantes MCI-186, EUK-134, Dimetil-tio-urea (DMTU), Tempol o Etil galato. El agente pro-oxidante *tert*-Butil-hidroperóxido (*t*-BHP, 5 μM) fue usado como control positivo. La intensidad de fluorescencia S-S fue transformada en una escala térmica (programa Image J) en donde un cambio de azul a blanco indica un aumento en el grado de oxidación (barra mano derecha). (B), Cuantificación de la razón oxidado/reducido (S-S/S-H) de los grupos tioles fue hecho como se describe en métodos. Los valores representan el promedio ± SEM de 3 experimentos

independientes. La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por ANOVA de 1 vía, seguido del post-test Bonferroni.

Para determinar si particularmente habían aumentos del peróxido de hidrógeno en las neuronas tras el tratamiento con el MCA^{+AβOs} se utilizó el biosensor redox-activo llamado Hyper-Cyto. Hyper fue diseñado en base al OxyR, un sensor natural de peróxido de hidrógeno presente en las bacterias (Belousov et al., 2006). Cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron transfectados con el sensor HyPer-Cyto, el cual detecta niveles de peróxido de hidrógeno citoplasmático a través de la oxidación de un residuo cisteína susceptible a aumento del peróxido de hidrógeno local (Lukyanov and Belousov, 2014). La medición a una excitación de 405 nm evidencia el tiol reducido de la proteína y la excitación a 480 nm muestra el tiol oxidado. La razón 480:405 nm evidencia el aumento de la oxidación de Hyper, la cual correlaciona con la presencia de peróxido de hidrógeno (estequiometría 1:1).

El tratamiento con el MCA^{+AβOs} generó un aumento significativo en los niveles de peróxido de hidrógeno en el soma y en las neuritas de las neuronas hipocampales comparado con el MCA^{Control} (1,34 y 1,51 veces, respectivamente) (Figura 13A y 13B).

STAT3 es una proteína susceptible al estrés oxidativo que sufre diversas modificaciones oxidativas en cisteínas claves, lo cual evita su unión al ADN (Li et al., 2010) Buttirini et al., 2014) y permite la formación de oligómeros a través de enlaces disulfuros (Li et al., 2010; Li and Shaw, 2004; Sobotta et al., 2015). Por lo tanto, una modificación oxidativa de STAT3 podría afectar su localización nuclear. Entonces, se evaluó si el tratamiento con los distintos agentes antioxidantes impedía la depleción

nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA^{+AβOs}. Para ello, los cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron incubados con MCA^{Control} o con MCA^{+AβOs} o co-incubados con MCA^{+AβOs} y los agentes antioxidantes por 24 horas y luego se realizó la inmunocitoquímica contra pSer-STAT3.

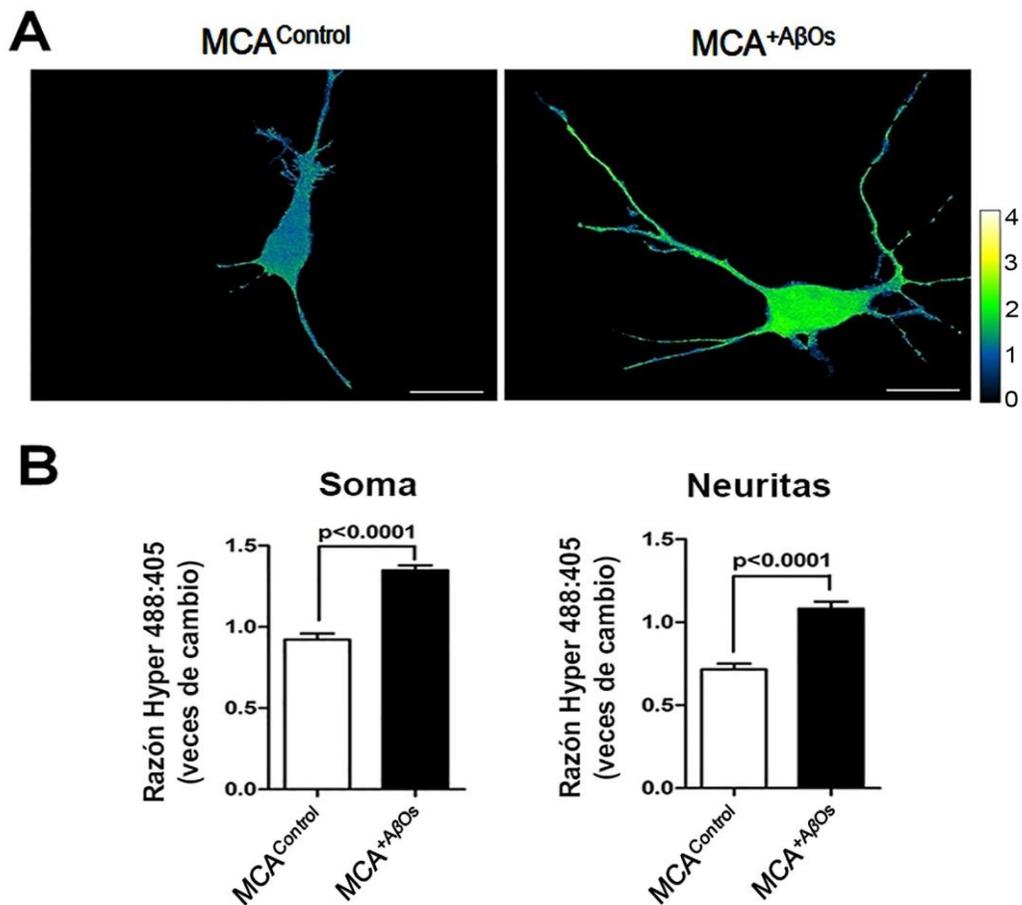


Figura 13. El MCA^{+AβOs} produce un aumento del peróxido de hidrógeno en el soma y en las neuritas. (A), Imágenes representativas de la fluorescencia de HyPer-Cyto determinada en cultivos neuronales pobres en astrocitos tratados con MCA^{+AβOs}. La intensidad de fluorescencia de HyPer-Cyto fue transformada en una escala térmica (barra mano derecha) en donde un cambio de verde a amarillo indica aumentos en el grado de oxidación. Barra de escala: 10 μm. (B) El gráfico representa la cuantificación de razón de fluorescencia de Hyper oxidado/reducido en el soma y en las neuritas en 30 células analizadas por cada experimento independiente. Los valores representan el promedio ± SEM de 3 experimentos independientes. La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por t-test.

De todos los antioxidantes utilizados, sólo EUK-134, MCI-186 y DMTU abolieron de forma parcial aunque significativa, la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA^{+AβOs} (Figuras 14A y 14B). Los antioxidantes etil galato y tempol no generaron diferencias estadísticamente significativas comparado con el MCA^{+AβOs}. Estos resultados sugieren que el aumento del tono oxidativo producto del MCA^{+AβOs} es un determinante en la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas.

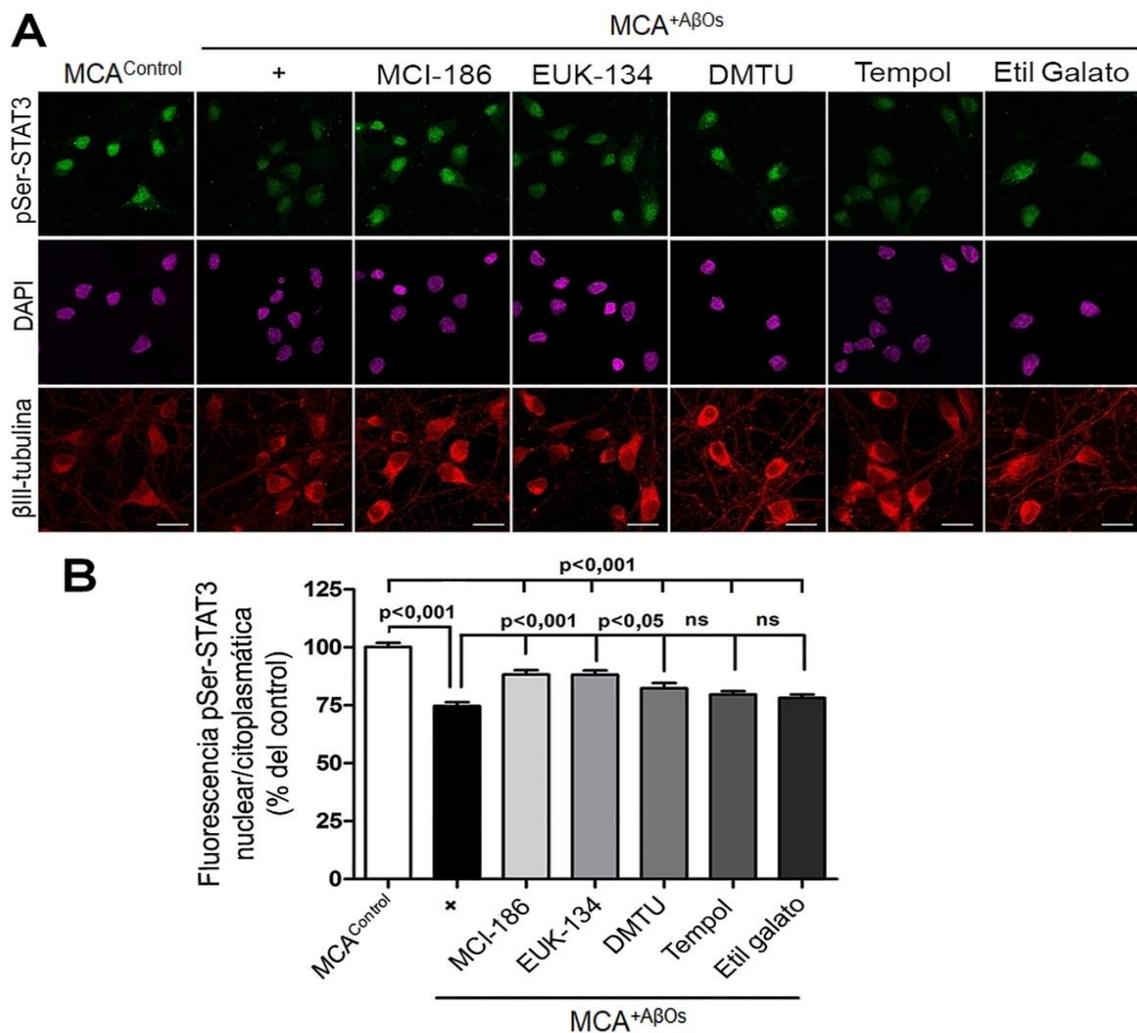


Figura 14. Los antioxidantes EUK-134, MCI-186 y DMTU abolen parcialmente la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA^{+AβOs}. (A), Imágenes representativas de la distribución núcleo/citoplasma pSer-STAT3 en cultivos

neuronales pobres en astrocitos tratados con $MCA^{+A\beta Os}$ y los agentes antioxidantes MCI-186, EUK-134, DMTU, Tempol o Etil galato. Sólo MCI-186, EUK-134 y DMTU abolen de forma parcial la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por $MCA^{+A\beta Os}$. Barra de escala: 10 μm . **(B)**, Cuantificación de la razón de inmunofluorescencia de pSer-STAT3 del experimento mostrado en (A). Los valores representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes, habiendo sido evaluadas 100 células por cada condición experimental. La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por ANOVA de 1 vía, seguida del post-test Bonferroni.

3.8 El mecanismo de depleción nuclear de pSer-STAT3 es dependiente de calcio, del receptor de ryanodina y parcialmente dependiente de la fosfatasa calcineurina

Las ROS y el óxido nítrico son importantes inductores de las señales de calcio neuronal a través de la activación de canales de calcio intracelulares y de la membrana plasmática (Paula-Lima et al., 2014; Yermolaieva et al., 2000). Ya que las ROS aumentan los niveles de calcio en neuronas, se evaluó si las señales de calcio dependían de cambios del tono oxidativo inducido por el $MCA^{+A\beta Os}$. Para ello, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron incubados con los antioxidantes EUK-134 (20 μM), MCI-186 (50 μM) o DMTU (100 μM) por 1 hora, cargados con Fluo 4-AM en presencia de los antioxidantes y luego fueron tratados con el $MCA^{+A\beta Os}$ o el $MCA^{control}$. Los cambios en señal de calcio fueron medidos siguiendo la fluorescencia del indicador Fluo-4 mediante microscopía. Se realizó una medición basal de 3 min, después se agregó el $MCA^{control}$ o $MCA^{+A\beta Os}$ y se registró el efecto por 15 minutos; luego se agregó el ionóforo ionomicina (100 $\mu g/mL$), para alcanzar la máxima señal de Fluo-4 en cada célula.

El MCA^{+AβOs} (curva roja) produjo un rápido y significativo aumento de la señal de calcio en las neuronas (al menos 2 veces el valor basal, $p < 0,001$) comparado con el MCA^{control} (curva azul), la cual se mantuvo en un nivel basal durante todo el registro (Figura 15A). Notablemente, este aumento de la señal de calcio inducido por el MCA^{+AβOs} fue constante en el tiempo, sugiriendo una posible desregulación de la homeostasis del calcio ya que normalmente los cambios de calcio intracelular son rápidos debido a los múltiples sistemas de recaptura del calcio. La pre-incubación de los antioxidantes EUK-134 (curva gris), MCI-186 (curva amarilla) y DMTU (curva negra) evitó completamente el aumento de la señal de calcio inducida por el MCA^{+AβOs} (Figura 15Ay 15B). Este resultado sugiere que los mediadores del MCA^{+AβOs} inducen una fuerte señal de calcio en las neuronas y que los antioxidantes al neutralizar los cambios en el tono oxidativo, evitan el aumento del calcio intracelular en las neuronas.

Dado que el MCA^{+AβOs} induce una potente señal de calcio en las neuronas, se quiso dilucidar si el calcio estaba involucrado en la depleción nuclear de pSer-STAT3. Para ello, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron pre-incubados con el quelante de calcio BAPTA-AM (100 μ M) por 1 hora y luego fueron estimulados con el MCA^{+AβOs} o MCA^{control} por 1,5 o 3 horas y luego se procedió a realizar la inmunocitoquímica. La incubación del BAPTA-AM por 1 hora es suficiente para quelar el calcio intracelular (Paula-Lima et al., 2011). En este experimento el MCA^{+AβOs} fue incubado por periodos cortos de tiempo (1,5 y 3 horas) ya que el BAPTA quela el calcio por un periodo corto de tiempo. El control BAPTA consistió en incubar el BAPTA-AM por 1 hora, se retiró el medio, se hizo un lavado con PBS precalentado y luego se agregó medio neurobasal de mantención por 3 horas. El resultado muestra que la quelación del calcio intracelular

con BAPTA-AM previno la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA^{+AβOs} 1,5 h o 3h (p<0,001), recuperando la señal a un nivel similar al control (Figuras 15C y 15D). Ninguno de los tratamientos experimentales generó cambios en la intensidad de fluorescencia de STAT3 total (Figura 15C).

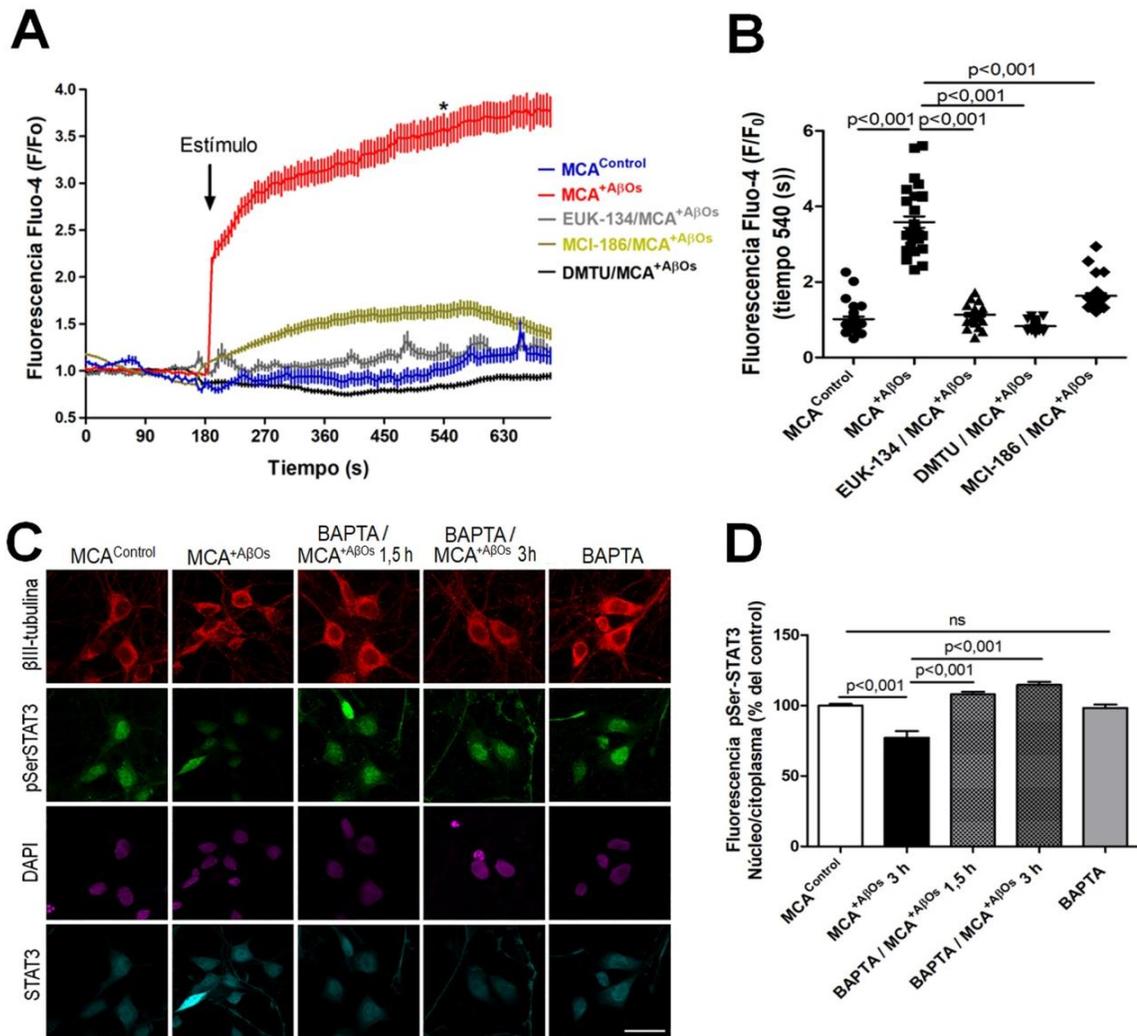


Figura 15. El MCA^{+AβOs} induce señales de calcio mediadas por aumento del tono oxidativo. La quelación de calcio evita la depleción nuclear de pSer-STAT3 (A), Cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron pre-incubados con antioxidantes EUK-134, MCI-186 o DMTU por 30 min, fueron cargados con Fluo-4-AM en presencia de los antioxidantes por 30 min y luego en la plataforma del microscopio fueron estimulados con MCA^{+AβOs} o MCA^{control}. Las señales de calcio fueron registradas en función del tiempo y fueron cuantificadas usando el programa Image J. Los valores representan el

promedio \pm SEM de la fluorescencia de Fluo-4 determinada en 50 células individuales por condición experimental. La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por ANOVA de 1 vía, seguido del post-test Bonferroni. **(B)**, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Fluo-4 (F/Fo) post-estímulo (asterisco). Los valores representan el promedio \pm DS La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por ANOVA de 1 vía, seguido del post-test Bonferroni. ns, no significativo. **(C)**, Imágenes representativas de la señal de fluorescencia de pSer-STAT3 en cultivos neuronales pobres en astrocitos que fueron pre-incubados con y sin BAPTA-AM 100 μ M por 1 hora antes de la incubación del MCA^{control} o el MCA^{+A β Os} (por 1,5 o 3 horas). Barra de escala: 20 μ m. **(D)**, Cuantificación de la razón de inmunofluorescencia de pSer-STAT3 en el núcleo y en el citoplasma mostrado en (C). Los valores representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes, en donde se analizaron 100 células por condición experimental. La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por ANOVA de 1 vía, seguido del post-test Bonferroni.

Estos resultados sugieren que las señales de Ca²⁺ inducidas por el MCA^{+A β Os}: 1) dependen de cambios en el tono oxidativo de las neuronas y 2) median la depleción nuclear del pSer-STAT3 neuronal.

El aumento de calcio inducido por el MCA^{+A β Os} podría ser mediado por los receptores de ryanodina (RyR), ya que estos canales de calcio son altamente sensibles a estímulos redox (Carrasco et al., 2004; Hidalgo and Donoso, 2008; Kemmerling et al., 2007). RyR2 es altamente expresado en neuronas hipocámpales y se ha notificado que los A β Os estimulan la liberación de calcio a través del RyR (Paula-Lima et al., 2011) y que en específico, la mediación por RyR2 es crucial para la entrada de calcio en la red mitocondrial y su posterior fragmentación (SanMartin et al., 2017).

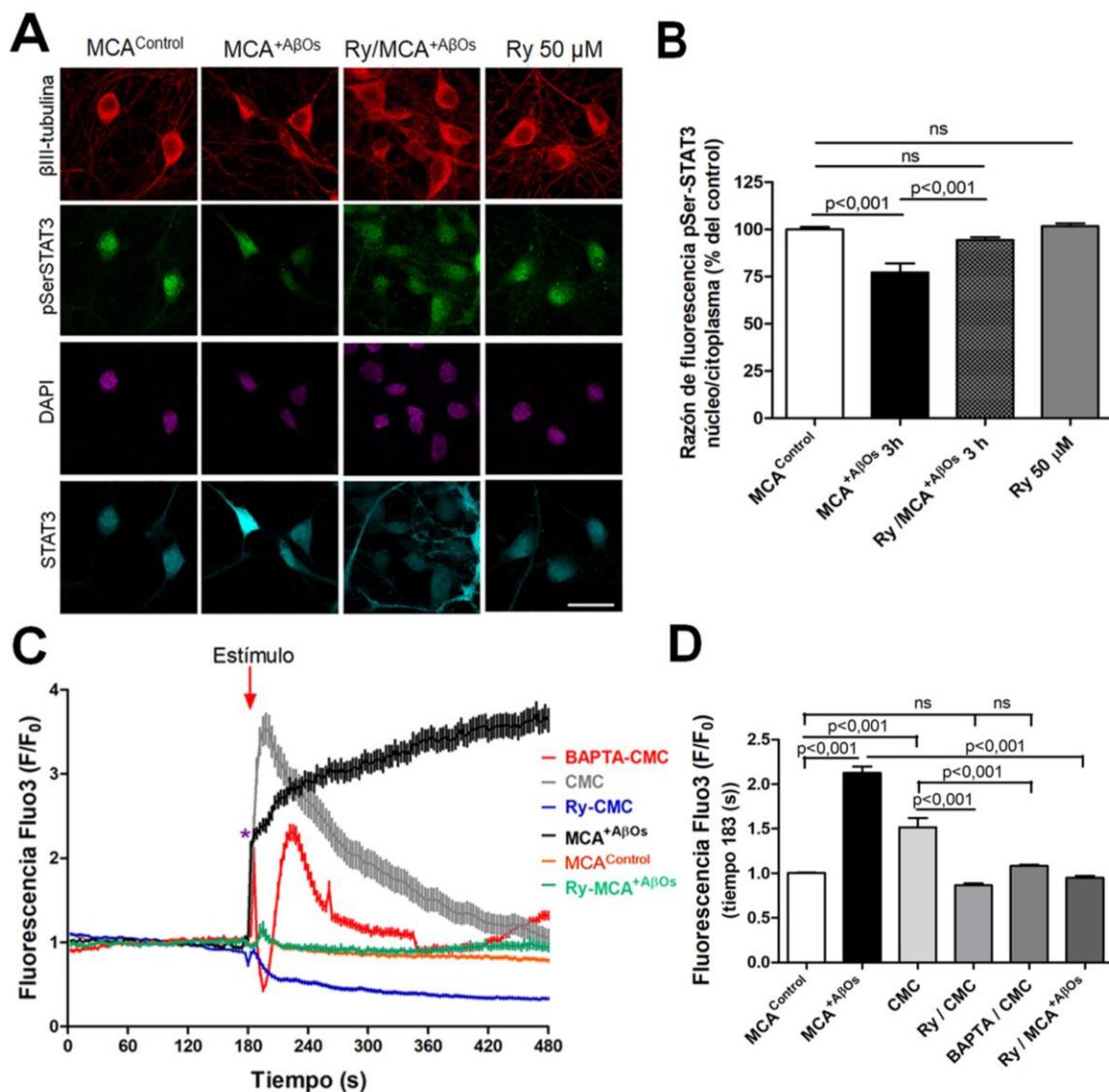


Figura 16. El receptor de ryanodina media el aumento de calcio inducido por el MCA^{+AβOs}. (A), Imágenes representativas de la señal de fluorescencia de pSer-STAT3 en cultivos neuronales pobres en astrocitos que fueron incubados con y sin ryanodina 50 μM por 1 hora y luego fueron estimulados con MCA^{+AβOs} o con MCA^{control} por 3 horas. Barra: 20 μm. (B), Cuantificación de la razón de inmunofluorescencia de pSer-STAT3 en el núcleo y en el citoplasma mostrado en (A). Los valores representan el promedio ± SEM, se midieron 100 células por cada condición experimental en 3 experimentos independientes. La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por ANOVA de 1 vía, seguida del post-test Bonferroni. (C) Cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron pre-incubados con ryanodina (50 μM) o BAPTA-AM (100 μM) por 30 min, cargados con Fluo-3-AM por 30 min y luego estimulados con CMC, MCA^{control} o MCA^{+AβOs}. Las señales de calcio fueron registradas en función del tiempo y fueron cuantificadas usando el programa Image J. Los valores representan el promedio ± SEM de la fluorescencia de Fluo-3 determinada entre 40-50

células individuales por condición experimental. **(D)**, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Fluo3 (F/Fo) post estímulo (asterisco). La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por ANOVA de 1 vía, seguido del post-test Bonferroni. ns, no significativo.

Considerando que el MCA^{+A β Os} aumenta el tono oxidativo de las neuronas, induciendo aumentos de calcio y que la quelación del calcio inhibe la depleción nuclear de pSer-STAT3, se evaluó la participación del RyR en la depleción nuclear de pSer-STAT3. Para ello, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron pre-incubados con ryanodina 50 μ M (concentración inhibitoria) por 1 hora y luego fueron tratados con el MCA^{+A β Os} o el MCA^{control} por 3 horas. El control de ryanodina consistió en una incubación de ryanodina por 1 hora, se retiró el medio, se hizo un lavado con PBS precalentado y luego se agregó medio neurobasal de mantención por 3 horas. Finalmente, las células fueron fijadas y se realizó una inmunocitoquímica contra pSer-STAT3.

La inhibición del RyR con ryanodina (50 μ M) suprimió significativamente el efecto del MCA^{+A β Os} ($p < 0,001$), evitando la depleción de la señal de pSer-STAT3 nuclear obteniéndose una señal de fluorescencia similar a la observada con el MCA^{control} ($p > 0,05$, ns) (Figura 16A y 16B). La ryanodina por sí sola no afectó de forma estadísticamente significativa la distribución nuclear de pSer-STAT3 comparada con el MCA^{control} ($p > 0,05$, ns) (Figura 16A y 16B). Ninguno de los tratamientos experimentales generó cambios significativos en la intensidad de fluorescencia de STAT3 total (Figura 16A).

Para probar que la ryanodina estaba realmente inhibiendo al RyR de forma específica, se analizaron las señales de calcio en cultivos neuronales pobres en astrocitos que habían sido pre-incubadas con ryanodina 50 μ M por 1 hora y luego se agregó 4-cloro-

m-cresol (4-CMC, 500 μ M), un potente y específico agonista del RyR (Herrmann-Frank et al., 1996). Si bien estudios farmacológicos clásicos sugieren que la dosis de 4-CMC que produce la máxima liberación de calcio es 1 mM (Zorzato et al., 1993), hay evidencia reciente que demuestra que concentraciones ≥ 1 mM de 4-CMC producen inhibición del RyR (Al-Mousa and Michelangeli, 2009) por esta razón se usó 500 μ M (Figura 16C). Como se esperaba, la preincubación con ryanodina produjo una inhibición completa del RyR, impidiendo que 4-CMC pudiese promover la liberación de calcio desde el retículo hacia citoplasma (curva azul) (Figura 16C). Es posible que la ryanodina no haya inhibido todos los receptores de ryanodina, de esta forma, la aplicación de 4-CMC podría haber permitido una ligera salida de calcio a través del RyR y al abrirse el canal la ryanodina podría unirse a éste inhibiéndolo, bajando la disponibilidad de calcio intracelular y por lo tanto, la señal de fluorescencia del Fluo-3. Para dilucidar si la intensidad de la señal de Fluo-3 producto de la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático es similar a la observada con el MCA^{+A β Os}, a las células cargadas con Fluo-3 se les agregó 4-CMC al baño y se registró su efecto por varios minutos (curva gris). El 4-CMC indujo una rápida y potente alza de la señal de calcio intracelular (3,5 veces más que el MCA^{control}) similar en magnitud a la observada con el MCA^{+A β Os}, pero con una cinética distinta ya que esta señal declinó en el tiempo en concordancia con un buen funcionamiento de la homeostasis del calcio. Dado que la señal de calcio producto de la estimulación con el MCA^{+A β Os} se mantiene elevada en el tiempo, se podría sugerir que el MCA^{+A β Os} produce una pérdida de la homeostasis del calcio neuronal (Figura 16C, 16D).

Por otro lado, para verificar si el aumento de calcio intracelular depende del RyR, las células fueron pre-incubadas con BAPTA-AM (100 μ M) por 1 hora y luego se les

agregó 4-CMC (curva roja) (Figura 16C). Dado que el BAPTA quela todo el calcio intracelular, se espera que 4-CMC libere rápidamente el calcio desde el retículo endoplasmático y éste sea secuestrado por el BAPTA, por lo tanto, la señal de calcio debería aumentar rápidamente y luego disminuir. Tal como se esperaba, tras la quelación del calcio intracelular el 4-CMC generó una rápida señal de calcio y luego una caída abrupta de la intensidad de Fluo-3, debido al efecto quelante del BAPTA. Ya que la concentración de 4-CMC utilizada es alta, se genera una segunda señal de calcio la cual es quelada lentamente en el tiempo (Figura 16C). Probablemente, el 4-CMC produce una liberación masiva de calcio alcanzando una concentración intracelular cercana al rango milimolar, haciendo que el BAPTA no pueda contener (bufferizar) tal concentración de inmediato pero a medida que pasa el tiempo, el BAPTA va secuestrando calcio que inicialmente estaba unido al Fluo-3, debido a la diferencias en las constantes de afinidad del BAPTA y el Fluo-3.

En resumen, los resultados de estos experimentos sugieren que el aumento de calcio inducido por el MCA^{+AβOs}, que es necesario para la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas, al parecer proviene principalmente de la activación del RyR.

Hasta ahora, los resultados obtenidos sugieren que mediadores presentes en el medio condicionado, tras el tratamiento de astrocitos primarios con los AβOs, inducen señales de calcio en las neuronas, lo cual podría reclutar alguna serina/treonina fosfatasa dependiente de calcio, tal como calcineurina, la cual eventualmente podría catalizar la defosforilación del residuo serina 727 de STAT3. Alternativamente, el eje de señales ROS-calcio podría inhibir la actividad de una fosfoserina quinasa relevante para la fosforilación de pSer-STAT3.

Para determinar la participación de calcineurina en la desfosforilación de la serina 727 de STAT3 tras el tratamiento con el MCA^{+AβOs}, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron transducidos con distintos adenovirus que modulan la actividad de calcineurina previo al tratamiento con el medio condicionado. Se utilizaron 3 distintos adenovirus facilitados por la Dra. Valentina Parra, de la facultad de Bioquímica de la Universidad de Chile: Uno de ellos expresa la secuencia de un péptido inhibidor no competitivo de calcineurina llamado CAIN (Ad-CAIN), el segundo adenovirus expresa la secuencia de calcineurina constitutivamente activa (Ad-CN) (Delling et al., 2000; Jofuku et al., 2005; Yoon et al., 2003) y el último adenovirus expresa la secuencia de la enzima β-galactosidasa (Ad-LacZ), la cual se utilizó como un adenovirus control que permitió establecer el porcentaje de células infectadas a través de la identificación colorimétrica de un producto insoluble llamado 5,5-dibromo-4,4'-dicloro-indigo (azul, Figura 22).

Dada la carencia de una secuencia blanco que permitiera monitorear la expresión del péptido CAIN o de la calcineurina constitutivamente activa dentro de las células Ad-CAIN y Ad-CN, estos adenovirus fueron caracterizados detalladamente antes de su uso (Figura 22 y 23, ANEXO). Para ello, fue importante demostrar que los Ad-CAIN y Ad-CN tenían la habilidad de disminuir o aumentar los niveles de la proteína RCAN1, el cual es un inhibidor endógeno de la actividad de calcineurina cuya expresión aumenta con la mayor actividad de calcineurina. Además, fue necesario determinar si Ad-CN y Ad-CAIN inducían o no la translocación nuclear del factor de transcripción NFATc4 en las neuronas, respectivamente (Figura 23A y 23B, Anexo). Ad-CAIN, Ad-CN y LacZ fueron utilizados con un índice de multiplicidad (MOI) de 1000 y el tiempo de transducción fue de 8 horas en un medio neurobasal sin B27 a 37°C.

La transducción de neuronas primarias con el Ad-CAIN previno de forma significativa la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA^{+A β Os} ($p < 0,001$), aunque la señal de fluorescencia de pSer-STAT3 no alcanzó el nivel del MCA^{control} sin infectar (Figuras 17A y 17B). Las células transducidas con el Ad-CAIN no mostraron cambios significativos en la fluorescencia nuclear de pSer-STAT3 comparado con el MCA^{control} sin infectar ($p > 0,05$). A su vez, la transducción de las células con el adenovirus Ad-CN, aumentó la depleción nuclear de pSer-STAT3 producida por el MCA^{+A β Os} comparado con la condición MCA^{+A β Os} sin infectar ($p < 0,001$), aunque su efecto fue mucho menor al esperado (Figuras 17A, 17B). Las células transducidas con el Ad-CN muestran una disminución del 25% de la señal nuclear de pSer-STAT3 comparada con el MCA^{control} sin infectar ($p < 0,001$), una disminución pequeña comparado con lo esperado si fuese el único componente involucrado en la desfosforilación del residuo serina 727 (Figuras 17A y 17B). El uso del Ad-LacZ demostró que la transducción de loc cultivos con los adenovirus no afectó la señal nuclear de pSer-STAT3. Estos son los primeros resultados que conectan la depleción nuclear de pSer-STAT3 con la posible activación de la fosfatasa calcineurina, en el contexto del cambio en la interacción entre astrocitos y neuronas inducida por A β Os.

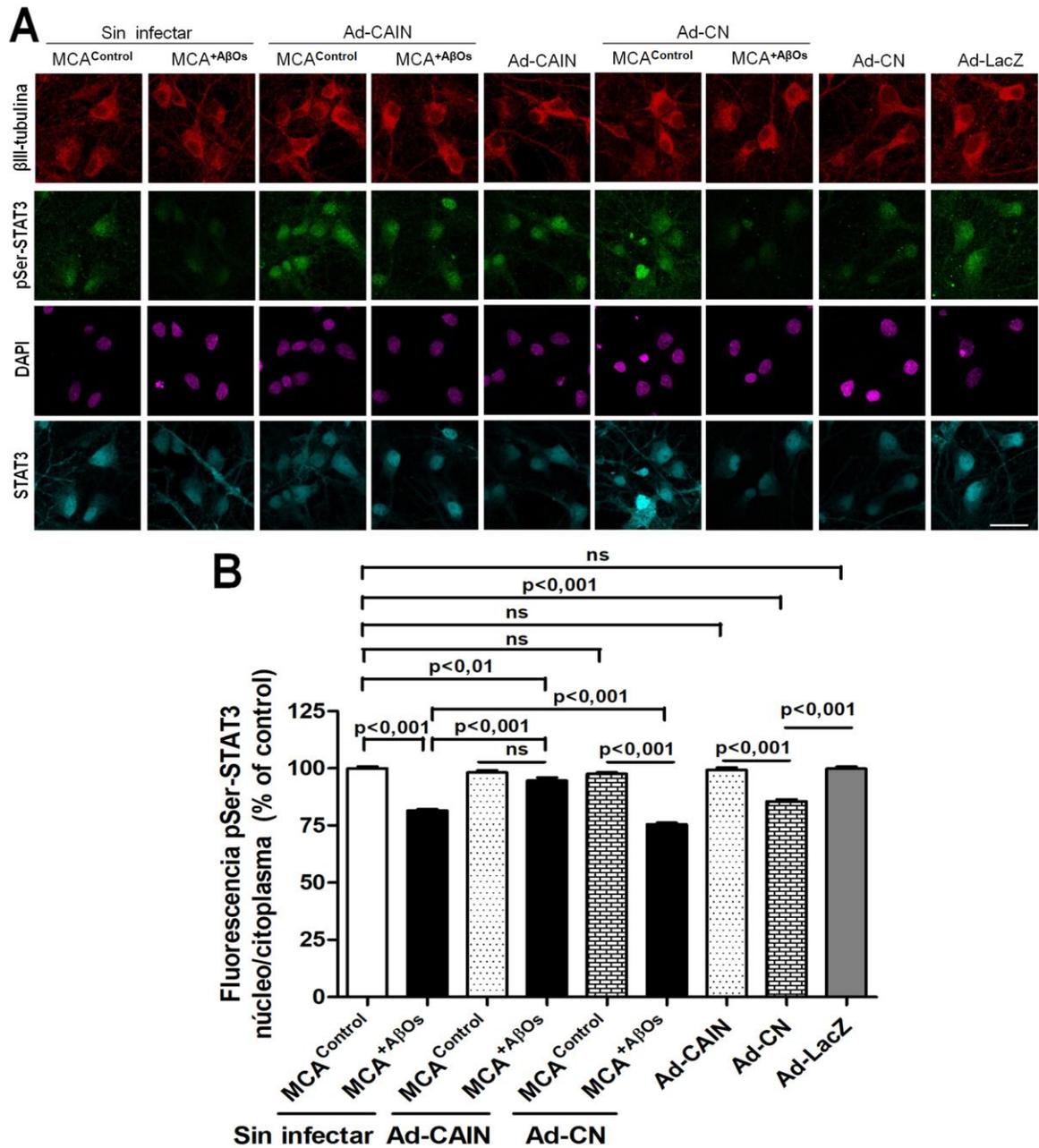


Figura 17. La inhibición de calcineurina abole o previene la depleción nuclear de pSer-STAT3. La expresión de una calcineurina constitutivamente activa causa una disminución de pSer-STAT3 nuclear. **(A)**, Imágenes representativas de la distribución núcleo/citoplasma pSer-STAT3 en cultivos neuronales pobres en astrocitos que fueron transducidos con los adenovirus CAIN, CN o LacZ usando un MOI de 1000 por 8 horas para cada virus y luego fueron estimulados con MCA^{+AβOs} o MCA^{control} por 24 horas. Barra de escala: 20 μm. **(B)**, Cuantificación de la razón de inmunofluorescencia de pSer-STAT3 en el núcleo y en el citoplasma mostrado (A). Los valores representan el promedio ± SEM, se midieron 100 células por cada condición experimental en 3

experimentos independientes. La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por ANOVA de 1 vía, seguida del post-test Bonferroni.

Ya que el Ad-CN no generó una depleción absoluta de la fosforilación del residuo 727 de STAT3 medido por inmunocitoquímica, se evaluó el nivel de fosforilación del residuo serina 727 tras el uso de los distintos adenovirus mediante western blot, con el fin de dilucidar si se obtienen los mismos resultados descritos anteriormente.

Para ello, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron transducidos con Ad-CAIN, Ad-CN y Ad-LacZ, luego se les sometió al tratamiento con MCA^{control} o $MCA^{+A\beta Os}$ por 24 horas y se hizo la extracción de proteína totales. La comparación se hizo con respecto a los cultivos neuronales no transducidos.

En las muestras sin infectar, el $MCA^{+A\beta Os}$ produjo una disminución leve y no significativa de la fosforilación de serina 727, sin cambios en los niveles de la proteína STAT3 (Figura 18A y 18B). Si bien la transducción de los cultivos con el Ad-CAIN no produjo diferencias significativas con respecto al MCA^{control} sin infectar, la inhibición de calcineurina con el péptido CAIN no produjo un aumento significativo de la fosforilación en serina 727 ni causó un aumento significativo de STAT3 total, a diferencia de lo que reportó (Murase, 2013) en neuronas durante el desarrollo, en donde calcineurina promovió la degradación de STAT3 mediante la vía ubiquitin-proteosoma. Si bien, la transducción de los cultivos neuronales con el Ad-CN redujo los niveles de la fosforilación del residuo serina 727, las diferencias no fueron estadísticamente significativas comparadas con el MCA^{control} o $MCA^{+A\beta Os}$ sin infectar (Figura 18A y 18B). La infección con el virus LacZ no evidenció cambios en la fosforilación del residuo serina 727 comparado con el MCA^{control} sin infectar (ns, Figura 18A y 18B). Las únicas

diferencias significativas que se obtuvieron fueron en los niveles de fosforilación de la serina 727 cuando se comparan las condiciones antagonistas, es decir, la condición MCA^{control} de la muestra infectada con el Ad-CAIN versus el Ad-CN ($p < 0,05$) y cuando se comparan la condición MCA^{+A β Os} de la muestra infectada con el Ad-CAIN versus el Ad-CN ($p < 0,001$). La infección con el Ad-LacZ no afectó la fosforilación de serina 727 comparado con las condiciones sin infectar. Si bien en el ANEXO se demuestra que los adenovirus Ad-CAIN y Ad-CN funcionan, los experimentos de las figuras 17 y 18 muestran que calcineurina podría estar involucrada en el proceso de desfosforilación de serina 727 de STAT3, sin embargo, no es la principal molécula involucrada en ese proceso.

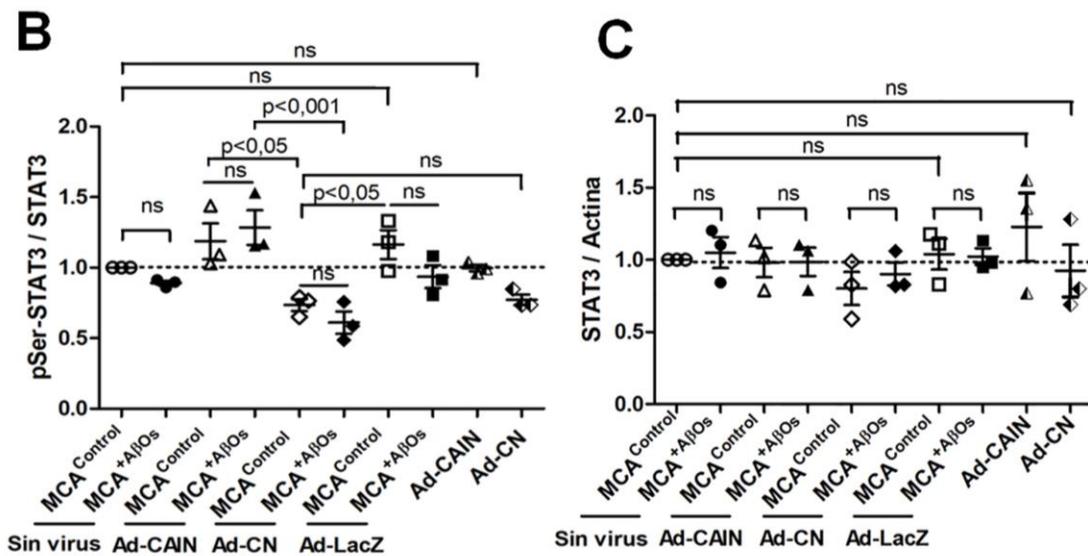
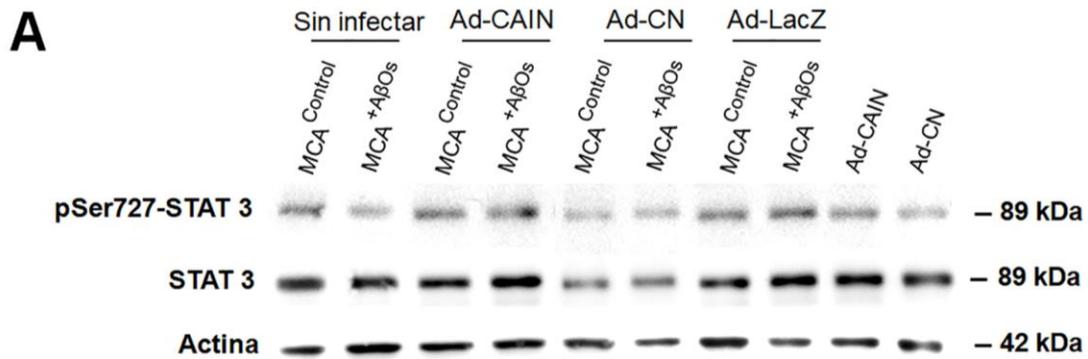


Figura 18. La fosforilación del residuo 727 de STAT3 no aumenta ni disminuye significativamente con la infección de los adenovirus Ad-CAIN y Ad-CN comparado con las muestras sin infectar. La sobreexpresión o inhibición de calcineurina no afecta significativamente los niveles de la proteína STAT3. (A), Imágenes del western blot representativo de cultivos neuronales pobres en astrocitos transducidos con Ad-CAIN, Ad-CN y Ad-LacZ (B y C), Análisis densitométrico de la fosforilación del residuo serina 727 y de la proteína STAT3 total de la figura A, respectivamente. Los valores representan el promedio \pm SEM, de 3 experimentos independientes. La significancia de las diferencias entre los promedios fue determinada por ANOVA de 1 vía, seguida del post-test Bonferroni.

3.9 El MCA^{+AβOs} potencia la apoptosis inducida por un estímulo excitotóxico

STAT3 regula la expresión de diversos genes de sobrevivencia y se ha evidenciado que promueve la sobrevivencia de neuronas adultas bajo condiciones normales (Murase et al., 2012) y patológicas (Jung et al., 2009; Schweizer et al., 2002). Además, el estrés oxidativo induce modificaciones oxidativas reversibles o irreversibles en STAT3, entre ellas se ha evidenciado: 1) la oxidación de cisteínas críticas involucradas en la interacción con el ADN (Li et al., 2010); 2) oligomerización (Li et al., 2010; Li and Shaw, 2004; Sobotta et al., 2015) y 3) S-glutationilación (Butturini et al., 2013; Butturini et al., 2014; Xie et al., 2009). Estos cambios sugieren que modificaciones oxidativas de STAT3 podrían afectar su actividad transcripcional. Por largo tiempo la actividad transcripcional de STAT3 ha sido ligada específicamente a la fosforilación en la tirosina 705, sin embargo, la fosforilación en serina es necesaria para obtener la máxima actividad transcripcional.

Para evaluar si el MCA^{+AβOs} modifica la actividad transcripcional de STAT3, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron estimulados con MCA^{+AβOs} o MCA^{control} por 24 horas y se determinó la expresión de los niveles de ARNm de Bcl-2, Bcl-xL y survivina, los cuales son genes blancos de STAT3 involucrados en la respuesta de sobrevivencia en distintas etapas de la muerte apoptótica. Todos los niveles de ARNm fueron normalizados con los niveles de actina.

Los niveles de ARNm de Bcl-2 y Survivina fueron significativamente reducidos ($p < 0,05$) en respuesta al tratamiento con el MCA^{+AβOs} comparado con el MCA^{control} (Figura 18A), mientras que la disminución de la expresión de Bcl-xL no fue estadísticamente

significativa debido a la gran dispersión de los datos. La expresión de Bax no fue alterada con la aplicación del MCA^{+AβOs} ($p > 0,05$; ns). Además, el MCA^{+AβOs} produjo un ligero aumento de la razón pro-apoptótica Bax/Bcl-2 (Figura 18B) en las neuronas.

Dado que los antioxidantes impedían o revertían el aumento del tono oxidativo inducido por el MCA^{+AβOs} y que algunos de ellos, como EUK-134, también abolían parcialmente la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas, se evaluó si EUK-134 revertía o no la disminución de la expresión de Bcl-2, survivina, Bcl-xL inducida por el MCA^{+AβOs}.

Para esto, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron incubados con EUK-134 (20 μ M) en presencia o ausencia del MCA^{+AβOs} por 24 horas y luego determinamos la expresión de los niveles relativos de ARNm de los genes de sobrevivencia mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR). En el control EUK-134, las células fueron incubadas con el antioxidante por 24 horas en medio neurobasal de mantención.

La co-incubación de EUK-134 con el MCA^{+AβOs} logra re-establecer los niveles de los ARNm de Bcl-2, Bcl-xL y survivina a un valor cercano al control, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 19A). En la razón pro-apoptótica Bax/Bcl-2 la co-incubación de el MCA^{+AβOs} con EUK-134 disminuye la razón a un nivel similar al MCA^{control} pero no presenta diferencias significativas con respecto al MCA^{+AβOs} debido a la gran dispersión de los datos (Figuras 19A y 19B). En el caso del control EUK-134, sólo la expresión de Bcl-2 aumentó significativamente con respecto a la condición MCA^{control} ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que el MCA^{+AβOs} disminuye el ARNm de Bcl-2 y survivina. El antioxidante EUK-134 genera un efecto positivo en la expresión de esos genes, sin embargo, la co-incubación de EUK-134 con el MCA^{+AβOs}

no logra compensar significativamente el efecto del MCA^{+A β Os} en esos genes. Esto está en concordancia con la Figura 14B en donde se muestra que evitar el aumento del tono oxidativo no es suficiente para impedir la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas.

Dado que Bcl-2 heterodimeriza con Bax y previene la formación del poro de transición mitocondrial (MPTP) y que survivina previene la activación de las caspasas, es posible que la disminución de Bcl-2 y survivina mediada por el MCA^{+A β Os} podría promover la muerte apoptótica, al menos en la etapa inicial favoreciendo la formación del MPTP y la activación de las caspasa, un evento posterior al MPTP.

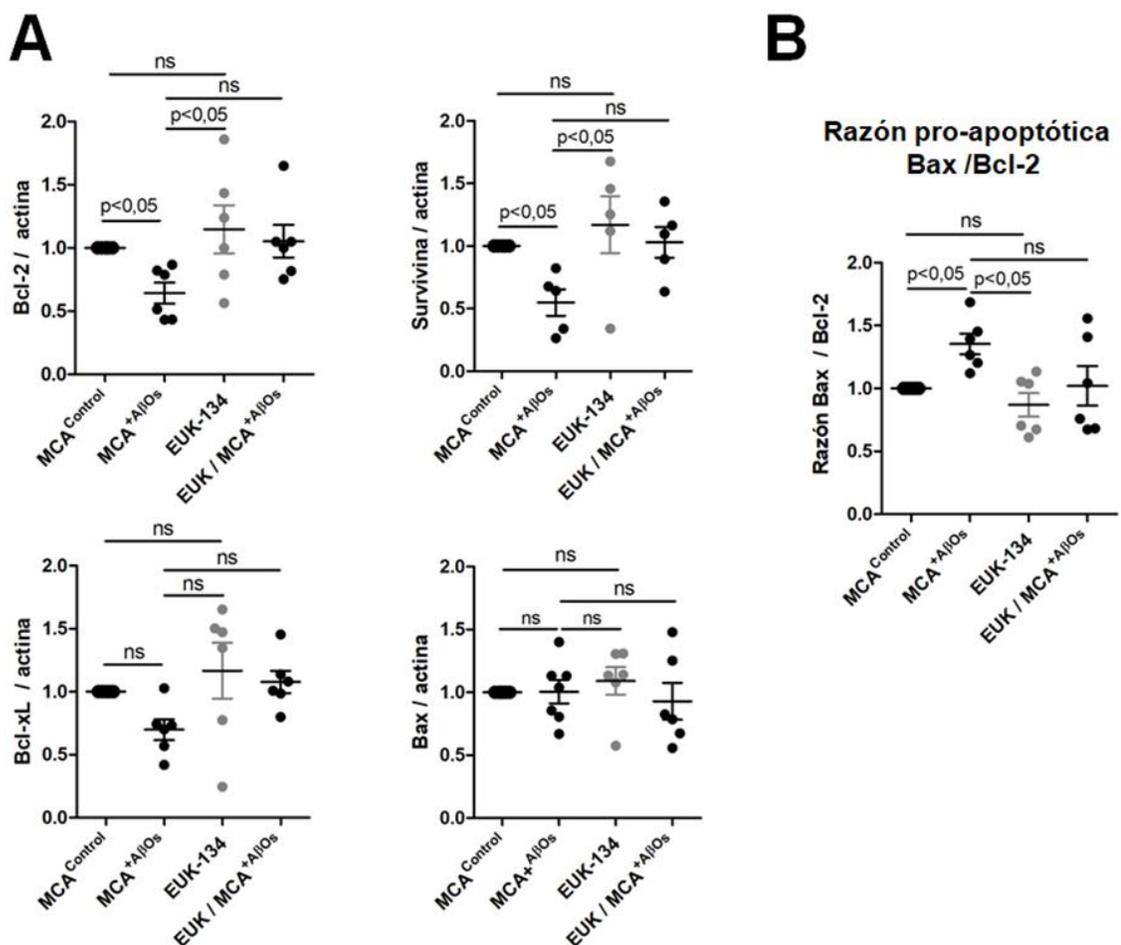


Figura 19. El $MCA^{+A\beta Os}$ promueve una disminución de la expresión de los genes blancos de sobrevida de STAT3, Bcl-2 y survivina, y aumenta la razón pro-apoptótica Bax/Bcl-2 en las neuronas. Sin embargo, la co-incubación del $MCA^{+A\beta Os}$ con EUK-134 no recupera los niveles de expresión de esos genes. (A), ARNm de Bcl-2, Bcl-xL, Bax y Survivina fueron cuantificados por PCR en tiempo real (qRT-PCR) en cultivos neuronales pobres en astrocitos tratados con $MCA^{control}$, $MCA^{+A\beta Os}$, EUK-134 (20 μM) o la co-incubación EUK/ $MCA^{+A\beta Os}$ por 24 h. Todos los valores de ARNm fueron normalizados por los niveles de ARNm de actina. Los valores representan el promedio \pm SEM. La significancia de las diferencias fue determinada por t-test. Estos resultados provienen de 5-6 experimentos independientes. (B), Razón pro-apoptótica Bax/Bcl-2. Los valores representan el promedio \pm SEM de 5-6 experimentos independientes. La significancia estadística fue evaluada mediante t-test.

El siguiente paso fue determinar si el $MCA^{+A\beta Os}$ producía la ejecución de la muerte apoptótica a través de la activación de la caspasa 3 y la observación de núcleos apoptóticos (condensados). Para ello, se determinó la activación de caspasa 3

mediante inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo específico que detecta los niveles endógenos del fragmento largo (17/19 kDa) de la caspasa-3 producto del clivaje adyacente al residuo Asp175 (Nicholson et al., 1995), en evento fundamental en la activación de esta caspasa. La evaluación de los núcleos apoptóticos se realizó mediante el ensayo de TUNEL utilizando el kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL system (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para ello, cultivos neuronales pobres en astrocitos se trataron con el MCA^{control} o el MCA^{+AβOs} por 24 horas y se evaluó la presencia del fragmento largo de la caspasa-3 en las neuronas.

El MCA^{+AβOs} no produjo una significativa activación de la caspasa-3, comparado con el MCA^{control} (Figura 20A, B). Los cultivos pre-tratados con AraC son más sensibles que los cultivos sin esta droga ya que se ha reportado que AraC induce apoptosis mediante la activación de caspasa-3 (Datta et al., 1996) y eso explica el porcentaje basal de neuronas con caspasa-3 activada (aproximadamente 8-10 neuronas/campo que están en apoptosis).

La concentración de AβOs que se utilizó en esta tesis ha sido considerada subletal por nuestro grupo de trabajo y otros investigadores (De Felice et al., 2007; Paula-Lima et al., 2011) y se ha descrito ampliamente que los AβOs afectan la plasticidad sináptica en las neuronas. Entonces, se evaluó si el El MCA^{+AβOs} producía sensibilidad a la muerte apoptótica en presencia de un estímulo excitotóxico como el exceso de glutamato o de NMDA. La sobreactivación excitotóxica, especialmente del NMDAR, induce la entrada excesiva de calcio y la muerte neuronal (Benarroch, 2011; Choi,

1987; Choi et al., 1988; Koh and Choi, 1991; Tymianski et al., 1993). Además, los mecanismos de reciclaje/recaptura de glutamato en los astrocitos están alterados en la EA (Arias et al., 1995; Fernandez-Tome et al., 2004; Parpura-Gill et al., 1997) y son mediados en cierta parte por los A β Os (Abdul et al., 2009).

Para probar si el MCA^{+A β Os} inducía sensibilidad a la muerte apoptótica, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron incubados con NMDA (50 o 100 μ M) en presencia o ausencia del MCA^{+A β Os} por 24 horas y luego se hizo la inmunocitoquímica contra caspasa-3 activada. El medio de tratamiento fue medio neurobasal suplementado con B27, tal como se usó en (Wang et al., 2000) y las concentraciones excitotóxicas de NMDA fueron las mismas que se usaron en (Beaman-Hall et al., 1998; Dugan et al., 1995). Tapsigargina, un inhibidor no competitivo de la bomba Ca²⁺/ATPasa del retículo endoplasmático, induce la apoptosis al incrementar el calcio intracelular mediante el vaciamiento del retículo (Rogers et al., 1995). Tapsigargina (20 μ M) por 1 hora fue usada como control positivo de muerte apoptótica.

Tal como se esperaba, la aplicación de NMDA 50 o 100 μ M produjo un considerable aumento ($p < 0,001$) de caspasa-3 activada en las neuronas (4 y 5 veces más que el MCA^{control}, respectivamente). El co-tratamiento de las dos concentraciones de NMDA con el MCA^{+A β Os} produjo un aumento significativo ($p < 0,001$) de la activación de caspasa-3 comparado con los tratamientos con NMDA solo sugiriendo un efecto sinérgico entre un estímulo excitotóxico y el MCA^{+A β Os} (Figura 20B). La distribución nuclear de caspasa-3 activada está en concordancia con reportes anteriores (Kamada et al., 2005), ya que la gran mayoría de sus blancos moleculares corresponden a proteínas asociadas a la cromatina y a funciones nucleares (Casciola-Rosen et al.,

1996; Degen et al., 2000; Greidinger et al., 1996; Rosen and Casciola-Rosen, 1997; Sahara et al., 1999; Sanghavi et al., 1998; Slee et al., 2001; Tang and Kidd, 1998; Teraoka et al., 1996).

La segunda aproximación fue establecer la presencia de núcleos apoptóticos producto de la fragmentación del ADN nuclear a través del ensayo fluorimétrico TUNEL. En resumen, el ensayo consiste en la incorporación del nucleótido dUTP-12-fluoresceína en el terminal 3' del ADN usando la enzima recombinante deoxinucleotidil terminal transferasa (rTdT). El ADN marcado con dUTP-12-fluoresceína puede ser visualizado mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Los núcleos totales se tiñeron con DAPI.

Entonces al igual que en el experimento anterior, cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron incubados con NMDA (50 o 100 μM) en presencia y ausencia de $\text{MCA}^{+\text{A}\beta\text{O}_s}$ por 24 horas y luego se hizo el ensayo de TUNEL según las indicaciones sugeridas en el kit. Tapsigargina (20 μM) por 1 hora fue usada como control positivo.

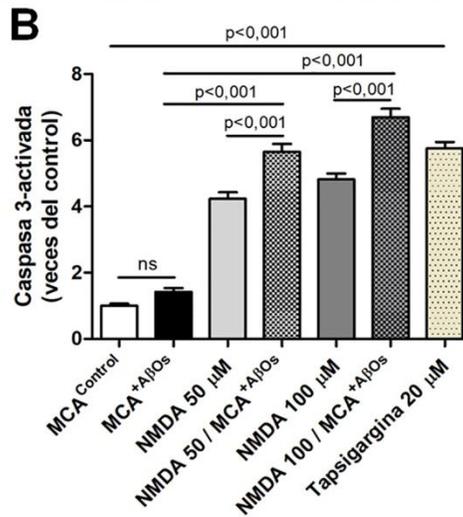
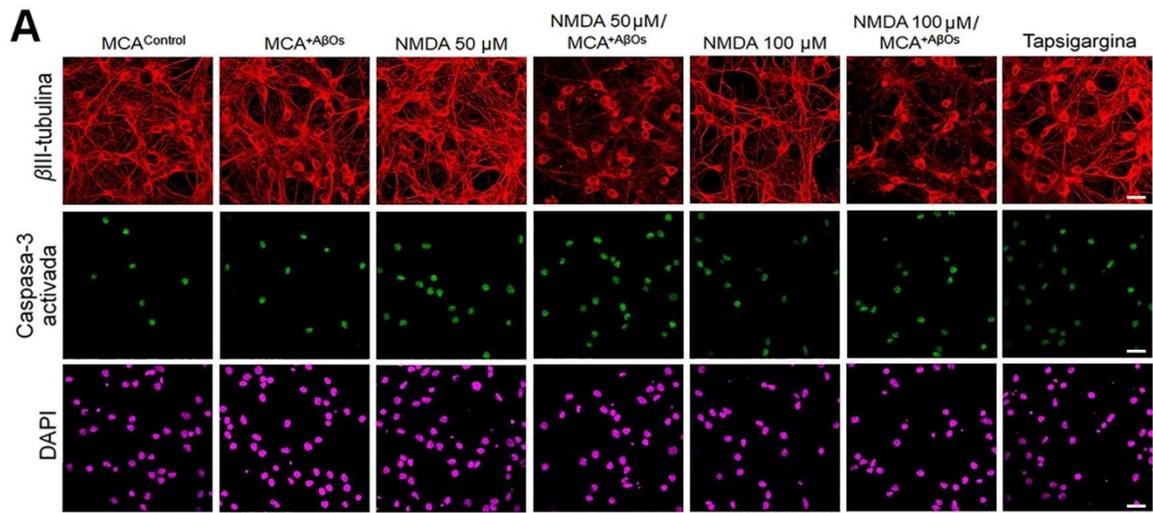


Figura 20. El MCA^{+AβOs} potencia el efecto de altas concentraciones de NMDA de promover la activación de caspasa-3 en las neuronas. (A) Imágenes representativas de la caspasa-3 activada en neuronas después de 24 horas de co-incubación de MCA^{+AβOs} con NMDA (50 μM y 100 μM). MCA^{Control} fue usado como medio control y tapsigargina 20 μM se usó como inductor de muerte apoptótica (control positivo). Caspasa-3 activada se visualiza en verde, el marcador neuronal βIII-tubulina en rojo y DAPI en magenta. Barra 10μm. (B), Cuantificación del panel A. Las barras representan el promedio ± SEM de 3 experimentos independientes. Se contó el número de células caspasa-3 positivas por cada condición experimental y se normalizó con respecto al control. La significancia de las diferencias fue determinada por ANOVA de 1 vía, post-test Bonferroni.

Consistente con el resultado anterior, el MCA^{+AβOs} no generó un aumento significativo del número de núcleos TUNEL positivos comparado con el MCA^{control} (Figura 21A). El tratamiento con NMDA 50 μM genera un promedio de 26% de células TUNEL positivas, casi el doble que el MCA^{control} o el MCA^{+AβOs} ($p < 0,001$). No obstante, el tratamiento del MCA^{+AβOs} con NMDA 50 μM sólo produce un 29% de núcleos apoptóticos/campo, un aumento significativo comparado con MCA^{+AβOs} ($p < 0,001$) pero no significativo con respecto a NMDA 50 μM (ns, Figura 21B). La incubación con NMDA 100 μM produce un 31% de células TUNEL positivas y el tratamiento de NMDA 100 μM con MCA^{+AβOs} genera un 38% de núcleos apoptóticos/campo, una diferencia estadísticamente significativa con respecto al medio MCA^{+AβOs} y a la condición NMDA 100 μM ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente).

En resumen, los resultados de caspasa-3-activada y el ensayo de TUNEL revelaron que el MCA^{+AβOs} no produce un aumento significativo de la ejecución de la muerte apoptótica, evaluada por la activación de la caspasa ejecutora caspasa-3 o la fragmentación del ADN. Sin embargo, el MCA^{+AβOs} en presencia de un estímulo excitotóxico, como el NMDA, produce un efecto deletéreo sinérgico que culmina en un aumento de la apoptosis neuronal a las 24 horas de tratamiento.

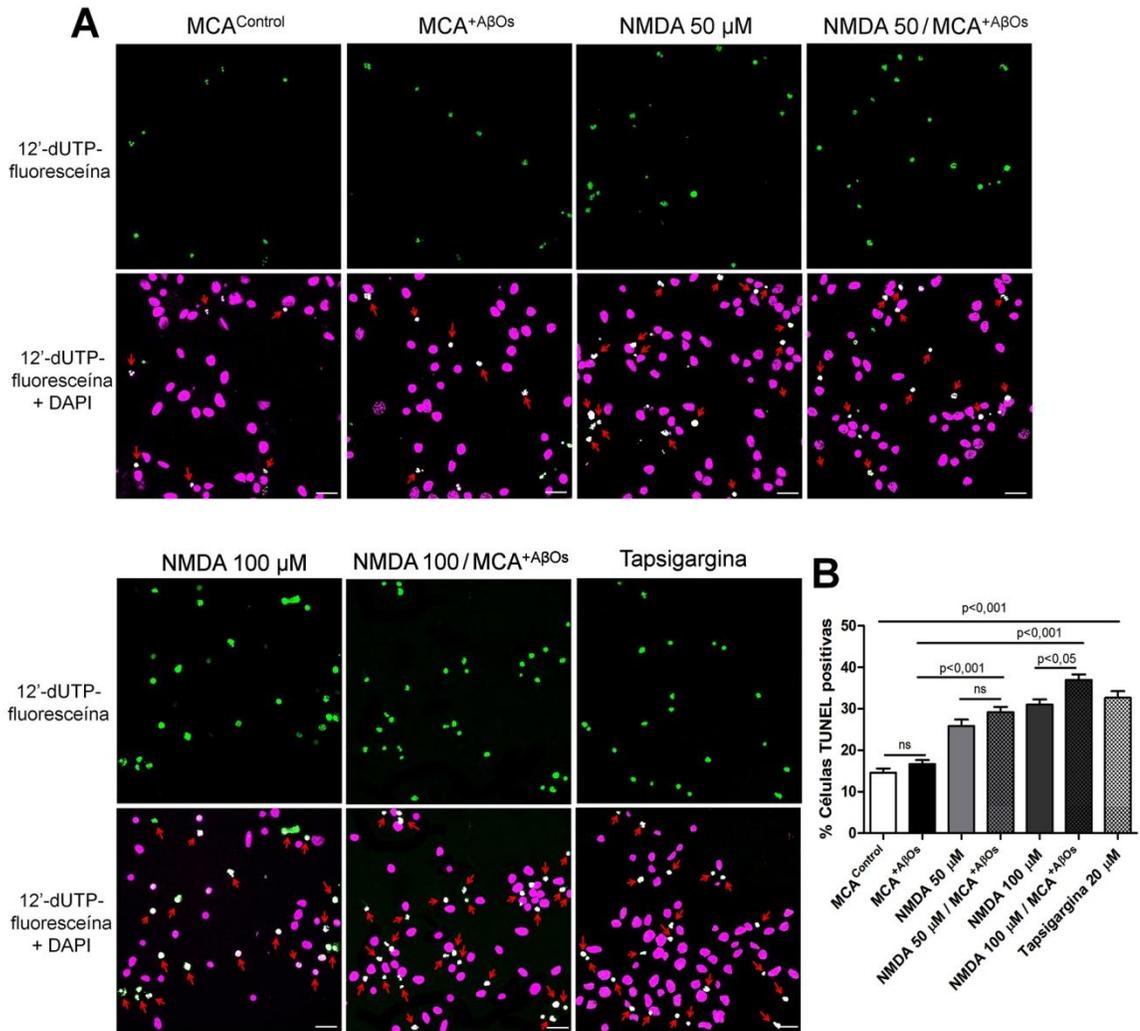


Figura 21. El MCA^{+AβOs} potencia el efecto de altas concentraciones de NMDA de aumentar el número de núcleos apoptóticos. (A) Imágenes representativas del ensayo de TUNEL después de 24 horas de la co-incubación de MCA^{+AβOs} con NMDA. MCA^{Control} fue usado como medio control y tapsigargina 20 μM se usó como control positivo. Los núcleos apoptóticos marcados con nucleótido dUTP-12-fluoresceína se visualizan en verde y los núcleos totales en magenta. La sobreposición del color magenta y verde se distingue en color blanco y se indica con flechas rojas. Barra de escala: 10μm. (B), El porcentaje de núcleos apoptóticos se obtuvo contando el número de núcleos apoptóticos dividido por el número total de células en el campo por 100, para cada una de las 10 imágenes de cada condición experimental. Luego los valores se normalizaron con respecto al control. Las barras representan el promedio ± SEM en cada condición experimental. La significancia de las diferencias fue determinada por ANOVA de 1 vía, post-test Bonferroni de 3 experimentos independientes.

4. DISCUSIÓN

En esta tesis exploramos la interacción entre los A β O_s, los astrocitos y las neuronas, y probamos si los astrocitos estimulados con los A β O_s se activaban y generaban mediadores que producían cambios en la expresión de genes asociados a viabilidad neuronal. Los resultados sugieren que pSer-STAT3 neuronal, una de las formas fosforiladas de STAT3, es importante para la expresión de genes blancos cuya actividad es obstruida por el medio de astrocitos estimulados con los A β O_s.

4.1 Concentraciones subletales de A β O_s producen la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas

La máxima actividad transcripcional de STAT3 se obtiene tras la fosforilación del residuo serina 727 (Decker and Kovarik, 2000; Wen et al., 1995), sin embargo, los factores que determinan la localización nuclear de pSer-STAT3 son desconocidos.

Nosotros encontramos que el tratamiento de cultivos neuronales ricos en astrocitos con concentraciones sub-letales de A β O_s disminuyó la localización nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas con un comportamiento en forma de U. Mientras que a concentraciones entre 0,05- y 0,1 μ M no se observa un cambio en la señal nuclear de pSer-STAT3, entre 0,2-0,5 μ M hay una disminución de la señal y a concentraciones de 1-5 μ M hay un aumento de la señal nuclear de pSer-STAT3, sin diferencias significativas con respecto a la situación control. Dado que los dímeros, trímeros y tetrameros actúan como núcleos de agregación de A β generando oligómeros grandes y protofibrillas in vitro (Bernstein et al., 2009; Bieschke et al., 2011; Garai and Frieden,

2013; Podlisny et al., 1995; Tsigelny et al., 2014) y que la fibrilación es un proceso altamente favorecido por el aumento de la concentración de A β y el tiempo transcurrido a 37°C (Pike et al., 1991; Stine et al., 2003), es posible que la formación de oligómeros de alto peso molecular o fibrillas disminuya la disponibilidad de oligómeros pequeños en el espacio extracelular, generando un efecto menos tóxico y por lo tanto, no se observe un efecto en la señal de pSer-STAT3. Los oligómeros solubles son más neurotóxicos que las protofibrillas, ya que afectan principalmente la actividad sináptica y la potenciación a largo plazo (Ferreira et al., 2015; Lambert et al., 1998; Shankar et al., 2007).

Todas las especies oligoméricas identificadas en nuestra preparación han sido ligadas a los efectos tóxicos del A β (Benilova et al., 2012; Ono et al., 2009) a excepción del monómero, el cual ha sido descrito como neuroprotector (Giuffrida et al., 2009). Si bien aún existe controversia acerca de cuál especie soluble es la más tóxica, los oligómeros de bajo peso molecular (dímeros estables en SDS, trímeros y tetrameros) causan pérdida de la sinapsis (Shankar et al., 2007) y afectan fuertemente la plasticidad sináptica (Ferreira et al., 2015) y al citoesqueleto (Brouillette et al., 2012; Davis et al., 2011). Dímeros aislados de cerebros de pacientes o de líquido cefalorraquídeo afectan las sinapsis in vivo (Klyubin et al., 2008; Shankar et al., 2008) y su neutralización con anticuerpos monoclonales corrige los defectos en la plasticidad sináptica (Klyubin et al., 2008; O'Nuallain et al., 2011). Los trímeros correlacionan con la neurotoxicidad in vitro (Hung et al., 2008; Townsend et al., 2006). Por su parte, los oligómeros 9-mers y los 12-mers han sido ligados al déficit cognitivo y de memoria en animales transgénicos (Lesne et al., 2006).

4.2 La interacción astrocito-neurona media la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por los A β O.

La enfermedad de Alzheimer (EA), al igual que otras enfermedades neurodegenerativas, está acompañada por una marcada activación glial (Bouvier and Murai, 2015; Heneka et al., 2015). Aunque es un fenómeno más notorio alrededor de los depósitos de A β en las etapas tardías de la enfermedad, las microglías y astrocitos activados también aparecen al comienzo de los síntomas clínicos (Carter et al., 2012; Scholl et al., 2015; Yokokura et al., 2017), sugiriendo que estrategias de modulación glial podrían enlentecer la progresión de la EA: Los fenotipos activados de las células gliales se relacionan con las características del insulto y finalmente se convierten en importantes perpetradores de la respuesta inflamatoria y potencialmente de la disfunción neuronal.

El factor de transcripción STAT3 es importante en la respuesta de “sobrevivencia” neuronal en condiciones patológicas (Jung et al., 2009; Schweizer et al., 2002). En esta tesis se mostró que el tratamiento de cultivos neuronales ricos en astrocitos con los A β O no cambió la localización de STAT3 total o de pTyr-STAT3, sugiriendo que los A β O sólo producen un efecto en la depleción nuclear de la forma fosforilada en el residuo serina 727 (pSer-STAT3) (Figura 3) y de una manera dosis-dependiente (Figura 4). Interesantemente, ni la depleción nuclear de pSer-STAT3 (Figura 5) ni cambios en la fosforilación del residuo serina 727 (Figura 7) se observaron en los cultivos neuronales pobres en astrocitos tratados con A β O. Esos resultados sugieren que la depleción nuclear de pSer-STAT3 requiere de la presencia de astrocitos (Figuras 5A y 5B) y de algún mediador liberado por ellos ya que la adición de un medio

condicionado de astrocitos (previamente estimulado con 1 o 3 dosis de A β Os (MCA^{+A β Os}) a los cultivos neuronales pobres en astrocitos, causó una depleción nuclear de pSer-STAT3 similar a la observada en los cultivos neuronales ricos en astrocitos y dependió de la dosis de A β Os utilizada (Figura 5E, F). Además, se demostró que los A β Os indujeron la activación de los astrocitos mediante un notorio aumento de STAT3 en el núcleo y GFAP en las prolongaciones (Figura 6). Esto concuerda con publicaciones que han demostrado que STAT3 es un importante inductor de la reactividad en astrocitos en modelos degenerativos como la EA y la enfermedad de Huntington (Ben Haim et al., 2015; Ceyzeriat et al., 2016). Entonces los astrocitos activados producto de la estimulación con los A β Os podrían liberar agentes/mediadores que median la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas.

Notablemente, identificamos mediante inmunocitoquímica y western blot que los niveles de pSer-STAT3 total, nuclear y citoplasmático en las neuronas disminuyeron significativamente después del tratamiento de los cultivos neuronales ricos en astrocitos con A β Os o después del tratamiento de los cultivos neuronales pobres en astrocitos con el MCA^{+A β Os} (Figura 8A y 8B). Estos resultados sugieren la desfosforilación del residuo serina 727 de STAT3 mediado por una serina fosfatasa. Calcineurina es una serina/treonina fosfatasa que podría estar implicada en este proceso ya que los A β Os aumentan la proteólisis de calcineurina en neuronas hipocámpales de cultivo primario, generando una variante activa constitutivamente (Mohammad Abdul et al., 2011). Además, la calcineurina truncada aumentó la actividad de caspasa 3 y la apoptosis en el hipocampo del ratón transgénico Tg2576-APP^{swe} (D'Amelio et al., 2011), sugiriendo una pérdida de la supervivencia neuronal que podría ser mediada por STAT3.

4.3 Los mediadores liberados en el MCA^{+AβOs} producen aumentos del tono oxidativo neuronal

4.3.1. Los mediadores

Los astrocitos poseen receptores llamados Toll-like receptors (TLR) 2 y 4 (Jin et al., 2008), los cuales reconocen clásicamente la presencia del lipopolisacárido (LPS) (Yang et al., 1998) y el péptido Aβ. Los TLRs inducen la activación de las vías de señalización intracelular que favorecen la expresión de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y la activación del complejo de la NADPH oxidasa (NOX), produciendo la liberación de óxido nítrico y H₂O₂, respectivamente (Forloni et al., 1997; Tahara et al., 2006).

Por otra parte, los AβOs disminuyen los niveles de glutatión reducido en astrocitos y neuronas (Abramov et al., 2003; Angelova and Abramov, 2014), sugiriendo un posible cambio en el tono oxidativo basal de ambos tipos celulares mediado por el Aβ. En nuestro modelo experimental, los AβOs indujeron un fenotipo reactivo en los astrocitos que estimuló la liberación de H₂O₂ y óxido nítrico. Mediante el ensayo de catalasa extracelular en un cultivo de neuronas rico en astrocitos, se demostró que la neutralización del H₂O₂ eliminó completamente la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por los AβOs. Sin embargo, el complejo NOX está presente en astrocitos y en neuronas, por lo tanto, los AβOs podrían estar activando a la NOX de ambos tipos celulares. Así como hay evidencias que los AβOs activan la NOX de los astrocitos (Abramov et al., 2004a; Abramov and Duchon, 2005; Wyssenbach et al., 2016), también existe evidencia que el receptor de NMDA y los AβOs inducen la producción de ROS en las neuronas a través de la activación de la NOX (Brennan et al., 2009;

Shelat et al., 2008) y que esa activación genera una alteración en la plasticidad sináptica y problemas de memoria (Kishida and Klann, 2007). Por lo tanto, en ese ensayo (Figura 9A y B), no se puede asegurar que el H_2O_2 neutralizado por la enzima provenga exclusivamente de los astrocitos. Sin embargo, el ensayo con Amplex Red® permitió dilucidar que el medio condicionado de los astrocitos estimulados con los $A\beta$ Os (MCA^{+A β Os}) posee aproximadamente tres veces más concentración de H_2O_2 comparado con el MCA^{control}, el cual no fue tratado con los $A\beta$ Os (Figura 9C), lo cual indica que nuestra preparación de $A\beta$ Os activa a los astrocitos primarios y genera un aumento significativo del H_2O_2 en el medio condicionado que luego se usa en los cultivos neuronales pobres en astrocitos.

El experimento donde se usó la catalasa sugirió que el H_2O_2 podría ser el principal mediador liberado ya que esta enzima recuperó en un 100% la localización nuclear de pSer-STAT3, sin embargo, la hemoglobina produjo una recuperación parcial aunque mayor a la esperado (aproximadamente el 70% de la respuesta). La hemoglobina es conocida por ser un fuerte neutralizador de óxido nítrico (Martin et al., 1985), no obstante, se ha sugerido que la hemoglobina posee actividad peroxidasa (Widmer et al., 2010) en presencia de los nucleótidos piridínicos NADH y NADPH, con una capacidad menor que catalasa pero mucho mayor que el sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa (Masuoka et al., 2003). La hemoglobina se oxida en presencia del H_2O_2 y los nucleótidos de piridina permiten su reducción. Esta actividad peroxidasa podría en parte explicar la gran recuperación observada en la Figura 11.

La activación de la iNOS ha sido demostrado en astrocitos estimulados con oligómeros del péptido $A\beta$ in vitro e in vivo (Heneka et al., 2001; Luth et al., 2001; Wong et al.,

2001), mediante un proceso que también requiere la participación de citoquinas pro-inflamatorias (Akama et al., 1998; Rossi and Bianchini, 1996; Urrutia et al., 2017). El óxido nítrico, al igual que el peróxido de hidrógeno, actúa como un segundo mensajero o como una molécula oxidante dependiendo de su concentración. La producción excesiva de óxido nítrico se ha vinculado con la apoptosis aunque su efecto pro-apoptótico es extremadamente controlado. Mas bien, la apoptosis se correlaciona con el aumento de los niveles de las proteínas modificadas por el óxido nítrico (Lechner et al., 2005), principalmente por la S-nitrosilación de proteínas, el cual es el mecanismo mejor estudiado de las modificaciones inducidas por el óxido nítrico (Lillig and Holmgren, 2007; Lipton et al., 1998). La S-nitrosilación involucra el acoplamiento de óxido nítrico (NO) al grupo sulfidrido de las cisteínas y constituye un importante mecanismo que regula la actividad biológica de varias proteínas y por lo tanto, de una pléthora de procesos biológicos (Lillig and Holmgren, 2007; Wang et al., 2010). Entonces, la excesiva producción de óxido nítrico podría estar produciendo modificaciones oxidativas en las neuronas y en los astrocitos, ya que ambos tipos celulares expresan la iNOS, generando perturbaciones de la señalización celular y en biomoléculas esenciales

Por otra parte, los A β Os indujeron un aumento significativo de los niveles de expresión de los ARNm de IL-6 y TNF α ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente) en los astrocitos primarios (Munoz et al., 2018). Sin embargo, sólo la secreción de IL-6 presentó un aumento estadísticamente significativo tras la exposición a los A β Os ($p < 0,05$, Figura 10B). La secreción de TNF- α en el medio condicionado no varió entre el MCA^{control} y el MCA^{+A β Os}, manteniéndose como una secreción basal. Dado que IL-6 no es una citoquina iniciadora de la respuesta inflamatoria (como lo es TNF- α) sino más bien es

una citoquina reguladora, el aumento de la expresión y secreción no es suficiente para activar fuertemente a los astrocitos. Hay evidencias que en estados inflamatorios o en enfermedades, TNF- α y otros mediadores como IL-1 β son predominantemente secretados por las microglías activadas. La secreción de TNF- α e IL-1 β activa a las células gliales de forma autocrina y paracrina, induciendo una mayor producción de citoquinas y astrogliosis, generando un círculo vicioso que conlleva a la degeneración neuronal (Glass et al., 2010). Dado que se trabajó con un cultivo de astrocitos purificados más que cultivos de glia mixta (astrocitos-microglías), no se logró imitar el ambiente inflamatorio descrito en modelos de animales transgénicos ni en los pacientes con EA (Bouvier et al., 2016; Carrero et al., 2012).

IL-6 es una citoquina multifuncional que tiene un rol fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria (Raivich et al., 1999). IL-6 pertenece a la familia de las citoquinas neuropoietinas (Hopkins and Rothwell, 1995) y tiene efectos neurotróficos directos e indirectos en las neuronas (Benveniste, 1998). IL-6 promueve la astrogliosis (Selmaj et al., 1990), activa a la microglia (Heyser et al., 1997) y estimula la producción de proteínas asociada a la fase de respuesta aguda. STAT3 controla la expresión de IL-6 y de su receptor, por lo que se ha sugerido que STAT3 es un inductor de la respuesta inflamatoria en los astrocitos. En el caso de TNF- α , éste juega un rol esencial en la iniciación y regulación de la cascada de citoquinas durante la respuesta inflamatoria. Ya que los niveles de expresión de TNF- α en un cerebro sano son bajos, es difícil determinar el rol preciso de esta citoquina bajo condiciones fisiológicas. TNF- α tiene la habilidad de iniciar cascadas inflamatorias, modificando la actividad y función de los astrocitos (Belanger et al., 2011; Dumont et al., 2014; van Kralingen et al., 2013), induciendo vías inflamatorias dependientes de NF- κ B (Phulwani et al., 2008) y STAT3

(Ben Haim et al., 2015), gatillando la producción de citoquinas como IL-6 (Aloisi et al., 1992; Norris et al., 1994; Sawada et al., 1992) e IL-1 β (Didier et al., 2003). La interleuquina IL-1 β es principalmente sintetizada y secretada por las microglías activadas (Allan et al., 2005; Basu et al., 2004; John et al., 2005; Rothwell and Luheshi, 2000), y los A β O s inducen la maduración de IL-1 β en la microglía aumentando su neurotoxicidad (Parajuli et al., 2013). Los astrocitos primarios muestran un aumento de pro-IL-1 β tras la exposición a A β O s a concentraciones mayores a las usadas en esta tesis (White et al., 2005). Astrocitos de pacientes con EA y de ratones transgénicos presentan un aumento de la IL-1 β madura, en las etapas tardías de la enfermedad (Bouvier et al., 2016). Quizás es posible observar una mayor inducción de IL-1 β en los astrocitos con un tratamiento crónico con A β O s más que con tratamientos agudos.

A pesar del clásico rol deletéreo de las citoquinas pro-inflamatorias en la EA, se ha reportado que TNF- α e IL-1 tienen propiedades neuroprotectoras en los cerebros con EA y en modelos transgénicos (Akiyama et al., 2000; Lemere, 2007; Shaftel et al., 2007), demostrando que la regulación de la respuesta inflamatoria es clave en la mantención de la homeostasis celular.

Estos resultados están en concordancia con reportes en la literatura que describen un fenotipo pro-inflamatorio en astrocitos estimulados con A β O s in vivo e in vitro (Carrero et al., 2012; White et al., 2005).

4.3.2 El MCA^{+AβOs} aumenta el tono oxidativo neuronal

Las neuronas mantienen la homeostasis redox controlando la razón de especies oxidadas y reducidas. El glutatión reducido (GSH) es la principal defensa antioxidante de las neuronas y cambios en la dupla glutatión/glutatión disulfido (GSH/GSSG) ha sido implicada en la etiología o progresión de la EA (Ballatori et al., 2009; Ren et al., 2017). La deficiencia de GSH aumenta la susceptibilidad al estrés oxidativo, causando modificaciones oxidativas reversibles o irreversibles en proteínas sensibles, lo cual puede cambiar la actividad o función de éstas (Finkel and Holbrook, 2000; Wang et al., 2012). Los astrocitos proporcionan precursores de GSH a las neuronas (Dringen, 2000), sin embargo, el péptido Aβ₁₋₄₂ induce estrés oxidativo en los astrocitos, disminuyendo los niveles de GSH en ellos y en las neuronas (Abramov et al., 2003). La γ-glutamilcisteína etil ester (un compuesto que aporta el sustrato limitante en la biosíntesis de GSH), el antioxidante vitamina E y el N-acetil-cisteína, inhiben el daño oxidativo neuronal y las señales de calcio aberrantes inducidas por el péptido Aβ, produciendo neuroprotección (Boyd-Kimball et al., 2005; Yatin et al., 2000); Paula-Lima et al., 2011; SanMartin et al., 2017).

Mediante el uso de maleimidias conjugadas con fluoróforos se demostró que el MCA^{+AβOs} produjo un aumento de las cisteínas oxidadas de las proteínas totales (Figura 12A) y un incremento significativo de la oxidación total de las neuronas (p<0,001) similar a lo producido con el oxidante t-BHP (Figura 12B). Las maleimidias son reactivos que identifican grupos tioles (-OH), de forma más selectiva que las iodoacetamidias, ya que no presentan reacción con las histidinas o las metioninas. Los tioles son un grupo funcional extremadamente reactivo en presencia de ROS, actuando

como sensores primarios (Winterbourn and Hampton, 2008). Si bien el GSH se encuentra en concentraciones milimolares dentro de las células y la determinación de la dupla GSH/GSSG es un reconocido método para identificar cambios en el tono redox, las maleimidas identifican todos los tioles que se modifican producto de los ROS (GSH y del resto de las proteínas), por lo cual, el uso de las maleimidas es un mejor método que la dupla GSH/GSSG para identificar cambios en el tono redox en un rango fisiológico, ya que la razón GSH/GSSG sólo limita la observación a los cambios del GSH.

En esta tesis se evidenció un aumento de la oxidación total de las proteínas del soma de las neuronas después del tratamiento con el MCA^{+AβOs}, sino que también hay un aumento significativo del peróxido de hidrógeno en el MCA^{+AβOs} comparado con el MCA^{Control} mediante Amplex Red (Figura 9C). Además, utilizando la herramienta Hypercyto se demostró un aumento significativo del peróxido de hidrógeno en el soma y en las neuritas de las neuronas hipocampales tras el tratamiento con el MCA^{+AβOs} comparado con el tratamiento con el MCA^{Control} (Figura 13) (Munoz et al., 2018). Hyper es una quimera en donde 2 cisteínas del dominio OxyR forman un puente disulfuro reversible el cual induce un cambio conformacional. La gran ventaja de Hyper es que tiene una afinidad por el peróxido de hidrógeno a un nivel submicromolar y que se ha mostrado que es insensible a otros oxidantes como anión superóxido, GSSG, óxido nítrico y peroxinitrito. Entonces, esta herramienta genética permite asegurar que la medición de peróxido de hidrógeno es específica y ocurre dentro de un rango fisiológico.

Luego se evidenció que el aumento en el tono oxidativo fue abolido completamente con

el uso de cinco diferentes tipos de antioxidantes: EUK-134, MCI-186, DMTU, Tempol y etil galato, los cuales por si solos no afectaron de forma significativa el tono redox neuronal (Figura 12, Muñoz et al., 2018). De estos cinco antioxidantes, sólo EUK-134, MCI-186 y DMTU abolieron de forma parcial la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA^{+AβOs} (Figura 14, Muñoz et al., 2018). Tanto EUK-134 como tempol son miméticos de la enzima SOD, sin embargo, EUK-134 pertenece al grupo de compuestos llamado complejos manganeso (Mn)-saleno y posee actividad catalasa (Baudry et al., 1993; Decraene et al., 2004; Sharpe et al., 2002) y tempol posee propiedades secuestradoras de ROS (Mitchell et al., 1990; Thiemermann, 2003) pero no actividad catalasa. Además de su actividad peroxidasa, EUK-134 tiene el potencial de catalizar el óxido nítrico y de su derivado peroxinitrito, produciendo agua, nitrito y nitrato (Sharpe et al., 2002). Entonces, EUK-134 tiene la capacidad de neutralizar el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido (el cual dismuta a peróxido de hidrógeno) reduciendo la generación de radical hidroxilo (Samai et al., 2007). Esto podría explicar por que EUK-134 pudo evitar parcialmente la depleción nuclear de pSer-STAT3 y no así el tempol (Figura 14B), ya que según los experimentos de las Figuras 9 y 11, el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico son parte de los mediadores que participan de la depleción nuclear de pSer-STAT3. MCI-186 y el DMTU son potentes neutralizadores del radical hidroxilo, cuya formación depende de la presencia de peróxido de hidrógeno y el hierro redox activo (éste último actúa como un metal catalizador de la reacción de Fenton). Ya que ambos neutralizadores recuperan de forma parcial la señal nuclear de pSer-STAT3 y dado que hay evidencia de un aumento de peróxido de hidrógeno en el MCA^{+AβOs}, existe la posibilidad que el radical hidroxilo se esté produciendo en el citoplasma de las neuronas y se esté afectando el tono oxidativo de éstas.

Diversos reportes muestran que STAT3 sufre varias modificaciones oxidativas, las cuales afectan su actividad transcripcional. STAT3 sufre S-glutationilación (Xie et al., 2009; Buttirini et al., 2011; Buttirini et al., 2013, Buttirini et al., 2014) y S-nitrosilación (Kim et al., 2014). La S-glutationilación fue asociada con el estrés oxidativo producto de la caída del GSH (Butturini et al., 2011) e inhibió la fosforilación del residuo tirosina 705 produciendo una pérdida de la acumulación nuclear de STAT3 y evitó la expresión de genes blancos (Xie et al., 2009), entre ellos, de los genes Bcl-2 y survivina llevando a las células a la muerte apoptótica (Butturini et al., 2013). El agente reductor ditioneitol revirtió completamente la S-glutationilación sugiriendo la formación de puentes disulfuro (Butturini et al., 2014) y análisis por espectrometría de masas identificó 2 residuos cisteína glutacionilados (Cys328 y Cys542) dentro del dominio de unión al ADN y el dominio conector, respectivamente. Ensayos in vitro de actividad quinasa confirmaron la importancia de ambas cisteínas en el complejo mecanismo regulatorio redox (Buttirini et al., 2014). Estas evidencias sugieren que existe una posible comunicación cruzada entre fosforilación y glutacionilación y apunta a que STAT3 efectivamente es una molécula susceptible a la regulación redox.

Por otra parte, la S-nitrosilación es una modificación post-traducciona mediada por el óxido nítrico y por el S-nitrosoglutati6n (GSNO) (Kim et al., 2014; Singh et al., 2015). La S-nitrosilaci6n de STAT3 ocurre en la Cys259 e inhibe su interacci6n con el ADN, afectando la transactivaci6n inducida por IL-6 y la expresi6n de genes blancos asociados a sobrevida y proliferaci6n en microglia (Kim et al., 2014).

Por lo tanto, dado el aumento del tono oxidativo de las neuronas producto del tratamiento con el MCA^{+A β Os}, existe la posibilidad que el STAT3 sufra alguna

modificación oxidativa que le impida llevar a cabo su función como factor de transcripción al alterar cisteínas importantes en el dominio de unión al ADN, lo que afectaría la transcripción de genes blancos.

4.4 Las señales de calcio neuronales mediadas por el RyR y la calcineurina median la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA^{+AβOs}

Los ROS y el óxido nítrico son importantes inductores de la señalización de calcio en las neuronas a través de la activación de canales de calcio intracelulares y de la membrana plasmática (Paula-Lima et al., 2014; Yermolaieva et al., 2000). Con esta evidencia se probó el posible involucramiento de las señales de calcio en la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA^{+AβOs}. El MCA^{+AβOs} produjo un aumento de la señal de calcio constante en el tiempo (Figura 15A). Esta señal de calcio fue completamente inhibida al pre-incubar con el quelante de calcio llamado BAPTA-AM. Además, la pre-incubación con BAPTA previno la depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas aunque estas fueron tratadas con el MCA^{+AβOs}, sugiriendo fuertemente que la señal de calcio es fundamental para la depleción de pSer-STAT3. Después se evaluó si esta señal de calcio dependía de aumentos del tono oxidativo y el pre-tratamiento de las células con los antioxidantes EUK-134, MCI-186 y DMTU completamente abolió la señal de calcio inducida por el MCA^{+AβOs} evidenciando que el aumento del tono oxidativo es clave en la generación del aumento del calcio intracelular (Figura 15A y 15B, Muñoz et al., 2018). El receptor de ryanodina (RyR) es un canal de calcio tremendamente susceptible al tono oxidativo (Bull et al., 2008; Lacampagne et al., 2017; Lanner et al., 2010; Liu et al., 2012; Marengo et al., 1998) y aumenta el flujo de calcio cuando se modifican oxidativamente ciertas cisteínas

susceptibles (Bull et al., 2003; Hidalgo et al., 2000; Marengo et al., 1998). Dado esto, se evaluó si el RyR estaba involucrado en este aumento de calcio intracelular inducido por el $MCA^{+A\beta Os}$. La inhibición del RyR con ryanodina (50 μM) abolió completamente la depleción nuclear inducida por el $MCA^{+A\beta Os}$ observándose una señal muy parecida al $MCA^{Control}$ (ns, Figura 16B), indicando que el RyR media el aumento del calcio intracelular en nuestras condiciones experimentales. Además, en los estudios de la cinética de calcio se demostró que al quelar el calcio intracelular con BAPTA y luego estimular la liberación del calcio desde el RyR con el agonista del RyR llamado 4-CMC, la magnitud de la liberación del calcio es similar a la observada con el tratamiento con el $MCA^{+A\beta Os}$ (Figura 16C), aunque éste último presenta una cinética constante y más prolongada en el tiempo comparada con el CMC. La curva bifásica que se observa en la condición BAPTA/CMC se puede explicar de la siguiente forma: el 4-CMC produce una liberación masiva de calcio a nivel milimolar que el BAPTA no es capaz de buferizar completamente al principio, por lo tanto, este calcio liberado se une al Fluo-3 y se genera el aumento de la intensidad de fluorescencia del Fluo-3. Sin embargo, a medida que pasa el tiempo el BAPTA va uniendo calcio que inicialmente estaba unido al Fluo-3. El BAPTA posee una constante de disociación pequeña, es decir, une el calcio con alta afinidad, $K_d = 160$ nM en ausencia de Mg^{2+} , mientras que el Fluo-3 posee una $K_d = 390$ nM (datos extraídos de Thermo Fischer y el handbook de molecular probes, respectivamente). Comparando las K_d se infiere que el BAPTA-AM une más fuertemente el calcio que el Fluo-3, por lo tanto, una vez que el calcio se disocia del Fluo-3 se une al BAPTA con mayor afinidad, generando una disminución de la intensidad de fluorescencia del Fluo-3 tal como se observa en la gráfica (Figura 16C).

La ryanodina es un alcaloide que actúa como un modulador del RyR produciendo diferentes efectos dependiendo de su concentración. A baja concentración (0,01-10 μM) produce un aumento de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, mientras que altas concentraciones (sobre 10 μM) induce una inhibición del canal, por lo tanto, la ryanodina puede aumentar o disminuir la probabilidad de apertura del RyR de una forma dosis-dependiente. Dentro del RyR se han identificado sitios de alta (K_d 1-10 nM) y baja (K_d 1-10 μM) afinidad (Sutko et al., 1997).

Altas concentraciones de ryanodina (micromolar) en un largo tiempo, inicialmente estimulan la liberación de calcio desde el RyR ya que se unen a los sitios de unión de alta afinidad, sin embargo, a medida que pasa el tiempo inhiben al canal (Chu et al., 1990). Esta disminución en la probabilidad de apertura del canal correlaciona con la interacción de ryanodina con los sitios de unión de baja afinidad del RyR. Cuando la concentración intracelular de ryanodina alcanza niveles suficientes para permitir la interacción con los sitios de baja afinidad, la permeabilidad del calcio se reduce y el canal se cierra. Por esta razón, cuando se inhibió el canal con ryanodina (50 μM) por 1 hora y luego se aplicó 4-CMC (un fuerte agonista del RyR), se observa una disminución de la fluorescencia del Fluo-3 debida probablemente, a que la ryanodina inhibió gran parte de los RyR de la neurona, no obstante, en el momento que el 4-CMC se une al RyR, abre los canales que no estaban inhibidos completamente y permite una ligera liberación de calcio, entonces la ryanodina que se encuentra en exceso se une a esos canales y los cierra completamente, por lo cual, ya no hay liberación de calcio por parte del RyR (Figura 16C). Este experimento permitió demostrar que la ryanodina efectivamente inhibió al RyR y que la pre-incubación de la ryanodina previno el aumento del calcio inducido por el $\text{MCA}^{+\beta\text{Os}}$ (Figura 16C y 16D), por lo tanto, el RyR

está involucrado en este aumento del calcio intracelular.

Dado el aumento del tono oxidativo y del calcio citoplasmático, se quiso investigar el posible involucramiento de la calcineurina en nuestro fenómeno, ya que calcineurina es una serina/treonina fosfatasa cuya actividad depende de calcio e interacciona con STAT3 (Murase, 2013; Yang et al., 2016). Hay consenso que la hiperactivación de calcineurina es un contribuidor clave en la patofisiología y síntomas clínicos de la EA (Abdul et al., 2009; Furman et al., 2012; Norris et al., 2005; Reese et al., 2008; Rojanathammanee et al., 2015; Wu et al., 2010). Estos efectos nocivos producto de la desregulación de calcineurina podrían surgir a través de alteraciones únicas en neuronas y células gliales (Abdul et al., 2010; Reese and Taglialatela, 2011).

El uso de dos aproximaciones experimentales usando adenovirus dilucidó que efectivamente la inhibición de calcineurina con el péptido inhibitorio CAIN abolió la depleción de pSer-STAT3 neuronal inducida por el MCA^{+AβOs}. Además, encontramos que la sobreexpresión de una variante de calcineurina constitutivamente activa, produjo una mayor depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas, aunque los niveles de no fueron tan bajos como se esperaba, considerando la eficiencia de infección del virus y que se estaba sobreexpresando una calcineurina activa (Figura 17). Este resultado sugiere que otro mecanismo dependiente de calcio y del tono redox puede estar afectando la fosforilación del residuo serina 727 de STAT3. Por lo tanto, de forma alternativa el eje de señales ROS-calcio podría inhibir la actividad de las serina quinasas relevantes para la fosforilación de STAT3. Recientemente, se ha evidenciado que Cdk5 y ERK, dos serina quinasas que fosforilan a STAT3, sufren modificaciones oxidativas que disminuyen su actividad quinasa y por lo tanto podría estar participando

de este fenómeno.

La serina/treonina quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) fosforila el residuo serina 727 de STAT3 (Courapied et al., 2010; Hsu et al., 2013; Lam et al., 2015) y exhibe una actividad quinasa “reducida” tras la S-nitrosilación (Cdk5-SNO) de la Cys83, un residuo crítico en el bolsillo de unión del ATP de la quinasa (Zhang et al., 2010b). Además, Cdk5-SNO está altamente expresada en tejido postmortem de pacientes con EA pero no en cerebros de pacientes controles (Qu et al., 2011). Esta evidencia podría concordar con nuestro hallazgo que el MCA^{+AβOs} produce un aumento del tono oxidativo neuronal y esto podría modificar la actividad de serina quinasas, como un posible mecanismo de disminución de la fosforilación de STAT3 mediado por el MCA^{+AβOs}. Estos hallazgos están en discordancia con estudios clásicos que han mostrado que el aumento de la actividad de Cdk5 está ligado a la degeneración neuronal (Patrick et al., 1999). La activación de Cdk5 requiere estar asociada a p35, sin embargo, se ha identificado una acumulación de p25 (una forma truncada de p35) en neuronas de pacientes con EA, lo cual correlaciona con un aumento de la actividad quinasa de Cdk5 (Patrick et al., 1999). Consistente con este hallazgo, Qu y cols encontraron que la Cdk5-SNO (en donde los residuos Cys83 y Cys157 están nitrosilados) tiene una actividad quinasa aumentada (Qu et al., 2011). Al parecer las diferencias observadas en los resultados publicados que vinculan la S-nitrosilación de Cdk5 y cómo esto afecta su actividad quinasa, están dadas por el nivel del estrés nitrosativo inducido en los experimentos (Zhao et al., 2015). Recientemente, un estudio reveló que la S-nitrosilación de ciertas proteínas asociadas a neurodegeneración, tal como Cdk5, genera un incremento de la hiperfosforilación de tau y una alterada viabilidad neuronal (Wang et al., 2017).

Otra serina quinasa que ha sido asociada a la fosforilación del residuo 727 de STAT3 es ERK1/2 (Chung et al., 1997). La ERK es crítica para el aprendizaje humano (Costa et al., 2002) y regula diversos eventos neuronales dependientes de actividad (Grewal et al., 1999). Aunque la activación transitoria de ERK es importante en procesos de memoria, la activación persistente puede mediar la excitotoxicidad producto de la activación del NMDAR (Amadoro et al., 2006). Tanto en pacientes con EA como en modelos animales se ha identificado que ERK se encuentra activada en etapas tempranas, mientras que en las etapas tardías la activación de ERK está reducida (Dineley et al., 2001; Webster et al., 2006). La inyección intracerebroventricular de $A\beta$ inhibe la actividad de ERK en ratas (Jin et al., 2005). A nivel celular, el péptido $A\beta$ (o sus fragmentos) inhibe a ERK en neuronas hipocampales, células de neuroblastoma y endoteliales (Daniels et al., 2001; Magrane et al., 2006; Xie, 2004). Dada la importancia de ERK en el proceso de memoria y aprendizaje, la hipótesis que la hipo-activación de ERK en la EA contribuye al déficit cognitivo, es bastante factible.

Bajo estrés oxidativo, ERK sufre diversas modificaciones redox. Aparentemente, la S-nitrosilación de ERK ocurre en el residuo Cys183, inhibiendo su fosforilación (activación) y su actividad quinasa (Feng et al., 2013). Además, ERK sufre inactivación por la formación de cisteína-ácido sulfénico (Cys-SOH) mediado por anión superóxido (Luanpitpong et al., 2012). Asimismo, ERK1/2 sufre S-sulfenilación mediada por peróxido de hidrógeno, en respuesta a una variedad de señales proliferativas (Keyes et al., 2017).

Los antecedentes bibliográficos sugieren que dependiendo del nivel de estrés oxidativo al cual está expuesta la neurona, distintos mecanismos regulatorios podrían

manifestarse y alterar el funcionamiento de proteínas claves en respuestas ya sea de sobrevivencia o de apoptosis neuronal. Bajo estas circunstancias, el aumento del calcio intracelular y del estrés oxidativo inducido por el MCA^{+AβOs} podría activar a la fosfatasa calcineurina o bien, inhibir la actividad de serina quinasas como Cdk5 y ERK, defosforilando o disminuyendo la fosforilación del residuo 727 de STAT3, respectivamente.

4.5 El MCA^{+AβOs} disminuye los ARNm de Bcl-2 y survivina y potencia la muerte apoptótica inducida por un estímulo excitotóxico

STAT3 promueve la sobrevivencia de neuronas adultas en condiciones normales (Murase et al., 2012) y bajo condiciones patológicas (Jiang et al., 2014; Jung et al., 2009; Manickam and Tulsawani, 2014; Schweizer et al., 2002) En esta tesis se demostró que el MCA^{+AβOs} indujo una disminución significativa de los niveles de ARNm de Bcl-2 y survivina, proteínas que evitan la liberación de factores pro-apoptóticos y la activación de las caspasas, respectivamente, sugiriendo que el MCA^{+AβOs} afecta la actividad transcripcional de STAT3. Además se evidenció un ligero aumento de la razón pro-apoptótica Bax/Bcl-2 sugiriendo que se podría estar induciendo muerte apoptótica, al menos por la vía intrínseca. Ya que se han descrito diversas modificaciones oxidativas que afectan la unión al ADN y por lo tanto, la actividad de STAT3, se pensó que la incubación de un antioxidante con el MCA^{+AβOs} podría impedir el aumento del tono oxidativo y de esta forma se podrían re-establecer los niveles de ARNm de los genes que anteriormente fueron afectados por el MCA^{+AβOs}. Aunque se observa una recuperación de los niveles de ARNm a un nivel similar a los niveles observados con el tratamiento MCA^{Control}, las diferencias no resultaron ser

estadísticamente significativas debido a la gran dispersión de los datos producto de la gran variabilidad del modelo (Figura 19). Esto concuerda con los resultados de la Figura 14 en donde se muestra que ningún antioxidante, ni siquiera EUK-134, re-establece completamente la señal de pSer-STAT3 en el núcleo de las neuronas, considerando que esa fosforilación es importante para obtener la máxima actividad transcripcional.

Dado que existía literatura que relacionaba al aumento del tono oxidativo con STAT3 y la apoptosis mediada por caspasa-3 (Park et al., 2014), el siguiente paso fue determinar si el MCA^{+AβOs} ejecutaba la muerte apoptótica, sin embargo, el MCA^{+AβOs} no genera un aumento significativo de caspasa-3 activada o un mayor número de núcleos TUNEL+ comparado con el MCA^{Control}, al menos en la temporalidad estudiada (Figuras 20 y 21).

Dado que se ha planteado que un mecanismo primario en la neurodegeneración relacionada con la EA podría ser la baja expresión o el mal funcionamiento de los receptores y/o transportadores de glutamato en los astrocitos, lo cual se ha asociado a la hiperactividad neuronal observada en la EA (Abdul et al., 2009; Audrain et al., 2016; Hefendehl et al., 2016; Masliah et al., 1996; Masliah et al., 2000; Meeker et al., 2015; Mookherjee et al., 2011; Scimemi et al., 2013; Schallier et al., 2011; Sompol et al., 2017; Xu et al., 2016), se quiso determinar si el MCA^{+AβOs} en presencia de un estímulo excitotóxico como el NMDA producía un efecto sinérgico, es decir, más muerte apoptótica que el NMDA por si solo. El NMDA a las concentraciones utilizadas (50 y 100 μM) produce un aumento significativo de la activación de caspasa 3 y del número de núcleos TUNEL+ comparado con los tratamientos MCA^{Control} y MCA^{+AβOs}.

Efectivamente, la presencia del MCA^{+A β Os} con el NMDA genera más muerte apoptótica que el tratamiento con NMDA solo (Figura 20 y 21), por lo tanto, el MCA^{+A β Os} genera en las neuronas un efecto de sensibilización hacia la muerte apoptótica.

La hiperexcitabilidad es un fenómeno común en los cerebros de pacientes con EA y en modelos murinos de la enfermedad (Bakker et al., 2012; Bomben et al., 2014; Busche et al., 2008; Fontana et al., 2017; Grienberger et al., 2012; Kellner et al., 2014; Minkeviciene et al., 2009; Noebels, 2011; Palop et al., 2007; Putcha et al., 2011; Siskova et al., 2014; Vossel et al., 2016). Los astrocitos son la primera barrera que evita la hiperexcitabilidad en las redes neuronales ya que en el animal transgénico 5xFAD se ha visto que alteraciones en la vía de señalización mediada por NFAT producen una desregulación de los receptores de glutamato (Sompol et al., 2017). Además, los A β Os producen una reducción del transportador excitatorio aminoacídico 2 (EAAT2) (Abdul et al., 2009) y del transportador de glutamato (GLUT1) en la superficie celular de los astrocitos (Scimemi et al., 2013) y promueven el aumento de las concentraciones extracelulares de glutamato en cultivos primarios de hipocampo (Brito-Moreira et al., 2011), aumentando el curso temporal de la recaptura del glutamato. Entonces, la literatura sugiere que los A β Os facilitan un exceso de glutamato en el espacio extra-sináptico, estimulando cascadas de señalización en el astrocito que culminan en la desregulación de los transportadores de glutamato, generando un ambiente excitotóxico que conlleva finalmente a la muerte de las neuronas adyacentes.

Particularmente, en esta tesis se comprobó que los A β Os produjeron activación de nuestros astrocitos primarios (Figura 6), los cuales liberaron mediadores oxidativos e

inflamatorios al medio extracelular (Figura 9 y 11). Por lo tanto, en este contexto se puede inferir que la presencia de altas concentraciones de glutamato más el peróxido de hidrógeno y óxido nítrico podrían generar un efecto sinérgico promoviendo: 1) la oxidación neuronal y 2) la inducción de la señalización de calcio (ambas características clave de la EA), alterando respuestas de sobrevida y finalizando en una muerte apoptótica de la neurona (Figura 20 y 21).

La caspasa-3 es un ejecutor crítico de la apoptosis neuronal y es considerada un evento terminal que precede la muerte celular (Lakhani et al., 2006). La activación requiere el procesamiento proteolítico de su zimógeno inactivo en los fragmentos p17 y p12 y esa escisión requiere de un ácido aspártico en la posición P1 (Nicholson et al., 1995). El anticuerpo primario que se utilizó en esta tesis detecta específicamente los niveles endógenos del fragmento largo (17/19 kDa) de la caspasa-3. Dado que los niveles de caspasa-3 son mayores en cerebros de pacientes con EA que en controles de la misma edad (Shimohama et al., 1999), la inhibición de la activación de caspasa-3 se ha considerado una posible terapia contra la EA. La distribución nuclear de caspasa-3 activada observada en la Figura 20 está en concordancia con (Kamada et al., 2005), en donde se demostró que la subunidad p17 de la caspasa-3 se encuentra en el núcleo de las células apoptóticas y que la translocación al núcleo dependía de la proteólisis de la procaspasa-3.. Además, caspasa-3 posee diversos blancos nucleares, entre los que destacan: a la enzima PARP, lamin B, fodrin, NuMA (nuclear mitotic apparatus protein), acinus (caspasa-3-activada requerida para la condensación de la cromatina), DFF45/ICAD (Factor de fragmentación del ADN-45/DNasa activada por caspasa, la cual media la degradación del ADN genómico durante la apoptosis), DNA-PK (proteína quinasa nuclear dependiente de ADN), Rb (proteína del retinoblastoma,

un inhibidor de la proliferación celular), U1 snRNP (Casciola-Rosen et al., 1996; Degen et al., 2000; Greidinger et al., 1996; Rosen and Casciola-Rosen, 1997; Sahara et al., 1999; Sanghavi et al., 1998; Slee et al., 2001; Tang and Kidd, 1998; Teraoka et al., 1996). Dado que caspasa-3 es responsable del clivaje de muchas proteínas claves de la mantención fidedigna de la cromatina y del funcionamiento del núcleo celular, su activación correlaciona fuertemente con los cambios morfológicos observados en las células apoptóticas.

Por otra parte, TUNEL es un ensayo altamente sensible, reproducible y rápido que permite detectar rupturas simples y doble en el ADN a través del uso de la enzima terminal transferasa. Con el uso de caspasa-3-activada y de TUNEL nos aseguramos de abarcar 2 fenómenos cruciales y finales de la muerte apoptótica, con la idea de robustecer el resultado obtenido.

Considerando los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, se propone que los A β O_s inducen la liberación de mediadores oxidativos (ROS y óxido nítrico) y pro-inflamatorios que producen específicamente una depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas, a través de aumento del peróxido de hidrógeno y de las señales de calcio mediadas por el RyR con la subsecuente activación de la fosfatasa calcineurina, la cual da cuenta del fenómeno en al menos un porcentaje de éste. Además, el MCA^{+A β O_s} generó una disminución de la expresión de genes anti-apoptóticos. Si bien el MCA^{+A β O_s} no desencadenó la apoptosis neuronal directamente, sí generó un efecto de sinergia en presencia de un estímulo excitotóxico como el NMDA. Estos resultados sugieren que la desregulación de la comunicación que existe entre los astrocitos y las neuronas inducida por A β O_s es un factor que promueve la muerte neuronal.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Los oligómeros del péptido β -amiloide ($A\beta$ Os) inducen la depleción nuclear de pSer-STAT3, pero no de pTyr-STAT3 ni STAT3, en cultivos neuronales ricos en astrocitos. Esta depleción es dependiente de la dosis de $A\beta$ Os.
2. La depleción nuclear de la pSer-STAT3 neuronal inducida por $A\beta$ Os en los cultivos neuronales mixtos depende de los astrocitos.
3. Los $A\beta$ Os no afectan la fosforilación de Serina 727, los niveles de la proteína o del ARNm de STAT3 en cultivos neuronales pobres en astrocitos. Sin embargo, el tratamiento de cultivos neuronales pobres en astrocitos con medio condicionado de astrocitos ($MCA^{+A\beta Os}$) indujo la desfosforilación nuclear y citoplasmática del residuo serina 727 de pSer-STAT3.
4. El peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico posiblemente liberados por los astrocitos estimulados con los $A\beta$ Os, inducen depleción nuclear de pSer-STAT3 en las neuronas. Si bien, los astrocitos estimulados con $A\beta$ Os aumentan significativamente la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF α , sólo IL-6 muestra un aumento significativo de la secreción en el $MCA^{+A\beta Os}$.
5. El tratamiento con el $MCA^{+A\beta Os}$ aumenta el tono oxidativo total en las neuronas y produce aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno en el soma y en las neuritas. Diferentes agentes antioxidantes abolen el incremento del tono oxidativo y particularmente los antioxidantes EUK-134, MCI-186 y DMTU abolen de forma parcial

la depleción nuclear de pSer-STAT3 inducida por el MCA^{+AβOs}.

6. El MCA^{+AβOs} induce señales de calcio mediadas por aumento del tono oxidativo. La quelación de calcio evita la depleción nuclear de pSer-STAT3. El receptor de ryanodina media el aumento de calcio inducido por el MCA^{+AβOs} y la inhibición de calcineurina abole o previene la depleción nuclear de pSer-STAT3 y la expresión de una calcineurina constitutivamente activa produce una significativa pero parcial disminución de pSer-STAT3 nuclear. Entonces, calcineurina podría ser la fosfatasa que desfosforila a STAT3 pero evidentemente, otro mecanismo podría afectar la fosforilación del residuo serina.

7. El MCA^{+AβOs} genera disminución de la expresión de los genes Bcl-2 y survivina, y aumenta la razón pro-apoptótica Bax/Bcl-2 en las neuronas. Sin embargo, el antioxidante EUK-134 no re-establece de forma significativa la expresión de esos genes de sobrevivencia ni disminuye la razón Bax/Bcl-2. El MCA^{+AβOs} no ejecuta la muerte apoptótica por si solo, no obstante, promueve de forma sinérgica la activación de caspasa-3 y la formación de núcleos apoptóticos en presencia de altas concentraciones del estímulo excitotóxico NMDA.

6. ANEXO

6.1 Caracterización de los adenovirus (Ad):

Los cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron transducidos con adenovirus CAIN (Ad-CAIN) y calcineurina constitutivamente activa (Ad-CN), los cuales fueron adquiridos mediante una colaboración con la Dra. Valentina Parra y el Dr. Sergio Lavandero. Los primeros parámetros que se establecieron fueron: el índice de multiplicidad de infección (MOI) y el tiempo de infección para cada virus, los cuales se determinan experimentalmente según el tipo celular que será infectado y el tipo de adenovirus utilizado. En este caso se usó adenovirus de tercera generación, los cuales sólo requieren bioseguridad tipo 2. Para ello, se transdujeron los cultivos neuronales con Ad-CAIN y Ad-CN a diferentes MOIs por 8 horas y se midió la viabilidad a las 48 horas post-infección a través del ensayo MTT (Figura 22A y 22C). El Ad-CAIN produjo aproximadamente un 20% de muerte sólo cuando se usó un MOI de 10.000, mientras que el ad-CN disminuyó la viabilidad de las células desde el MOI 2000 (Figura 18C). Luego, se evaluó el tiempo de infección y para ello se infectó con un MOI de 1000 y se testearon 3 tiempos: 8, 16 y 24 horas y al completar las 48 horas post-infección se realizó el ensayo MTT. Como se muestra en la Figura 22B y 22D, ninguno de los adenovirus produjo un aumento considerable de la muerte de las células a los tiempos testeados. Estos resultados sugirieron que infectar con un MOI de 1000 por 8 horas podría ser una excelente condición experimental para evitar el estrés producto de mantener a las células sin suero por largos periodos de tiempo. Para determinar la eficiencia de transducción de los adenovirus, se utilizó un adenovirus que codifica la

secuencia de la enzima β -galactosidasa (Ad-LacZ), el cual tiene la misma eficiencia de infección que los otros adenovirus por lo que se puede evidenciar las células infectadas a través del uso de una solución que contiene el sustrato X-gal, el cual al ser procesado por la β -galactosidasa genera un producto azul. Cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron transducidos por el Ad-LacZ con un MOI de 1000 o 2000 por 8 horas y a las 24 horas post-infección las células fueron tratadas con la solución de X-gal según como se describe en (Parry et al., 1998) (Figura 22E). Tras el conteo de varios campos se determinó que la eficiencia de transducción fue de 100% con ambos MOIs utilizados, por lo que los adenovirus de ahora en adelante fueron utilizados a un MOI de 1000 y la transducción se llevó a cabo durante 8 horas en un medio neurobasal sin B27.

En cultivos neuronales sin infectar, el MCA^{+A β O_s} induce un aumento de RCAN1 comparado con el control (Figura 23A). En las neuronas transducidas con el Ad-CAIN la expresión de RCAN1 fue similar a la condición sin infectar, y con Ad-CN se ve un aumento del nivel de RCAN1 comparado con las neuronas no transducidas. El control Ad-LacZ tuvo niveles de expresión de RCAN1 parecida al control sin infectar (Figura 23A).

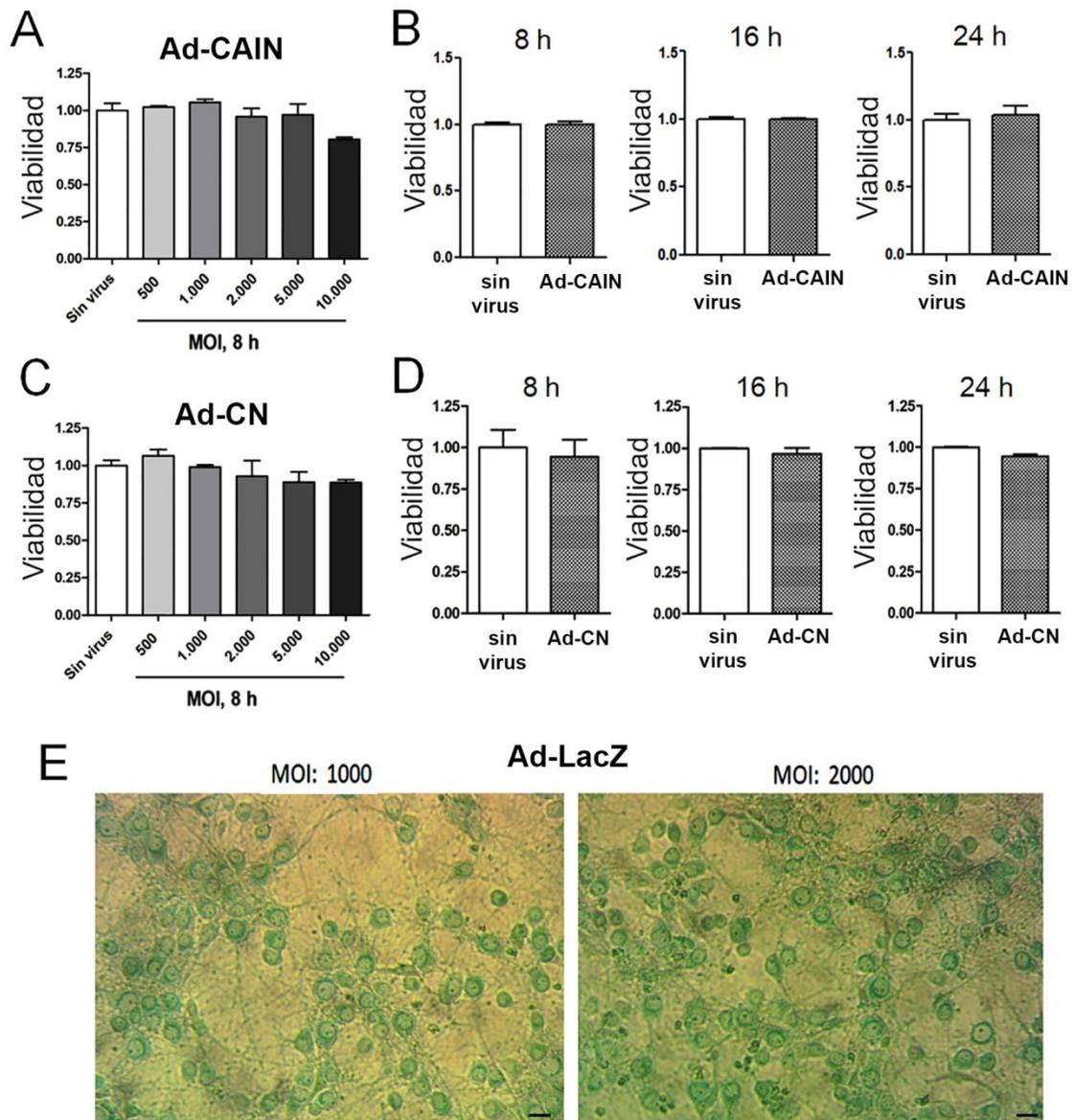


Figura 22. Determinación del índice de multiplicidad (MOI) y tiempo de transducción de los adenovirus. Cultivos neuronales pobres en astrocitos fueron transducidos con el Ad-CAIN (A) o Ad-CN (C) y se midió la viabilidad de los cultivos, usando diferentes índices de multiplicidad de infección (MOI) por 8 horas o bien (B y D), infectando a diferentes tiempos usando un MOI de 1000. (E), Caracterización del porcentaje de células infectadas de los cultivos neuronales utilizando el Ad-LacZ a un MOI de 1000 o 2000 por 8 horas. Después de 24 horas de transducir los cultivos, se hizo el ensayo con el sustrato X-gal para determinar la expresión de la enzima β -galactosidasa. Los valores representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Barra de escala: 10 μ m.

Por otro lado en condiciones basales, NFAT se encuentra hiperfosforilado en el citoplasma de las células. La activación de calcineurina genera la desfosforilación de NFAT y esto induce su translocación al núcleo, por esta razón, la translocación de NFAT se utiliza como un indicador de la actividad de calcineurina. NFAT posee varias isoformas y en neuronas predomina la variante NFATc4. Para estimular la entrada de calcio se utilizó KCl 50 mM por 30 minutos, lo cual despolariza las células. Se comparó la inmunofluorescencia de NFATc4 en la condición control y con el tratamiento de KCl.

Como se esperaba, en las células sin infectar y en el control LacZ, KCl indujo la translocación nuclear de NFATc4 se comparado con la situación control (Figura 23B). La sobreexpresión del péptido CAIN hizo que la señal de inmunofluorescencia de NFATc4 se mantuviese en el citoplasma a diferencia de la sobreexpresión de la variante constitutivamente activa de calcineurina (CN), la cual generó un aumento de NFATc4 en el núcleo (Figura 23B).

Estas dos aproximaciones experimentales demostraron que los adenovirus sobreexpresan las secuencias CAIN y CN, afectando la actividad de calcineurina tal como se esperaba.

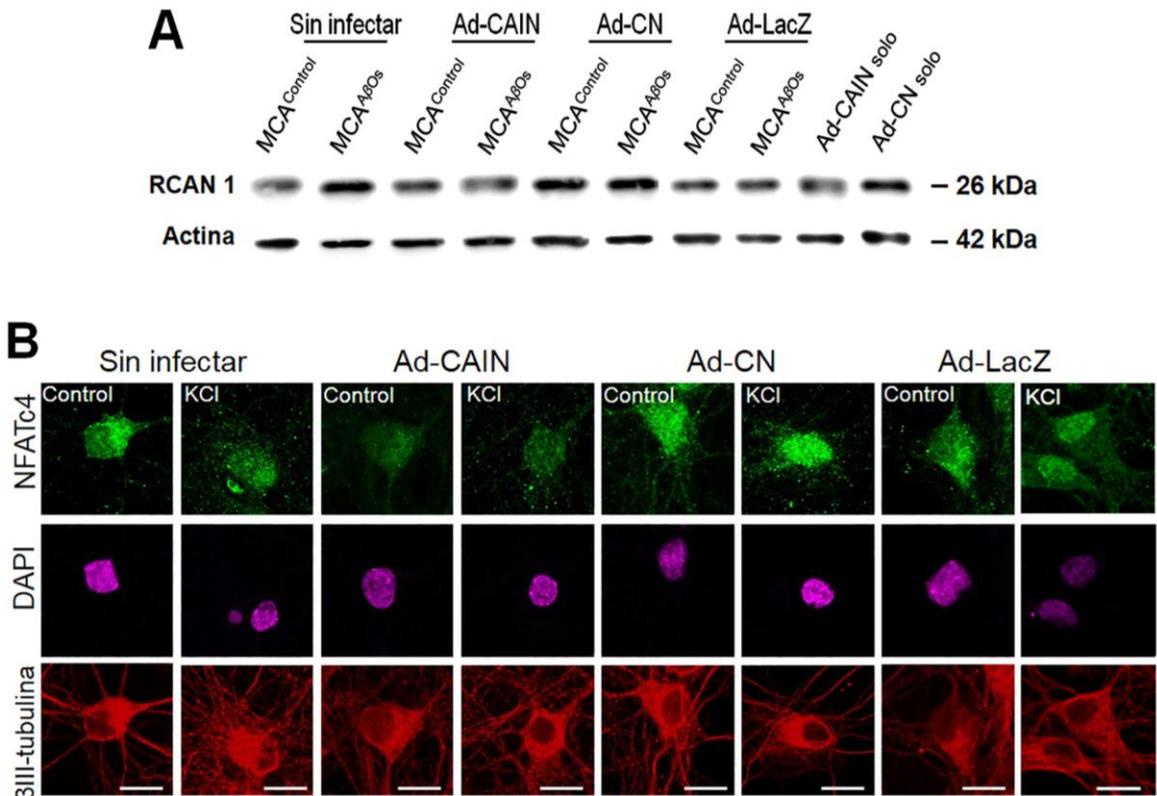


Figura 23. La expresión del péptido inhibitorio (CAIN) y una forma constitutivamente activa de calcineurina (CN) promueven cambios en los niveles de RCAN1 y afectan la translocación nuclear de NFATc4 en cultivos neuronales pobres en astrocitos. (A), Western blot representativo de RCAN1 en cultivos neuronales pobres en astrocitos transducidos con Ad-CAIN, Ad-CN o Ad-LacZ (MOI de 1000 por 8 horas) y tratados con MCA^{Control} o MCA^{AβOs} por 24 horas. (B), Imágenes de inmunofluorescencia de cultivos neuronales transducidos como se indicó anteriormente. KCl 50 mM fue usado para inducir depolarización neuronal. La translocación nuclear del factor de transcripción NFATc4 se utilizó como un indicador de la actividad de calcineurina. La marca de anti-NFATc4 se observa en verde, anti-βIII-tubulina en rojo y DAPI en magenta. Barra: 10 μm.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, N., I. Bednar, E. Mix, S. Marie, D. Paterson, A. Ljungberg, C. Morris, B. Winblad, A. Nordberg, and J. Zhu. 2002. Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice. *J Neuroimmunol* 126:50-57.
- Abdul, H.M., J.L. Furman, M.A. Sama, D.M. Mathis, and C.M. Norris. 2010. NFATs and Alzheimer's Disease. *Mol Cell Pharmacol* 2:7-14.
- Abdul, H.M., M.A. Sama, J.L. Furman, D.M. Mathis, T.L. Beckett, A.M. Weidner, E.S. Patel, I. Baig, M.P. Murphy, H. LeVine, 3rd, S.D. Kraner, and C.M. Norris. 2009. Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in calcineurin/NFAT signaling. *J Neurosci* 29:12957-12969.
- Abramov, A.Y., L. Canevari, and M.R. Duchen. 2003. Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J Neurosci* 23:5088-5095.
- Abramov, A.Y., L. Canevari, and M.R. Duchen. 2004a. Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J Neurosci* 24:565-575.
- Abramov, A.Y., L. Canevari, and M.R. Duchen. 2004b. Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta* 1742:81-87.
- Abramov, A.Y., and M.R. Duchen. 2005. The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:2309-2314.
- Abramov, A.Y., J. Jacobson, F. Wientjes, J. Hotherhall, L. Canevari, and M.R. Duchen. 2005. Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. *J Neurosci* 25:9176-9184.
- Aguirre, P., O. Garcia-Beltran, V. Tapia, Y. Munoz, B.K. Cassels, and M.T. Nunez. 2017. Neuroprotective Effect of a New 7,8-Dihydroxycoumarin-Based Fe(2+)/Cu(2+) Chelator in Cell and Animal Models of Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci* 8:178-185.
- Akama, K.T., C. Albanese, R.G. Pestell, and L.J. Van Eldik. 1998. Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5795-5800.
- Akiyama, H., S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G.M. Cole, N.R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B.L. Fiebich, C.E. Finch, S. Frautschy, W.S. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrak, I.R. Mackenzie, P.L. McGeer, M.K. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F.L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk, and T. Wyss-Coray. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383-421.
- Al-Mousa, F., and F. Michelangeli. 2009. Commonly used ryanodine receptor activator, 4-chloro-m-cresol (4CmC), is also an inhibitor of SERCA Ca²⁺ pumps. *Pharmacol Rep* 61:838-842.
- Aliev, G., H.H. Palacios, A.E. Lipsitt, K. Fischbach, B.T. Lamb, M.E. Obrenovich, L. Morales, E. Gasimov, and V. Bragin. 2009. Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease. *Neurotox Res* 16:293-305.
- Aloisi, F., A. Care, G. Borsellino, P. Gallo, S. Rosa, A. Bassani, A. Cabibbo, U. Testa, G. Levi, and C. Peschle. 1992. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149:2358-2366.
- Allan, S.M., P.J. Tyrrell, and N.J. Rothwell. 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 5:629-640.
- Allen, N.J., M.L. Bennett, L.C. Foo, G.X. Wang, C. Chakraborty, S.J. Smith, and B.A. Barres. 2012. Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486:410-414.
- Amadoro, G., M.T. Ciotti, M. Costanzi, V. Cestari, P. Calissano, and N. Canu. 2006. NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK/MAPK activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2892-2897.
- Angelova, P.R., and A.Y. Abramov. 2014. Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of Abeta-induced neurotoxicity. *Biochem Soc Trans* 42:1286-1290.
- Aoki, Y., G.M. Feldman, and G. Tosato. 2003. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood* 101:1535-1542.
- Apelt, J., and R. Schliebs. 2001. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res* 894:21-30.
- Arias, C., I. Arrieta, and R. Tapia. 1995. beta-Amyloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J Neurosci Res* 41:561-566.
- Asai, A., J. Qiu, Y. Narita, S. Chi, N. Saito, N. Shinoura, H. Hamada, Y. Kuchino, and T. Kirino. 1999. High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J Biol Chem* 274:34450-34458.
- Audrain, M., R. Fol, P. Dutar, B. Potier, J.M. Billard, J. Flament, S. Alves, M.A. Burlot, G. Dufayet-Chaffaud, A.P. Bemelmans, J. Valette, P. Hantraye, N. Deglon, N. Cartier, and J. Braudeau. 2016. Alzheimer's disease-like APP processing in wild-type mice identifies synaptic defects as initial steps of disease

- progression. *Mol Neurodegener* 11:5.
- Bakker, A., G.L. Krauss, M.S. Albert, C.L. Speck, L.R. Jones, C.E. Stark, M.A. Yassa, S.S. Bassett, A.L. Shelton, and M. Gallagher. 2012. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron* 74:467-474.
- Ballatori, N., S.M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu, and C.L. Hammond. 2009. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390:191-214.
- Basu, A., J.K. Krady, and S.W. Levison. 2004. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res* 78:151-156.
- Baudry, M., S. Etienne, A. Bruce, M. Palucki, E. Jacobsen, and B. Malfroy. 1993. Salen-manganese complexes are superoxide dismutase-mimics. *Biochem Biophys Res Commun* 192:964-968.
- Beach, T.G., and E.G. McGeer. 1988. Lamina-specific arrangement of astrocytic gliosis and senile plaques in Alzheimer's disease visual cortex. *Brain Res* 463:357-361.
- Beaman-Hall, C.M., J.C. Leahy, S. Benmansour, and M.L. Vallano. 1998. Glia modulate NMDA-mediated signaling in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 71:1993-2005.
- Belanger, M., I. Allaman, and P.J. Magistretti. 2011. Differential effects of pro- and anti-inflammatory cytokines alone or in combinations on the metabolic profile of astrocytes. *J Neurochem* 116:564-576.
- Belousov, V.V., A.F. Fradkov, K.A. Lukyanov, D.B. Staroverov, K.S. Shakhbazov, A.V. Terskikh, and S. Lukyanov. 2006. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3:281-286.
- Ben Haim, L., K. Ceyzeriat, M.A. Carrillo-de Sauvage, F. Aubry, G. Auregan, M. Guillermier, M. Ruiz, F. Petit, D. Houitte, E. Faivre, M. Vandesquille, R. Aron-Badin, M. Dhenain, N. Deglon, P. Hantraye, E. Brouillet, G. Bonvento, and C. Escartin. 2015. The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *J Neurosci* 35:2817-2829.
- Benarroch, E.E. 2011. NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. *Neurology* 76:1750-1757.
- Benilova, I., E. Karran, and B. De Strooper. 2012. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 15:349-357.
- Benito, C., C.M. Davis, J.A. Gomez-Sanchez, M. Turmaine, D. Meijer, V. Poli, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 2017. STAT3 Controls the Long-Term Survival and Phenotype of Repair Schwann Cells during Nerve Regeneration. *J Neurosci* 37:4255-4269.
- Benveniste, E.N. 1998. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:259-275.
- Benzing, W.C., J.R. Wujek, E.K. Ward, D. Shaffer, K.H. Ashe, S.G. Younkin, and K.R. Brunden. 1999. Evidence for glial-mediated inflammation in aged APP(SW) transgenic mice. *Neurobiol Aging* 20:581-589.
- Bernstein, S.L., N.F. Dupuis, N.D. Lazo, T. Wytenbach, M.M. Condron, G. Bitan, D.B. Teplow, J.E. Shea, B.T. Ruotolo, C.V. Robinson, and M.T. Bowers. 2009. Amyloid-beta protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat Chem* 1:326-331.
- Bhattacharya, S., R.M. Ray, and L.R. Johnson. 2005. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem J* 392:335-344.
- Bialas, A.R., and B. Stevens. 2013. TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat Neurosci* 16:1773-1782.
- Bieschke, J., M. Herbst, T. Wiglenda, R.P. Friedrich, A. Boeddrich, F. Schiele, D. Kleckers, J.M. Lopez del Amo, B.A. Gruning, Q. Wang, M.R. Schmidt, R. Lurz, R. Anwyl, S. Schnoegl, M. Fandrich, R.F. Frank, B. Reif, S. Gunther, D.M. Walsh, and E.E. Wanker. 2011. Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic beta-sheet-rich amyloid fibrils. *Nat Chem Biol* 8:93-101.
- Bilkei-Gorzo, A. 2014. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 142:244-257.
- Blasko, I., R. Veerhuis, M. Stampfer-Kountchev, M. Saurwein-Teissl, P. Eikelenboom, and B. Grubeck-Loebenstein. 2000. Costimulatory effects of interferon-gamma and interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha on the synthesis of A β 1-40 and A β 1-42 by human astrocytes. *Neurobiol Dis* 7:682-689.
- Bogumil, R., D. Namgaladze, D. Schaarschmidt, T. Schmachtel, S. Hellstern, R. Mutzel, and V. Ullrich. 2000. Inactivation of calcineurin by hydrogen peroxide and phenylarsine oxide. Evidence for a dithiol-disulfide equilibrium and implications for redox regulation. *Eur J Biochem* 267:1407-1415.
- Bomben, V., J. Holth, J. Reed, P. Cramer, G. Landreth, and J. Noebels. 2014. Bexarotene reduces network excitability in models of Alzheimer's disease and epilepsy. *Neurobiol Aging* 35:2091-2095.
- Bouvier, D.S., E.V. Jones, G. Quesseveur, M.A. Davoli, A.F. T, R. Quirion, N. Mechawar, and K.K. Murai. 2016. High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease. *Sci Rep* 6:24544.
- Bouvier, D.S., and K.K. Murai. 2015. Synergistic actions of microglia and astrocytes in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 45:1001-1014.
- Boyd-Kimball, D., R. Sultana, H.M. Abdul, and D.A. Butterfield. 2005. Gamma-glutamylcysteine ethyl ester-induced up-regulation of glutathione protects neurons against A β (1-42)-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 79:700-706.
- Brennan, A.M., S.W. Suh, S.J. Won, P. Narasimhan, T.M. Kauppinen, H. Lee, Y. Edling, P.H. Chan, and R.A. Swanson. 2009. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor

- activation. *Nat Neurosci* 12:857-863.
- Brito-Moreira, J., A.C. Paula-Lima, T.R. Bomfim, F.B. Oliveira, F.J. Sepulveda, F.G. De Mello, L.G. Aguayo, R. Panizzutti, and S.T. Ferreira. 2011. Abeta oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons. *Curr Alzheimer Res* 8:552-562.
- Brouillette, J., R. Caillierez, N. Zommer, C. Alves-Pires, I. Benilova, D. Blum, B. De Strooper, and L. Buee. 2012. Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid-beta1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *J Neurosci* 32:7852-7861.
- Brugg, B., Y.L. Dubreuil, G. Huber, E.E. Wollman, N. Delhaye-Bouchaud, and J. Mariani. 1995. Inflammatory processes induce beta-amyloid precursor protein changes in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3032-3035.
- Bull, R., J.P. Finkelstein, J. Galvez, G. Sanchez, P. Donoso, M.I. Behrens, and C. Hidalgo. 2008. Ischemia enhances activation by Ca²⁺ and redox modification of ryanodine receptor channels from rat brain cortex. *J Neurosci* 28:9463-9472.
- Bull, R., J.J. Marengo, J.P. Finkelstein, M.I. Behrens, and O. Alvarez. 2003. SH oxidation coordinates subunits of rat brain ryanodine receptor channels activated by calcium and ATP. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C119-128.
- Busche, M.A., G. Eichhoff, H. Adelsberger, D. Abramowski, K.H. Wiederhold, C. Haass, M. Staufenbiel, A. Konnerth, and O. Garaschuk. 2008. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321:1686-1689.
- Bussiere, R., A. Lacampagne, S. Reiken, X. Liu, V. Scheuerman, R. Zalk, C. Martin, F. Checler, A.R. Marks, and M. Chami. 2017. Amyloid beta production is regulated by beta2-adrenergic signaling-mediated post-translational modifications of the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 292:10153-10168.
- Butturini, E., A. Carcereri de Prati, G. Chiavegato, A. Rigo, E. Cavalieri, E. Darra, and S. Mariotto. 2013. Mild oxidative stress induces S-glutathionylation of STAT3 and enhances chemosensitivity of tumoural cells to chemotherapeutic drugs. *Free Radic Biol Med* 65:1322-1330.
- Butturini, E., E. Cavalieri, A.C. de Prati, E. Darra, A. Rigo, K. Shoji, N. Murayama, H. Yamazaki, Y. Watanabe, H. Suzuki, and S. Mariotto. 2011. Two naturally occurring terpenes, dehydrocostuslactone and costunolide, decrease intracellular GSH content and inhibit STAT3 activation. *PLoS One* 6:e20174.
- Butturini, E., E. Darra, G. Chiavegato, B. Cellini, F. Cozzolino, M. Monti, P. Pucci, D. Dell'Orco, and S. Mariotto. 2014. S-Glutathionylation at Cys328 and Cys542 impairs STAT3 phosphorylation. *ACS Chem Biol* 9:1885-1893.
- Cai, J., J. Yang, and D.P. Jones. 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1366:139-149.
- Carballo, M., M. Conde, R. El Bekay, J. Martin-Nieto, M.J. Camacho, J. Monteseirin, J. Conde, F.J. Bedoya, and F. Sobrino. 1999. Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J Biol Chem* 274:17580-17586.
- Carrasco, M.A., E. Jaimovich, U. Kemmerling, and C. Hidalgo. 2004. Signal transduction and gene expression regulated by calcium release from internal stores in excitable cells. *Biol Res* 37:701-712.
- Carrero, I., M.R. Gonzalo, B. Martin, J.M. Sanz-Anquela, J. Arevalo-Serrano, and A. Gonzalo-Ruiz. 2012. Oligomers of beta-amyloid protein (Abeta1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol* 236:215-227.
- Carter, S.F., M. Scholl, O. Almkvist, A. Wall, H. Engler, B. Langstrom, and A. Nordberg. 2012. Evidence for astrocytosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: a multitracer PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. *J Nucl Med* 53:37-46.
- Casciola-Rosen, L., D.W. Nicholson, T. Chong, K.R. Rowan, N.A. Thornberry, D.K. Miller, and A. Rosen. 1996. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 183:1957-1964.
- Ceyzeriat, K., L. Abjean, M.A. Carrillo-de Sauvage, L. Ben Haim, and C. Escartin. 2016. The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience* 330:205-218.
- Clarke, D.D., and L. Sokoloff. 1999. Circulation and Energy Metabolism of the Brain. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*.
- Cleary, J.P., D.M. Walsh, J.J. Hofmeister, G.M. Shankar, M.A. Kuskowski, D.J. Selkoe, and K.H. Ashe. 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8:79-84.
- Colton, C.A., R.T. Mott, H. Sharpe, Q. Xu, W.E. Van Nostrand, and M.P. Vitek. 2006. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation* 3:27.
- Condorelli, D.F., F. Conti, V. Gallo, F. Kirchhoff, G. Seifert, C. Steinhauser, A. Verkhatsky, and X. Yuan. 1999. Expression and functional analysis of glutamate receptors in glial cells. *Adv Exp Med Biol* 468:49-67.
- Constam, D.B., J. Philipp, U.V. Malipiero, P. ten Dijke, M. Schachner, and A. Fontana. 1992. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol* 148:1404-1410.
- Cory, S., and J.M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*

- 2:647-656.
- Costa, R.M., N.B. Federov, J.H. Kogan, G.G. Murphy, J. Stern, M. Ohno, R. Kucherlapati, T. Jacks, and A.J. Silva. 2002. Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature* 415:526-530.
- Courapied, S., H. Sellier, S. de Carne Trecesson, A. Vigneron, A.C. Bernard, E. Gamelin, B. Barre, and O. Coqueret. 2010. The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage upon topoisomerase I inhibition. *J Biol Chem* 285:26765-26778.
- Crawford, D.R., K.P. Leahy, N. Abramova, L. Lan, Y. Wang, and K.J. Davies. 1997. Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 342:6-12.
- Chakraborty, S., I. Goussakov, M.B. Miller, and G.E. Stutzmann. 2009. Deviant ryanodine receptor-mediated calcium release resets synaptic homeostasis in presymptomatic 3xTg-AD mice. *J Neurosci* 29:9458-9470.
- Chen, Y.R., and C.G. Glabe. 2006. Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid-beta peptides Abeta40 and Abeta42: stable trimer or tetramer formation by Abeta42. *J Biol Chem* 281:24414-24422.
- Chiba, T., M. Yamada, J. Sasabe, K. Terashita, M. Shimoda, M. Matsuoka, and S. Aiso. 2009. Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Mol Psychiatry* 14:206-222.
- Choi, D.W. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379.
- Choi, D.W. 1992. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.
- Choi, D.W., J.Y. Koh, and S. Peters. 1988. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 8:185-196.
- Choi, S.S., H.J. Lee, I. Lim, J. Satoh, and S.U. Kim. 2014. Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PLoS One* 9:e92325.
- Chu, A., M. Diaz-Munoz, M.J. Hawkes, K. Brush, and S.L. Hamilton. 1990. Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Mol Pharmacol* 37:735-741.
- Chung, J., E. Uchida, T.C. Grammer, and J. Blenis. 1997. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17:6508-6516.
- Chung, W.S., L.E. Clarke, G.X. Wang, B.K. Stafford, A. Sher, C. Chakraborty, J. Joung, L.C. Foo, A. Thompson, C. Chen, S.J. Smith, and B.A. Barres. 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504:394-400.
- D'Amelio, M., V. Cavallucci, S. Middei, C. Marchetti, S. Pacioni, A. Ferri, A. Diamantini, D. De Zio, P. Carrara, L. Battistini, S. Moreno, A. Bacci, M. Ammassari-Teule, H. Marie, and F. Cecconi. 2011. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 14:69-76.
- Dacher, M., S. Gouty, S. Dash, B.M. Cox, and F.S. Nugent. 2013. A-kinase anchoring protein-calcineurin signaling in long-term depression of GABAergic synapses. *J Neurosci* 33:2650-2660.
- Daginakatte, G.C., A. Gadzinski, R.J. Emmett, J.L. Stark, E.R. Gonzales, P. Yan, J.M. Lee, A.H. Cross, and D.H. Gutmann. 2008. Expression profiling identifies a molecular signature of reactive astrocytes stimulated by cyclic AMP or proinflammatory cytokines. *Exp Neurol* 210:261-267.
- Daniels, W.M., J. Hendricks, R. Salie, and J.J. Taljaard. 2001. The role of the MAP-kinase superfamily in beta-amyloid toxicity. *Metab Brain Dis* 16:175-185.
- Danysz, W., and C.G. Parsons. 2003. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry* 18:S23-32.
- Danysz, W., C.G. Parsons, H.J. Mobius, A. Stoffler, and G. Quack. 2000. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res* 2:85-97.
- Darnell, J.E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.
- Datta, R., D. Banach, H. Kojima, R.V. Talanian, E.S. Alnemri, W.W. Wong, and D.W. Kufe. 1996. Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. *Blood* 88:1936-1943.
- Davis, R.C., I.T. Marsden, M.T. Maloney, L.S. Minamide, M. Podlisny, D.J. Selkoe, and J.R. Bamberg. 2011. Amyloid beta dimers/trimers potently induce cofilin-actin rods that are inhibited by maintaining cofilin-phosphorylation. *Mol Neurodegener* 6:10.
- De-Paula, V.J., M. Radanovic, B.S. Diniz, and O.V. Forlenza. 2012. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem* 65:329-352.
- De Felice, F.G., P.T. Velasco, M.P. Lambert, K. Viola, S.J. Fernandez, S.T. Ferreira, and W.L. Klein. 2007. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282:11590-11601.
- de la Monte, S.M., and K.D. Bloch. 1997. Aberrant expression of the constitutive endothelial nitric oxide synthase gene in Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 30:139-159.

- de la Monte, S.M., and J.R. Wands. 2006. Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9:167-181.
- Decker, T., and P. Kovarik. 2000. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19:2628-2637.
- Decraene, D., K. Smaers, D. Gan, T. Mammone, M. Matsui, D. Maes, L. Declercq, and M. Garmyn. 2004. A synthetic superoxide dismutase/catalase mimetic (EUK-134) inhibits membrane-damage-induced activation of mitogen-activated protein kinase pathways and reduces p53 accumulation in ultraviolet B-exposed primary human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122:484-491.
- Degen, W.G., Y. Aarssen, G.J. Pruijn, P.J. Utz, and W.J. van Venrooij. 2000. The fate of U1 snRNP during anti-Fas induced apoptosis: specific cleavage of the U1 snRNA molecule. *Cell Death Differ* 7:70-79.
- DeKosky, S.T., and S.W. Scheff. 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457-464.
- Del Prete, D., F. Checler, and M. Chami. 2014. Ryanodine receptors: physiological function and deregulation in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener* 9:21.
- Delling, U., J. Tureckova, H.W. Lim, L.J. De Windt, P. Rotwein, and J.D. Molkentin. 2000. A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol Cell Biol* 20:6600-6611.
- Deveraux, Q.L., and J.C. Reed. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252.
- Deverman, B.E., and P.H. Patterson. 2009. Cytokines and CNS development. *Neuron* 64:61-78.
- Didier, N., I.A. Romero, C. Creminon, A. Wijkhuisen, J. Grassi, and A. Mabondzo. 2003. Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* 86:246-254.
- Dineley, K.T., M. Westerman, D. Bui, K. Bell, K.H. Ashe, and J.D. Sweatt. 2001. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:4125-4133.
- Dringen, R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
- Dugan, L.L., V.M. Bruno, S.M. Amagasu, and R.G. Giffard. 1995. Glia modulate the response of murine cortical neurons to excitotoxicity: glia exacerbate AMPA neurotoxicity. *J Neurosci* 15:4545-4555.
- Dumont, A.O., S. Goursaud, N. Desmet, and E. Hermans. 2014. Differential regulation of glutamate transporter subtypes by pro-inflammatory cytokine TNF-alpha in cortical astrocytes from a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 9:e97649.
- Dziennis, S., and N.J. Alkayed. 2008. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. *Rev Neurosci* 19:341-361.
- Ermak, G., C.D. Harris, and K.J. Davies. 2002. The DSCR1 (Adapt78) isoform 1 protein calcipressin 1 inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage, including transient oxidative stress. *FASEB J* 16:814-824.
- Eufemi, M., R. Cocchiola, D. Romaniello, V. Correani, L. Di Francesco, C. Fabrizi, B. Maras, and M.E. Schinina. 2015. Acetylation and phosphorylation of STAT3 are involved in the responsiveness of microglia to beta amyloid. *Neurochem Int* 81:48-56.
- Fan, Z., B. Liu, S. Zhang, H. Liu, Y. Li, D. Wang, Y. Liu, J. Li, N. Wang, and B. Zhang. 2015. YM155, a selective survivin inhibitor, reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats via upregulating voltage-gated potassium channels. *Clin Exp Hypertens* 37:381-387.
- Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138-145.
- Feng, X., T. Sun, Y. Bei, S. Ding, W. Zheng, Y. Lu, and P. Shen. 2013. S-nitrosylation of ERK inhibits ERK phosphorylation and induces apoptosis. *Sci Rep* 3:1814.
- Fernandez-Tome, P., B. Brera, M.A. Arevalo, and M.L. de Ceballos. 2004. Beta-amyloid25-35 inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: modulation of uptake as a survival mechanism. *Neurobiol Dis* 15:580-589.
- Fernandez, A.M., S. Fernandez, P. Carrero, M. Garcia-Garcia, and I. Torres-Aleman. 2007. Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. *J Neurosci* 27:8745-8756.
- Ferreira, S.T., M.V. Lourenco, M.M. Oliveira, and F.G. De Felice. 2015. Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* 9:191.
- Finkel, T., and N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.
- Fontana, R., M. Agostini, E. Murana, M. Mahmud, E. Scremin, M. Rubega, G. Sparacino, S. Vassanelli, and C. Fasolato. 2017. Early hippocampal hyperexcitability in PS2APP mice: role of mutant PS2 and APP. *Neurobiol Aging* 50:64-76.
- Forloni, G., F. Mangiarotti, N. Angeretti, E. Lucca, and M.G. De Simoni. 1997. Beta-amyloid fragment potentiates IL-6 and TNF-alpha secretion by LPS in astrocytes but not in microglia. *Cytokine* 9:759-762.
- Forny-Germano, L., N.M. Lyra e Silva, A.F. Batista, J. Brito-Moreira, M. Gralle, S.E. Boehnke, B.C. Coe, A. Lablans, S.A. Marques, A.M. Martinez, W.L. Klein, J.C. Houzel, S.T. Ferreira, D.P. Munoz, and F.G. De

- Felice. 2014. Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid-beta oligomers in nonhuman primates. *J Neurosci* 34:13629-13643.
- Fu, A.K., W.Y. Fu, A.K. Ng, W.W. Chien, Y.P. Ng, J.H. Wang, and N.Y. Ip. 2004. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6728-6733.
- Fuentes, J.J., L. Genesca, T.J. Kingsbury, K.W. Cunningham, M. Perez-Riba, X. Estivill, and S. de la Luna. 2000. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet* 9:1681-1690.
- Furman, J.L., D.M. Sama, J.C. Gant, T.L. Beckett, M.P. Murphy, A.D. Bachstetter, L.J. Van Eldik, and C.M. Norris. 2012. Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32:16129-16140.
- Galimberti, D., E. Venturelli, C. Fenoglio, I. Guidi, C. Villa, L. Bergamaschini, F. Cortini, D. Scalabrini, P. Baron, C. Vergani, N. Bresolin, and E. Scarpini. 2008. Intrathecal levels of IL-6, IL-11 and LIF in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol* 255:539-544.
- Gallo, V., and C.A. Ghiani. 2000. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol Sci* 21:252-258.
- Garai, K., and C. Frieden. 2013. Quantitative analysis of the time course of A β oligomerization and subsequent growth steps using tetramethylrhodamine-labeled A β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:3321-3326.
- Garcia-Yague, A.J., P. Rada, A.I. Rojo, I. Lastres-Becker, and A. Cuadrado. 2013. Nuclear import and export signals control the subcellular localization of Nurr1 protein in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 288:5506-5517.
- Garrido, C., L. Galluzzi, M. Brunet, P.E. Puig, C. Didelot, and G. Kroemer. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13:1423-1433.
- Giaume, C., A. Koulakoff, L. Roux, D. Holcman, and N. Rouach. 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87-99.
- Giuffrida, M.L., F. Caraci, B. Pignataro, S. Cataldo, P. De Bona, V. Bruno, G. Molinaro, G. Pappalardo, A. Messina, A. Palmigiano, D. Garozzo, F. Nicoletti, E. Rizzarelli, and A. Copani. 2009. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci* 29:10582-10587.
- Glass, C.K., K. Saijo, B. Winner, M.C. Marchetto, and F.H. Gage. 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140:918-934.
- Goldgaber, D., H.W. Harris, T. Hla, T. Maciag, R.J. Donnelly, J.S. Jacobsen, M.P. Vitek, and D.C. Gajdusek. 1989. Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7606-7610.
- Greidinger, E.L., D.K. Miller, T.T. Yamin, L. Casciola-Rosen, and A. Rosen. 1996. Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. *FEBS Lett* 390:299-303.
- Grewal, S.S., R.D. York, and P.J. Stork. 1999. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9:544-553.
- Grienberger, C., N.L. Rochefort, H. Adelsberger, H.A. Henning, D.N. Hill, J. Reichwald, M. Staufenbiel, and A. Konnerth. 2012. Staged decline of neuronal function in vivo in an animal model of Alzheimer's disease. *Nat Commun* 3:774.
- Griffin, W.S., L.C. Stanley, C. Ling, L. White, V. MacLeod, L.J. Perrot, C.L. White, 3rd, and C. Araoz. 1989. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7611-7615.
- Grolla, A.A., G. Fakhfour, G. Balzaretto, E. Marcello, F. Gardoni, P.L. Canonico, M. DiLuca, A.A. Genazzani, and D. Lim. 2013. A β leads to Ca²⁺(+) signaling alterations and transcriptional changes in glial cells. *Neurobiol Aging* 34:511-522.
- Grzybicki, D., G.F. Gebhart, and S. Murphy. 1996. Expression of nitric oxide synthase type II in the spinal cord under conditions producing thermal hyperalgesia. *J Chem Neuroanat* 10:221-229.
- Guo, Z., H. Jiang, X. Xu, W. Duan, and M.P. Mattson. 2008. Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK/STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem* 283:1754-1763.
- Hafez, M.M., N.O. Al-Harbi, A.R. Al-Hoshani, K.A. Al-Hosaini, S.D. Al Shrari, S.S. Al Rejaie, M.M. Sayed-Ahmed, and O.A. Al-Shabanah. 2015. Hepato-protective effect of rutin via IL-6/STAT3 pathway in CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Biol Res* 48:30.
- Haj-Yasein, N.N., G.F. Vindedal, M. Eilert-Olsen, G.A. Gundersen, O. Skare, P. Laake, A. Klungland, A.E. Thoren, J.M. Burkhardt, O.P. Ottersen, and E.A. Nagelhus. 2011. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17815-17820.
- Han, S.H., J.C. Park, and I. Mook-Jung. 2016. Amyloid beta-interacting partners in Alzheimer's disease: From accomplices to possible therapeutic targets. *Prog Neurobiol* 137:17-38.
- He, G., and M. Karin. 2011. NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res* 21:159-168.
- Hefendehl, J.K., J. LeDue, R.W. Ko, J. Mahler, T.H. Murphy, and B.A. MacVicar. 2016. Mapping synaptic

- glutamate transporter dysfunction in vivo to regions surrounding Abeta plaques by iGluSnFR two-photon imaging. *Nat Commun* 7:13441.
- Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265:621-636.
- Heneka, M.T., M.J. Carson, J. El Khoury, G.E. Landreth, F. Brosseon, D.L. Feinstein, A.H. Jacobs, T. Wyss-Coray, J. Vitorica, R.M. Ransohoff, K. Herrup, S.A. Frautschy, B. Finsen, G.C. Brown, A. Verkhratsky, K. Yamanaka, J. Koistinaho, E. Latz, A. Halle, G.C. Petzold, T. Town, D. Morgan, M.L. Shinohara, V.H. Perry, C. Holmes, N.G. Bazan, D.J. Brooks, S. Hunot, B. Joseph, N. Deigendesch, O. Garaschuk, E. Boddeke, C.A. Dinarello, J.C. Breitner, G.M. Cole, D.T. Golenbock, and M.P. Kummer. 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14:388-405.
- Heneka, M.T., H. Wiesinger, L. Dumitrescu-Ozimek, P. Riederer, D.L. Feinstein, and T. Klockgether. 2001. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:906-916.
- Henneberger, C., T. Papouin, S.H. Oliet, and D.A. Rusakov. 2010. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463:232-236.
- Herrmann-Frank, A., M. Richter, S. Sarkozi, U. Mohr, and F. Lehmann-Horn. 1996. 4-Chloro-m-cresol, a potent and specific activator of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1289:31-40.
- Hertle, D.N., and M.F. Yeckel. 2007. Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor isoforms and ryanodine receptor isoforms during maturation of the rat hippocampus. *Neuroscience* 150:625-638.
- Hewett, J.A., and S.J. Hewett. 2012. Induction of nitric oxide synthase-2 expression and measurement of nitric oxide production in enriched primary cortical astrocyte cultures. *Methods Mol Biol* 814:251-263.
- Heyser, C.J., E. Masliah, A. Samimi, I.L. Campbell, and L.H. Gold. 1997. Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1500-1505.
- Hidalgo, C., R. Bull, J.J. Marengo, C.F. Perez, and P. Donoso. 2000. SH oxidation stimulates calcium release channels (ryanodine receptors) from excitable cells. *Biol Res* 33:113-124.
- Hidalgo, C., M.A. Carrasco, P. Munoz, and M.T. Nunez. 2007. A role for reactive oxygen/nitrogen species and iron on neuronal synaptic plasticity. *Antioxid Redox Signal* 9:245-255.
- Hidalgo, C., and P. Donoso. 2008. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10:1275-1312.
- Hillmer, E.J., H. Zhang, H.S. Li, and S.S. Watowich. 2016. STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 31:1-15.
- Hindley, S., B.H. Juurlink, J.W. Gysbers, P.J. Middlemiss, M.A. Herman, and M.P. Rathbone. 1997. Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. *J Neurosci Res* 47:427-439.
- Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi. 2000. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19:2548-2556.
- Hofmann, H.D., and M. Kirsch. 2012. JAK2-STAT3 signaling: A novel function and a novel mechanism. *JAKSTAT* 1:191-193.
- Hol, E.M., and M. Pekny. 2015. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 32:121-130.
- Hole, P.S., R.L. Darley, and A. Tonks. 2011. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood* 117:5816-5826.
- Honig, L.S., and R.N. Rosenberg. 2000. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* 108:317-330.
- Hopkins, S.J., and N.J. Rothwell. 1995. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci* 18:83-88.
- Horowitz, M.P., C. Milanese, R. Di Maio, X. Hu, L.M. Montero, L.H. Sanders, V. Tapias, S. Sepe, W.A. van Cappellen, E.A. Burton, J.T. Greenamyre, and P.G. Mastroberardino. 2011. Single-cell redox imaging demonstrates a distinctive response of dopaminergic neurons to oxidative insults. *Antioxid Redox Signal* 15:855-871.
- Hou, L., Y. Liu, X. Wang, H. Ma, J. He, Y. Zhang, C. Yu, W. Guan, and Y. Ma. 2011. The effects of amyloid-beta42 oligomer on the proliferation and activation of astrocytes in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47:573-580.
- Hsia, A.Y., E. Masliah, L. McConlogue, G.Q. Yu, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, R.C. Malenka, R.A. Nicoll, and L. Mucke. 1999. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3228-3233.
- Hsu, F.N., M.C. Chen, K.C. Lin, Y.T. Peng, P.C. Li, E. Lin, M.C. Chiang, J.T. Hsieh, and H. Lin. 2013. Cyclin-dependent kinase 5 modulates STAT3 and androgen receptor activation through phosphorylation of Ser(7)(2)(7) on STAT3 in prostate cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305:E975-986.
- Hu, J., K.T. Akama, G.A. Krafft, B.A. Chromy, and L.J. Van Eldik. 1998. Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res* 785:195-206.
- Hung, L.W., G.D. Ciccotosto, E. Giannakis, D.J. Tew, K. Perez, C.L. Masters, R. Cappai, J.D. Wade, and K.J.

- Barnham. 2008. Amyloid-beta peptide (Abeta) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: Abeta dimers and trimers correlate with neurotoxicity. *J Neurosci* 28:11950-11958.
- Igney, F.H., and P.H. Krammer. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277-288.
- Jekabsone, A., P.K. Mander, A. Tickler, M. Sharpe, and G.C. Brown. 2006. Fibrillar beta-amyloid peptide Abeta1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF-alpha release and H2O2 derived from NADPH oxidase: a cell culture study. *J Neuroinflammation* 3:24.
- Jensen, T., and J.G. Edwards. 2012. Calcineurin is required for TRPV1-induced long-term depression of hippocampal interneurons. *Neurosci Lett* 510:82-87.
- Jevtic, S., A.S. Sengar, M.W. Salter, and J. McLaurin. 2017. The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment. *Ageing Res Rev* 40:84-94.
- Jiang, K., K.L. Wright, P. Zhu, M.J. Szego, A.N. Bramall, W.W. Hauswirth, Q. Li, S.E. Egan, and R.R. McInnes. 2014. STAT3 promotes survival of mutant photoreceptors in inherited photoreceptor degeneration models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E5716-5723.
- Jin, J.J., H.D. Kim, J.A. Maxwell, L. Li, and K. Fukuchi. 2008. Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 5:23.
- Jin, S.C., M.M. Carrasquillo, B.A. Benitez, T. Skorupa, D. Carrell, D. Patel, S. Lincoln, S. Krishnan, M. Kachadoorian, C. Reitz, R. Mayeux, T.S. Wingo, J.J. Lah, A.I. Levey, J. Murrell, H. Hendrie, T. Foroud, N.R. Graff-Radford, A.M. Goate, C. Cruchaga, and N. Ertekin-Taner. 2015. TREM2 is associated with increased risk for Alzheimer's disease in African Americans. *Mol Neurodegener* 10:19.
- Jin, S.M., H.J. Cho, Y.W. Kim, J.Y. Hwang, and I. Mook-Jung. 2012. Abeta-induced Ca(2+) influx regulates astrocytic BACE1 expression via calcineurin/NFAT4 signals. *Biochem Biophys Res Commun* 425:649-655.
- Jin, Y., E.Z. Yan, Y. Fan, Z.H. Zong, Z.M. Qi, and Z. Li. 2005. Sodium ferulate prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38 MAPK and upregulation of ERK-1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus. *Acta Pharmacol Sin* 26:943-951.
- Jofuku, A., N. Ishihara, and K. Mihara. 2005. Analysis of functional domains of rat mitochondrial Fis1, the mitochondrial fission-stimulating protein. *Biochem Biophys Res Commun* 333:650-659.
- John, G.R., S.C. Lee, X. Song, M. Rivieccio, and C.F. Brosnan. 2005. IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* 49:161-176.
- Johnstone, M., A.J. Gearing, and K.M. Miller. 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* 93:182-193.
- Jung, J.E., G.S. Kim, P. Narasimhan, Y.S. Song, and P.H. Chan. 2009. Regulation of Mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by STAT3 in mice after cerebral ischemia. *J Neurosci* 29:7003-7014.
- Kamada, S., U. Kikkawa, Y. Tsujimoto, and T. Hunter. 2005. Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *J Biol Chem* 280:857-860.
- Kamenetz, F., T. Tomita, H. Hsieh, G. Seabrook, D. Borchelt, T. Iwatsubo, S. Sisodia, and R. Malinow. 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925-937.
- Kamphuis, W., C. Mamber, M. Moeton, L. Kooijman, J.A. Sluijs, A.H. Jansen, M. Verveer, L.R. de Groot, V.D. Smith, S. Rangarajan, J.J. Rodriguez, M. Orre, and E.M. Hol. 2012. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One* 7:e42823.
- Kanda, N., H. Seno, Y. Konda, H. Marusawa, M. Kanai, T. Nakajima, T. Kawashima, A. Nanakin, T. Sawabu, Y. Uenoyama, A. Sekikawa, M. Kawada, K. Suzuki, T. Kayahara, H. Fukui, M. Sawada, and T. Chiba. 2004. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene* 23:4921-4929.
- Kashon, M.L., G.W. Ross, J.P. O'Callaghan, D.B. Miller, H. Petrovitch, C.M. Burchfiel, D.S. Sharp, W.R. Markesbery, D.G. Davis, J. Hardman, J. Nelson, and L.R. White. 2004. Associations of cortical astrogliosis with cognitive performance and dementia status. *J Alzheimers Dis* 6:595-604; discussion 673-581.
- Katzman, R., R. Terry, R. DeTeresa, T. Brown, P. Davies, P. Fuld, X. Renbing, and A. Peck. 1988. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 23:138-144.
- Kelliher, M., J. Fastbom, R.F. Cowburn, W. Bonkale, T.G. Ohm, R. Ravid, V. Sorrentino, and C. O'Neill. 1999. Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and beta-amyloid pathologies. *Neuroscience* 92:499-513.
- Kellner, V., N. Menkes-Caspi, S. Beker, and E.A. Stern. 2014. Amyloid-beta alters ongoing neuronal activity and excitability in the frontal cortex. *Neurobiol Aging* 35:1982-1991.
- Kemmerling, U., P. Munoz, M. Muller, G. Sanchez, M.L. Aylwin, E. Klann, M.A. Carrasco, and C. Hidalgo. 2007. Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons. *Cell Calcium* 41:491-502.
- Keyes, J.D., D. Parsonage, R.D. Yammani, L.C. Rogers, C. Kesty, C.M. Furdai, K.J. Nelson, and L.B. Poole.

2017. Endogenous, regulatory cysteine sulfenylation of ERK kinases in response to proliferative signals. *Free Radic Biol Med* 112:534-543.
- Kim, J., J.S. Won, A.K. Singh, A.K. Sharma, and I. Singh. 2014. STAT3 regulation by S-nitrosylation: implication for inflammatory disease. *Antioxid Redox Signal* 20:2514-2527.
- Kingsbury, T.J., and K.W. Cunningham. 2000. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev* 14:1595-1604.
- Kirvell, S.L., M. Esiri, and P.T. Francis. 2006. Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 98:939-950.
- Kishida, K.T., and E. Klann. 2007. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 9:233-244.
- Klyubin, I., V. Betts, A.T. Welzel, K. Blennow, H. Zetterberg, A. Wallin, C.A. Lemere, W.K. Cullen, Y. Peng, T. Wisniewski, D.J. Selkoe, R. Anwyl, D.M. Walsh, and M.J. Rowan. 2008. Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci* 28:4231-4237.
- Koh, J.Y., and D.W. Choi. 1991. Selective blockade of non-NMDA receptors does not block rapidly triggered glutamate-induced neuronal death. *Brain Res* 548:318-321.
- Komine-Kobayashi, M., N. Zhang, M. Liu, R. Tanaka, H. Hara, A. Osaka, H. Mochizuki, Y. Mizuno, and T. Urabe. 2006. Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:402-413.
- Konnikova, L., M. Kotecki, M.M. Kruger, and B.H. Cochran. 2003. Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer* 3:23.
- Koo, M.Y., J. Park, J.M. Lim, S.Y. Joo, S.P. Shin, H.B. Shim, J. Chung, D. Kang, H.A. Woo, and S.G. Rhee. 2014. Selective inhibition of the function of tyrosine-phosphorylated STAT3 with a phosphorylation site-specific intrabody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:6269-6274.
- Kreft, M., M. Stenovec, M. Rupnik, S. Grilc, M. Krzan, M. Potokar, T. Pangrsic, P.G. Haydon, and R. Zorec. 2004. Properties of Ca(2+)-dependent exocytosis in cultured astrocytes. *Glia* 46:437-445.
- Kucukdereli, H., N.J. Allen, A.T. Lee, A. Feng, M.I. Ozlu, L.M. Conatser, C. Chakraborty, G. Workman, M. Weaver, E.H. Sage, B.A. Barres, and C. Eroglu. 2011. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E440-449.
- Kulijewicz-Nawrot, M., A. Verkhratsky, A. Chvatal, E. Sykova, and J.J. Rodriguez. 2012. Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Anat* 221:252-262.
- Lacampagne, A., X. Liu, S. Reiken, R. Bussiere, A.C. Meli, I. Lauritzen, A.F. Teich, R. Zalk, N. Saint, O. Arancio, C. Bauer, F. Duprat, C.A. Briggs, S. Chakraborty, G.E. Stutzmann, M.L. Shelanski, F. Checler, M. Chami, and A.R. Marks. 2017. Post-translational remodeling of ryanodine receptor induces calcium leak leading to Alzheimer's disease-like pathologies and cognitive deficits. *Acta Neuropathol* 134:749-767.
- Lacor, P.N., M.C. Buniel, P.W. Furlow, A.S. Clemente, P.T. Velasco, M. Wood, K.L. Viola, and W.L. Klein. 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* 27:796-807.
- Laird, F.M., H. Cai, A.V. Savonenko, M.H. Farah, K. He, T. Melnikova, H. Wen, H.C. Chiang, G. Xu, V.E. Koliatsos, D.R. Borchelt, D.L. Price, H.K. Lee, and P.C. Wong. 2005. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25:11693-11709.
- Lakhani, S.A., A. Masud, K. Kuida, G.A. Porter, Jr., C.J. Booth, W.Z. Mehal, I. Inayat, and R.A. Flavell. 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311:847-851.
- Lalo, U., Y. Pankratov, V. Parpura, and A. Verkhratsky. 2011. Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: what is the role of "excitable" molecules in non-excitable cells. *Biochim Biophys Acta* 1813:992-1002.
- Lam, E., S.H. Choi, T.K. Pareek, B.G. Kim, and J.J. Letterio. 2015. Cyclin-dependent kinase 5 represses Foxp3 gene expression and Treg development through specific phosphorylation of Stat3 at Serine 727. *Mol Immunol* 67:317-324.
- Lambert, M.P., A.K. Barlow, B.A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T.E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K.L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C.E. Finch, G.A. Krafft, and W.L. Klein. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-6453.
- Lanner, J.T., D.K. Georgiou, A.D. Joshi, and S.L. Hamilton. 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003996.
- Larson, J., G. Lynch, D. Games, and P. Seubert. 1999. Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res* 840:23-35.
- Lashley, T., J.M. Schott, P. Weston, C.E. Murray, H. Wellington, A. Keshavan, S.C. Foti, M. Foiani, J. Toombs, J.D. Rohrer, A. Heslegrave, and H. Zetterberg. 2018. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects. *Dis Model Mech* 11:
- Leahy, K.P., K.J. Davies, M. Dull, J.J. Kort, K.W. Lawrence, and D.R. Crawford. 1999. adapt78, a stress-inducible

- mRNA, is related to the glucose-regulated protein family of genes. *Arch Biochem Biophys* 368:67-74.
- Lechner, M., P. Lirk, and J. Rieder. 2005. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol* 15:277-289.
- Lemere, C.A. 2007. A beneficial role for IL-1 beta in Alzheimer disease? *J Clin Invest* 117:1483-1485.
- Lesne, S., M.T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C.G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, and K.H. Ashe. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352-357.
- Leuba, G., G. Wernli, A. Vernay, R. Kraftsik, M.H. Mohajeri, and K.D. Saini. 2005. Neuronal and nonneuronal quantitative BACE immunocytochemical expression in the entorhinohippocampal and frontal regions in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 19:171-183.
- Levy, D.E., and J.E. Darnell, Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:651-662.
- Li, C., R. Zhao, K. Gao, Z. Wei, M.Y. Yin, L.T. Lau, D. Chui, and A.C. Yu. 2011. Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 8:67-80.
- Li, L., S.H. Cheung, E.L. Evans, and P.E. Shaw. 2010. Modulation of gene expression and tumor cell growth by redox modification of STAT3. *Cancer Res* 70:8222-8232.
- Li, L., and P.E. Shaw. 2004. A STAT3 dimer formed by inter-chain disulphide bridging during oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1005-1011.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, and X. Wang. 1997a. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Li, S., M. Mallory, M. Alford, S. Tanaka, and E. Masliah. 1997b. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:901-911.
- Licastro, F., L.M. Grimaldi, M. Bonafe, C. Martina, F. Olivieri, L. Cavallone, S. Giovannetti, E. Masliah, and C. Franceschi. 2003. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging* 24:921-926.
- Licastro, F., S. Pedrini, L. Caputo, G. Annoni, L.J. Davis, C. Ferri, V. Casadei, and L.M. Grimaldi. 2000. Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *J Neuroimmunol* 103:97-102.
- Lillig, C.H., and A. Holmgren. 2007. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal* 9:25-47.
- Lipton, S.A., Y.B. Choi, N.J. Sucher, and H.S. Chen. 1998. Neuroprotective versus neurodestructive effects of NO-related species. *Biofactors* 8:33-40.
- Liu, F., I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, and C.X. Gong. 2005a. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22:1942-1950.
- Liu, F., I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. Oda, K. Tomizawa, and C.X. Gong. 2005b. Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. *J Biol Chem* 280:37755-37762.
- Liu, X., M.J. Betzenhauser, S. Reiken, A.C. Meli, W. Xie, B.X. Chen, O. Arancio, and A.R. Marks. 2012. Role of leaky neuronal ryanodine receptors in stress-induced cognitive dysfunction. *Cell* 150:1055-1067.
- Liu, X., Y. Tian, N. Lu, T. Gin, C.H. Cheng, and M.T. Chan. 2013. Stat3 inhibition attenuates mechanical allodynia through transcriptional regulation of chemokine expression in spinal astrocytes. *PLoS One* 8:e75804.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Lobos, P., B. Bruna, A. Cordova, P. Barattini, J.L. Galaz, T. Adasme, C. Hidalgo, P. Munoz, and A. Paula-Lima. 2016. Astaxanthin Protects Primary Hippocampal Neurons against Noxious Effects of Abeta-Oligomers. *Neural Plast* 2016:3456783.
- Luanpitpong, S., P. Chanvorachote, U. Nimmanit, S.S. Leonard, C. Stehlik, L. Wang, and Y. Rojanasakul. 2012. Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination. *Biochem Pharmacol* 83:1643-1654.
- Lukyanov, K.A., and V.V. Belousov. 2014. Genetically encoded fluorescent redox sensors. *Biochim Biophys Acta* 1840:745-756.
- Luth, H.J., M. Holzer, U. Gartner, M. Staufienbiel, and T. Arendt. 2001. Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res* 913:57-67.
- Magrane, J., R.A. Christensen, K.M. Rosen, V. Veereshwarayya, and H.W. Querfurth. 2006. Dissociation of ERK and Akt signaling in endothelial cell angiogenic responses to beta-amyloid. *Exp Cell Res* 312:996-1010.
- Mahboubi, K., F. Li, J. Plescia, N.C. Kirkiles-Smith, M. Mesri, Y. Du, J.M. Carroll, J.A. Elias, D.C. Altieri, and J.S. Pober. 2001. Interleukin-11 up-regulates survivin expression in endothelial cells through a signal transducer and activator of transcription-3 pathway. *Lab Invest* 81:327-334.
- Malarkey, E.B., and V. Parpura. 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* 52:142-154.
- Malik, M., I. Parikh, J.B. Vasquez, C. Smith, L. Tai, G. Bu, M.J. LaDu, D.W. Fardo, G.W. Rebeck, and S. Estus. 2015. Genetics ignite focus on microglial inflammation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 10:52.
- Mamber, C., D.A. Kozareva, W. Kamphuis, and E.M. Hol. 2013. Shades of gray: The delineation of marker

- expression within the adult rodent subventricular zone. *Prog Neurobiol* 111:1-16.
- Manickam, M., and R. Tulsawani. 2014. Survival response of hippocampal neurons under low oxygen conditions induced by Hippophae rhamnoides is associated with JAK/STAT signaling. *PLoS One* 9:e87694.
- Marengo, J.J., C. Hidalgo, and R. Bull. 1998. Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels of excitable cells. *Biophys J* 74:1263-1277.
- Martin, W., G.M. Villani, D. Jothianandan, and R.F. Furchgott. 1985. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 232:708-716.
- Martineau, M., V. Papura, and J.P. Mothet. 2014. Cell-type specific mechanisms of D-serine uptake and release in the brain. *Front Synaptic Neurosci* 6:12.
- Martinvalet, D., P. Zhu, and J. Lieberman. 2005. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22:355-370.
- Masliah, E., M. Alford, R. DeTeresa, M. Mallory, and L. Hansen. 1996. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 40:759-766.
- Masliah, E., M. Alford, M. Mallory, E. Rockenstein, D. Moechars, and F. Van Leuven. 2000. Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *Exp Neurol* 163:381-387.
- Masuoka, N., H. Kodama, T. Abe, D.H. Wang, and T. Nakano. 2003. Characterization of hydrogen peroxide removal reaction by hemoglobin in the presence of reduced pyridine nucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1637:46-54.
- Mattson, M.P. 2010. ER calcium and Alzheimer's disease: in a state of flux. *Sci Signal* 3:pe10.
- Maziere, C., G. Alimardani, F. Dantin, F. Dubois, M.A. Conte, and J.C. Maziere. 1999. Oxidized LDL activates STAT1 and STAT3 transcription factors: possible involvement of reactive oxygen species. *FEBS Lett* 448:49-52.
- McGeer, P.L., and E.G. McGeer. 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21:195-218.
- McGregor, G., A.J. Irving, and J. Harvey. 2017. Canonical JAK-STAT signaling is pivotal for long-term depression at adult hippocampal temporoammonic-CA1 synapses. *FASEB J* 31:3449-3466.
- Meeker, K.D., J.S. Meabon, and D.G. Cook. 2015. Partial Loss of the Glutamate Transporter GLT-1 Alters Brain Akt and Insulin Signaling in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 45:509-520.
- Mehta, S.T., X. Luo, K.K. Park, J.L. Bixby, and V.P. Lemmon. 2016. Hyperactivated Stat3 boosts axon regeneration in the CNS. *Exp Neurol* 280:115-120.
- Minkeviciene, R., S. Rheims, M.B. Dobszay, M. Zilberter, J. Hartikainen, L. Fulop, B. Penke, Y. Zilberter, T. Harkany, A. Pitkanen, and H. Tanila. 2009. Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci* 29:3453-3462.
- Mitchell, J.B., A. Samuni, M.C. Krishna, W.G. DeGraff, M.S. Ahn, U. Samuni, and A. Russo. 1990. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry* 29:2802-2807.
- Mohammad Abdul, H., I. Baig, H. Levine, 3rd, R.P. Guttmann, and C.M. Norris. 2011. Proteolysis of calcineurin is increased in human hippocampus during mild cognitive impairment and is stimulated by oligomeric A β in primary cell culture. *Aging Cell* 10:103-113.
- Mookherjee, P., P.S. Green, G.S. Watson, M.A. Marques, K. Tanaka, K.D. Meeker, J.S. Meabon, N. Li, P. Zhu, V.G. Olson, and D.G. Cook. 2011. GLT-1 loss accelerates cognitive deficit onset in an Alzheimer's disease animal model. *J Alzheimers Dis* 26:447-455.
- Morgan, D. 2006. Modulation of microglial activation state following passive immunization in amyloid depositing transgenic mice. *Neurochem Int* 49:190-194.
- Mrak, R.E., J.G. Sheng, and W.S. Griffin. 1996. Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:273-279.
- Mucke, L., E. Masliah, G.Q. Yu, M. Mallory, E.M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood, and L. McConlogue. 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-4058.
- Munoz, P., A. Humeres, C. Elgueta, A. Kirkwood, C. Hidalgo, and M.T. Nunez. 2011. Iron mediates N-methyl-D-aspartate receptor-dependent stimulation of calcium-induced pathways and hippocampal synaptic plasticity. *J Biol Chem* 286:13382-13392.
- Munoz, P., G. Zavala, K. Castillo, P. Aguirre, C. Hidalgo, and M.T. Nunez. 2006. Effect of iron on the activation of the MAPK/ERK pathway in PC12 neuroblastoma cells. *Biol Res* 39:189-190.
- Munoz, Y., A.C. Paula-Lima, and M.T. Nunez. 2018. Reactive oxygen species released from astrocytes treated with amyloid beta oligomers elicit neuronal calcium signals that decrease phospho-Ser727-STAT3 nuclear content. *Free Radic Biol Med* 117:132-144.
- Murase, S. 2013. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) degradation by proteasome controls a developmental switch in neurotrophin dependence. *J Biol Chem* 288:20151-20161.
- Murase, S., E. Kim, L. Lin, D.A. Hoffman, and R.D. McKay. 2012. Loss of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling during elevated activity causes vulnerability in hippocampal neurons. *J Neurosci* 32:15511-15520.

- Nagamoto-Combs, K., and C.K. Combs. 2010. Microglial phenotype is regulated by activity of the transcription factor, NFAT (nuclear factor of activated T cells). *J Neurosci* 30:9641-9646.
- Nam, S., R. Buettner, J. Turkson, D. Kim, J.Q. Cheng, S. Muehlbeyer, F. Hippe, S. Vatter, K.H. Merz, G. Eisenbrand, and R. Jove. 2005. Iridubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5998-6003.
- Namgaladze, D., H.W. Hofer, and V. Ullrich. 2002. Redox control of calcineurin by targeting the binuclear Fe(2+)-Zn(2+) center at the enzyme active site. *J Biol Chem* 277:5962-5969.
- Narayan, P., K.M. Holmstrom, D.H. Kim, D.J. Whitcomb, M.R. Wilson, P. St George-Hyslop, N.W. Wood, C.M. Dobson, K. Cho, A.Y. Abramov, and D. Klenerman. 2014. Rare individual amyloid-beta oligomers act on astrocytes to initiate neuronal damage. *Biochemistry* 53:2442-2453.
- Nicolas, C.S., S. Peineau, M. Amici, Z. Csaba, A. Fafouri, C. Javalet, V.J. Collett, L. Hildebrandt, G. Seaton, S.L. Choi, S.E. Sim, C. Bradley, K. Lee, M. Zhuo, B.K. Kaang, P. Gressens, P. Dournaud, S.M. Fitzjohn, Z.A. Bortolotto, K. Cho, and G.L. Collingridge. 2012. The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity. *Neuron* 73:374-390.
- Nicholson, D.W., A. Ali, N.A. Thornberry, J.P. Vaillancourt, C.K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P.R. Griffin, M. Labelle, Y.A. Lazechnik, and et al. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37-43.
- Nobuta, H., C.A. Ghiani, P.M. Paez, V. Spreuer, H. Dong, R.A. Korsak, A. Manukyan, J. Li, H.V. Vinters, E.J. Huang, D.H. Rowitch, M.V. Sofroniew, A.T. Campagnoni, J. de Vellis, and J.A. Waschek. 2012. STAT3-mediated astrogliosis protects myelin development in neonatal brain injury. *Ann Neurol* 72:750-765.
- Noebels, J. 2011. A perfect storm: Converging paths of epilepsy and Alzheimer's dementia intersect in the hippocampal formation. *Epilepsia* 52 Suppl 1:39-46.
- Norbury, C.J., and I.D. Hickson. 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:367-401.
- Norris, C.M., I. Kadish, E.M. Blalock, K.C. Chen, V. Thibault, N.M. Porter, P.W. Landfield, and S.D. Kraner. 2005. Calcineurin triggers reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer's models. *J Neurosci* 25:4649-4658.
- Norris, J.G., L.P. Tang, S.M. Sparacio, and E.N. Benveniste. 1994. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 152:841-850.
- Norris, P.J., R.L. Faull, and P.C. Emson. 1996. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA expression and NADPH-diaphorase staining in the frontal cortex, visual cortex and hippocampus of control and Alzheimer's disease brains. *Brain Res Mol Brain Res* 41:36-49.
- O'Callaghan, J.P., K.A. Kelly, R.L. VanGilder, M.V. Sofroniew, and D.B. Miller. 2014. Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. *PLoS One* 9:e102003.
- O'Nuallain, B., I. Klyubin, J.M. Mc Donald, J.S. Foster, A. Welzel, A. Barry, R.K. Dykoski, J.P. Cleary, M.F. Gebbink, M.J. Rowan, and D.M. Walsh. 2011. A monoclonal antibody against synthetic Abeta dimer assemblies neutralizes brain-derived synaptic plasticity-disrupting Abeta. *J Neurochem* 119:189-201.
- Oberheim, N.A., T. Takano, X. Han, W. He, J.H. Lin, F. Wang, Q. Xu, J.D. Wyatt, W. Pilcher, J.G. Ojemann, B.R. Ransom, S.A. Goldman, and M. Nedergaard. 2009. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29:3276-3287.
- Ogasawara, M.A., and H. Zhang. 2009. Redox regulation and its emerging roles in stem cells and stem-like cancer cells. *Antioxid Redox Signal* 11:1107-1122.
- Okamura, H., J. Aramburu, C. Garcia-Rodriguez, J.P. Viola, A. Raghavan, M. Tahiliani, X. Zhang, J. Qin, P.G. Hogan, and A. Rao. 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6:539-550.
- Olabarria, M., H.N. Noristani, A. Verkhratsky, and J.J. Rodriguez. 2010. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* 58:831-838.
- Ono, K., M.M. Condron, and D.B. Teplow. 2009. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14745-14750.
- Orre, M., W. Kamphuis, L.M. Osborn, A.H.P. Jansen, L. Kooijman, K. Bossers, and E.M. Hol. 2014. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging* 35:2746-2760.
- Oules, B., D. Del Prete, B. Greco, X. Zhang, I. Lauritzen, J. Sevalle, S. Moreno, P. Paterlini-Brechot, M. Trebak, F. Checler, F. Benfenati, and M. Chami. 2012. Ryanodine receptor blockade reduces amyloid-beta load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease. *J Neurosci* 32:11820-11834.
- Palop, J.J., J. Chin, E.D. Roberson, J. Wang, M.T. Thwin, N. Bien-Ly, J. Yoo, K.O. Ho, G.Q. Yu, A. Kreitzer, S. Finkbeiner, J.L. Noebels, and L. Mucke. 2007. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55:697-711.
- Palop, J.J., and L. Mucke. 2010. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 13:812-818.
- Panatier, A., D.T. Theodosis, J.P. Mothet, B. Touquet, L. Pollegioni, D.A. Poulain, and S.H. Oliet. 2006. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775-784.
- Pang, L., Y. Cai, E.H. Tang, D. Yan, R. Kosuru, H. Li, M.G. Irwin, H. Ma, and Z. Xia. 2016. Cox-2 Inhibition

- Protects against Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cardiomyocyte Apoptosis via Akt-Dependent Enhancement of iNOS Expression. *Oxid Med Cell Longev* 2016:3453059.
- Pangrsic, T., M. Potokar, M. Stenovec, M. Kreft, E. Fabbretti, A. Nistri, E. Pryazhnikov, L. Khiroug, R. Giniatullin, and R. Zorec. 2007. Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J Biol Chem* 282:28749-28758.
- Parajuli, B., Y. Sonobe, H. Horiuchi, H. Takeuchi, T. Mizuno, and A. Suzumura. 2013. Oligomeric amyloid beta induces IL-1beta processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell Death Dis* 4:e975.
- Park, K.W., J. Kundu, I.G. Chae, D.H. Kim, M.H. Yu, J.K. Kundu, and K.S. Chun. 2014. Carnosol induces apoptosis through generation of ROS and inactivation of STAT3 signaling in human colon cancer HCT116 cells. *Int J Oncol* 44:1309-1315.
- Parpura-Gill, A., D. Beitz, and E. Uemura. 1997. The inhibitory effects of beta-amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes. *Brain Res* 754:65-71.
- Parpura, V., B.J. Baker, M. Jeras, and R. Zorec. 2010. Regulated exocytosis in astrocytic signal integration. *Neurochem Int* 57:451-459.
- Parpura, V., and R. Zorec. 2010. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 63:83-92.
- Parry, S., J. Holder, M.W. Halterman, M.D. Weitzman, A.R. Davis, H. Federoff, and J.F. Strauss, 3rd. 1998. Transduction of human trophoblastic cells by replication-deficient recombinant viral vectors. Promoting cellular differentiation affects virus entry. *Am J Pathol* 152:1521-1529.
- Patrick, G.N., L. Zukerberg, M. Nikolic, S. de la Monte, P. Dikkes, and L.H. Tsai. 1999. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402:615-622.
- Patten, D.A., M. Germain, M.A. Kelly, and R.S. Slack. 2010. Reactive Oxygen Species: Stuck in the Middle of Neurodegeneration. *Journal of Alzheimers Disease* 20:S357-S367.
- Paula-Lima, A.C., T. Adasme, and C. Hidalgo. 2014. Contribution of Ca²⁺ release channels to hippocampal synaptic plasticity and spatial memory: potential redox modulation. *Antioxid Redox Signal* 21:892-914.
- Paula-Lima, A.C., T. Adasme, C. SanMartin, A. Sebollela, C. Hetz, M.A. Carrasco, S.T. Ferreira, and C. Hidalgo. 2011. Amyloid beta-peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca²⁺ release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. *Antioxid Redox Signal* 14:1209-1223.
- Paula-Lima, A.C., J. Brito-Moreira, and S.T. Ferreira. 2013. Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 126:191-202.
- Pellegrino, M.J., and B.A. Habecker. 2013. STAT3 integrates cytokine and neurotrophin signals to promote sympathetic axon regeneration. *Mol Cell Neurosci* 56:272-282.
- Phulwani, N.K., N. Esen, M.M. Syed, and T. Kielian. 2008. TLR2 expression in astrocytes is induced by TNF-alpha- and NF-kappa B-dependent pathways. *J Immunol* 181:3841-3849.
- Pike, C.J., A.J. Walencewicz, C.G. Glabe, and C.W. Cotman. 1991. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* 563:311-314.
- Pleiss, M.M., P. Sompol, S.D. Kraner, H.M. Abdul, J.L. Furman, R.P. Guttman, D.M. Wilcock, P.T. Nelson, and C.M. Norris. 2016. Calcineurin proteolysis in astrocytes: Implications for impaired synaptic function. *Biochim Biophys Acta* 1862:1521-1532.
- Podlisny, M.B., B.L. Ostaszewski, S.L. Squazzo, E.H. Koo, R.E. Rydell, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. 1995. Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. *J Biol Chem* 270:9564-9570.
- Possel, H., H. Noack, J. Putzke, G. Wolf, and H. Sies. 2000. Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia* 32:51-59.
- Putcha, D., M. Brickhouse, K. O'Keefe, C. Sullivan, D. Rentz, G. Marshall, B. Dickerson, and R. Sperling. 2011. Hippocampal hyperactivation associated with cortical thinning in Alzheimer's disease signature regions in non-demented elderly adults. *J Neurosci* 31:17680-17688.
- Qi, Q.R., and Z.M. Yang. 2014. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3. *World J Biol Chem* 5:231-239.
- Qian, W., X. Yin, W. Hu, J. Shi, J. Gu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, C.X. Gong, and F. Liu. 2011. Activation of protein phosphatase 2B and hyperphosphorylation of Tau in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 23:617-627.
- Qu, J., T. Nakamura, G. Cao, E.A. Holland, S.R. McKercher, and S.A. Lipton. 2011. S-Nitrosylation activates Cdk5 and contributes to synaptic spine loss induced by beta-amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:14330-14335.
- Qu, Y., A.M. Oyan, R. Liu, Y. Hua, J. Zhang, R. Hovland, M. Popa, X. Liu, K.A. Brokstad, R. Simon, A. Molven, B. Lin, W.D. Zhang, E. McCormack, K.H. Kalland, and X.S. Ke. 2013. Generation of prostate tumor-initiating cells is associated with elevation of reactive oxygen species and IL-6/STAT3 signaling. *Cancer Res* 73:7090-7100.
- Raivich, G., M. Bohatschek, C.U. Kloss, A. Werner, L.L. Jones, and G.W. Kreutzberg. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105.

- Rajan, P., A.J. Symes, and J.S. Fink. 1996. STAT proteins are activated by ciliary neurotrophic factor in cells of central nervous system origin. *J Neurosci Res* 43:403-411.
- Reese, L.C., and G. Tagliatela. 2011. A role for calcineurin in Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 9:685-692.
- Reese, L.C., W. Zhang, K.T. Dineley, R. Kaye, and G. Tagliatela. 2008. Selective induction of calcineurin activity and signaling by oligomeric amyloid beta. *Aging Cell* 7:824-835.
- Ren, X., L. Zou, X. Zhang, V. Branco, J. Wang, C. Carvalho, A. Holmgren, and J. Lu. 2017. Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System. *Antioxid Redox Signal* 27:989-1010.
- Riedel, G., B. Platt, and J. Micheau. 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140:1-47.
- Rodriguez, J.J., C.Y. Yeh, S. Terzieva, M. Olabarria, M. Kulijewicz-Nawrot, and A. Verkhratsky. 2014. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging* 35:15-23.
- Rogers, T.B., G. Inesi, R. Wade, and W.J. Lederer. 1995. Use of thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells. *Biosci Rep* 15:341-349.
- Rojanathammanee, L., A.M. Floden, G.D. Manocha, and C.K. Combs. 2015. Attenuation of microglial activation in a mouse model of Alzheimer's disease via NFAT inhibition. *J Neuroinflammation* 12:42.
- Rosen, A., and L. Casciola-Rosen. 1997. Macromolecular substrates for the ICE-like proteases during apoptosis. *J Cell Biochem* 64:50-54.
- Rossi, F., and E. Bianchini. 1996. Synergistic induction of nitric oxide by beta-amyloid and cytokines in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 225:474-478.
- Rossner, S., C. Lange-Dohna, U. Zeitschel, and J.R. Perez-Polo. 2005. Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *J Neurochem* 92:226-234.
- Rothermel, B., R.B. Vega, J. Yang, H. Wu, R. Bassel-Duby, and R.S. Williams. 2000. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem* 275:8719-8725.
- Rothwell, N.J., and G.N. Luheshi. 2000. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci* 23:618-625.
- Rusnak, F., and P. Mertz. 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80:1483-1521.
- Saelens, X., N. Festjens, L. Vande Walle, M. van Gorp, G. van Loo, and P. Vandenabeele. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23:2861-2874.
- Saez, J.C., J.A. Kessler, M.V. Bennett, and D.C. Spray. 1987. Superoxide dismutase protects cultured neurons against death by starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3056-3059.
- Sahara, S., M. Aoto, Y. Eguchi, N. Imamoto, Y. Yoneda, and Y. Tsujimoto. 1999. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401:168-173.
- Samai, M., M.A. Sharpe, P.R. Gard, and P.K. Chatterjee. 2007. Comparison of the effects of the superoxide dismutase mimetics EUK-134 and tempol on paraquat-induced nephrotoxicity. *Free Radic Biol Med* 43:528-534.
- Sanghavi, D.M., M. Thelen, N.A. Thornberry, L. Casciola-Rosen, and A. Rosen. 1998. Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Lett* 422:179-184.
- SanMartin, C.D., P. Veloso, T. Adasme, P. Lobos, B. Bruna, J. Galaz, A. Garcia, S. Hartel, C. Hidalgo, and A.C. Paula-Lima. 2017. RyR2-Mediated Ca(2+) Release and Mitochondrial ROS Generation Partake in the Synaptic Dysfunction Caused by Amyloid beta Peptide Oligomers. *Front Mol Neurosci* 10:115.
- Saresella, M., F. La Rosa, F. Piancone, M. Zoppis, I. Marventano, E. Calabrese, V. Rainone, R. Nemni, R. Mancuso, and M. Clerici. 2016. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 11:23.
- Sattler, R., and J.D. Rothstein. 2006. Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol* 277-303.
- Sawada, M., A. Suzumura, and T. Marunouchi. 1992. TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res* 583:296-299.
- Scimemi, A., J.S. Meabon, R.L. Woltjer, J.M. Sullivan, J.S. Diamond, and D.G. Cook. 2013. Amyloid-beta1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. *J Neurosci* 33:5312-5318.
- Scott, H.A., F.M. Gebhardt, A.D. Mitrovic, R.J. Vandenberg, and P.R. Dodd. 2011. Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32:553 e551-511.
- Schallier, A., I. Smolders, D. Van Dam, E. Loyens, P.P. De Deyn, A. Michotte, Y. Michotte, and A. Massie. 2011. Region- and age-specific changes in glutamate transport in the AbetaPP23 mouse model for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 24:287-300.
- Scholl, M., S.F. Carter, E. Westman, E. Rodriguez-Vieitez, O. Almkvist, S. Thordardottir, A. Wall, C. Graff, B. Langstrom, and A. Nordberg. 2015. Early astrocytosis in autosomal dominant Alzheimer's disease measured in vivo by multi-tracer positron emission tomography. *Sci Rep* 5:16404.
- Schuringa, J.J., H. Schepers, E. Vellenga, and W. Kruijer. 2001. Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation. *FEBS Lett* 495:71-76.

- Schweizer, U., J. Gunnarsen, C. Karch, S. Wiese, B. Holtmann, K. Takeda, S. Akira, and M. Sendtner. 2002. Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *J Cell Biol* 156:287-297.
- Seifert, G., K. Schilling, and C. Steinhauser. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194-206.
- Seifert, G., and C. Steinhauser. 2001. Ionotropic glutamate receptors in astrocytes. *Prog Brain Res* 132:287-299.
- Selkoe, D.J. 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789-791.
- Selkoe, D.J. 2008. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192:106-113.
- Selkoe, D.J., and J. Hardy. 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8:595-608.
- Selmaj, K.W., M. Farooq, W.T. Norton, C.S. Raine, and C.F. Brosnan. 1990. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* 144:129-135.
- Shaftel, S.S., S. Kyrkanides, J.A. Olschowka, J.N. Miller, R.E. Johnson, and M.K. O'Banion. 2007. Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J Clin Invest* 117:1595-1604.
- Shankar, G.M., B.L. Bloodgood, M. Townsend, D.M. Walsh, D.J. Selkoe, and B.L. Sabatini. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27:2866-2875.
- Shankar, G.M., S. Li, T.H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N.E. Shepardson, I. Smith, F.M. Brett, M.A. Farrell, M.J. Rowan, C.A. Lemere, C.M. Regan, D.M. Walsh, B.L. Sabatini, and D.J. Selkoe. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-842.
- Sharpe, M.A., R. Olsson, V.C. Stewart, and J.B. Clark. 2002. Oxidation of nitric oxide by oxomanganese-salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics. *Biochem J* 366:97-107.
- Shelat, P.B., M. Chalimoniuk, J.H. Wang, J.B. Strosznajder, J.C. Lee, A.Y. Sun, A. Simonyi, and G.Y. Sun. 2008. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* 106:45-55.
- Shen, Y., K. Schlessinger, X. Zhu, E. Meffre, F. Quimby, D.E. Levy, and J.E. Darnell, Jr. 2004. Essential role of STAT3 in postnatal survival and growth revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 24:407-419.
- Shibata, N., T. Ohnuma, T. Takahashi, H. Baba, T. Ishizuka, M. Ohtsuka, A. Ueki, M. Nagao, and H. Arai. 2002. Effect of IL-6 polymorphism on risk of Alzheimer disease: genotype-phenotype association study in Japanese cases. *Am J Med Genet* 114:436-439.
- Shibata, N., T. Yamamoto, A. Hiroi, Y. Omi, Y. Kato, and M. Kobayashi. 2010. Activation of STAT3 and inhibitory effects of pioglitazone on STAT3 activity in a mouse model of SOD1-mutated amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 30:353-360.
- Shimohama, S., H. Tanino, and S. Fujimoto. 1999. Changes in caspase expression in Alzheimer's disease: comparison with development and aging. *Biochem Biophys Res Commun* 256:381-384.
- Shimohama, S., H. Tanino, N. Kawakami, N. Okamura, H. Kodama, T. Yamaguchi, T. Hayakawa, A. Nunomura, S. Chiba, G. Perry, M.A. Smith, and S. Fujimoto. 2000. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Commun* 273:5-9.
- Shiratori-Hayashi, M., K. Koga, H. Tozaki-Saitoh, Y. Kohro, H. Toyonaga, C. Yamaguchi, A. Hasegawa, T. Nakahara, J. Hachisuka, S. Akira, H. Okano, M. Furue, K. Inoue, and M. Tsuda. 2015. STAT3-dependent reactive astrogliosis in the spinal dorsal horn underlies chronic itch. *Nat Med* 21:927-931.
- Shirogane, T., T. Fukada, J.M. Muller, D.T. Shima, M. Hibi, and T. Hirano. 1999. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 11:709-719.
- Simard, M., and M. Nedergaard. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-896.
- Simon, A.R., U. Rai, B.L. Fanburg, and B.H. Cochran. 1998. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol* 275:C1640-1652.
- Singh-Mallah, G., C.D. McMahon, J. Guan, and K. Singh. 2017. Cyclic-glycine-proline accelerates mammary involution by promoting apoptosis and inhibiting IGF-1 function. *J Cell Physiol* 232:3369-3383.
- Singh, I., J. Kim, A.K. Singh, A.K. Sharma, and J.S. Won. 2015. STAT3 Regulation By S-Nitrosylation: Implication In Cancer. *Redox Biol* 5:416-417.
- Siskova, Z., D. Justus, H. Kaneko, D. Friedrichs, N. Henneberg, T. Beutel, J. Pitsch, S. Schoch, A. Becker, H. von der Kammer, and S. Remy. 2014. Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 84:1023-1033.
- Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276:7320-7326.
- Smith, M.A., P.L. Richey Harris, L.M. Sayre, J.S. Beckman, and G. Perry. 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17:2653-2657.

- Sobotta, M.C., W. Liou, S. Stocker, D. Talwar, M. Oehler, T. Ruppert, A.N. Scharf, and T.P. Dick. 2015. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat Chem Biol* 11:64-70.
- Sofroniew, M.V., and H.V. Vinters. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.
- Solaroglu, I., T. Tsubokawa, J. Cahill, and J.H. Zhang. 2006. Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience* 143:965-974.
- Sompol, P., J.L. Furman, M.M. Pleiss, S.D. Kraner, I.A. Artiushin, S.R. Batten, J.E. Quintero, L.A. Simmerman, T.L. Beckett, M.A. Lovell, M.P. Murphy, G.A. Gerhardt, and C.M. Norris. 2017. Calcineurin/NFAT Signaling in Activated Astrocytes Drives Network Hyperexcitability in Abeta-Bearing Mice. *J Neurosci* 37:6132-6148.
- Stark, G.R., and J.E. Darnell, Jr. 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36:503-514.
- Stephanou, A., B.K. Brar, R.A. Knight, and D.S. Latchman. 2000. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ* 7:329-330.
- Stine, W.B., Jr., K.N. Dahlgren, G.A. Krafft, and M.J. LaDu. 2003. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* 278:11612-11622.
- Stutzmann, G.E., I. Smith, A. Caccamo, S. Oddo, F.M. Laferla, and I. Parker. 2006. Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca²⁺ disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 26:5180-5189.
- Stutzmann, G.E., I. Smith, A. Caccamo, S. Oddo, I. Parker, and F. Laferla. 2007. Enhanced ryanodine-mediated calcium release in mutant PS1-expressing Alzheimer's mouse models. *Ann N Y Acad Sci* 1097:265-277.
- Supnet, C., J. Grant, H. Kong, D. Westaway, and M. Mayne. 2006. Amyloid-beta-(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function in neurons of TgCRND8 mice. *J Biol Chem* 281:38440-38447.
- Supnet, C., C. Noonan, K. Richard, J. Bradley, and M. Mayne. 2010. Up-regulation of the type 3 ryanodine receptor is neuroprotective in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 112:356-365.
- Sutko, J.L., J.A. Airey, W. Welch, and L. Ruest. 1997. The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacol Rev* 49:53-98.
- Sztydlowska, K., and M. Tymianski. 2010. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47:122-129.
- Tahara, K., H.D. Kim, J.J. Jin, J.A. Maxwell, L. Li, and K. Fukuchi. 2006. Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain* 129:3006-3019.
- Takeda, K., and S. Akira. 2000. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:199-207.
- Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3801-3804.
- Tamm, I., Y. Wang, E. Sausville, D.A. Scudiero, N. Vigna, T. Oltersdorf, and J.C. Reed. 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58:5315-5320.
- Tan, J., T. Town, F. Crawford, T. Mori, A. DelleDonne, R. Crescentini, D. Obregon, R.A. Flavell, and M.J. Mullan. 2002. Role of CD40 ligand in amyloidosis in transgenic Alzheimer's mice. *Nat Neurosci* 5:1288-1293.
- Tang, D., and V.J. Kidd. 1998. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem* 273:28549-28552.
- Tarkowski, E., K. Blennow, A. Wallin, and A. Tarkowski. 1999. Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *J Clin Immunol* 19:223-230.
- Teraoka, H., Y. Yumoto, F. Watanabe, K. Tsukada, A. Suwa, M. Enari, and S. Nagata. 1996. CPP32/Yama/apopain cleaves the catalytic component of DNA-dependent protein kinase in the holoenzyme. *FEBS Lett* 393:1-6.
- Terry, R.D., E. Masliah, D.P. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L.A. Hansen, and R. Katzman. 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.
- Thiemermann, C. 2003. Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit Care Med* 31:S76-84.
- Townsend, M., G.M. Shankar, T. Mehta, D.M. Walsh, and D.J. Selkoe. 2006. Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572:477-492.
- Tsigelny, I.F., Y. Sharikov, V.L. Kouznetsova, J.P. Greenberg, W. Wrasidlo, T. Gonzalez, P. Desplats, S.E. Michael, M. Trejo-Morales, C.R. Overk, and E. Masliah. 2014. Structural diversity of Alzheimer's disease amyloid-beta dimers and their role in oligomerization and fibril formation. *J Alzheimers Dis* 39:583-600.
- Tymianski, M., M.P. Charlton, P.L. Carlen, and C.H. Tator. 1993. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci* 13:2085-2104.
- Ulrich, J.D., M.S. Kim, P.R. Houlihan, L.P. Shutov, D.P. Mohapatra, S. Strack, and Y.M. Usachev. 2012. Distinct activation properties of the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) isoforms NFATc3 and NFATc4 in neurons. *J Biol Chem* 287:37594-37609.

- Urrutia, P.J., E.C. Hirsch, C. Gonzalez-Billault, and M.T. Nunez. 2017. Hepcidin attenuates amyloid beta-induced inflammatory and pro-oxidant responses in astrocytes and microglia. *J Neurochem* 142:140-152.
- Urrutia, P.J., N.P. Mena, and M.T. Nunez. 2014. The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol* 5:38.
- van Kralingen, C., D.T. Kho, J. Costa, C.E. Angel, and E.S. Graham. 2013. Exposure to inflammatory cytokines IL-1beta and TNFalpha induces compromise and death of astrocytes; implications for chronic neuroinflammation. *PLoS One* 8:e84269.
- van Loo, G., M. van Gorp, B. Depuydt, S.M. Srinivasula, I. Rodriguez, E.S. Alnemri, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, W. Declercq, and P. Vandenabeele. 2002. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9:20-26.
- Venkitaramani, D.V., J. Chin, W.J. Netzer, G.K. Gouras, S. Lesne, R. Malinow, and P.J. Lombroso. 2007. Beta-amyloid modulation of synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci* 27:11832-11837.
- Verkhatsky, A., M. Olabarria, H.N. Noristani, C.Y. Yeh, and J.J. Rodriguez. 2010. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 7:399-412.
- Viita, T., and M.K. Vartiainen. 2017. From Cytoskeleton to Gene Expression: Actin in the Nucleus. *Handb Exp Pharmacol* 235:311-329.
- Virtanen, J.A., and M.K. Vartiainen. 2017. Diverse functions for different forms of nuclear actin. *Curr Opin Cell Biol* 46:33-38.
- Viviani, B. 2006. Preparation and coculture of neurons and glial cells. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 2:Unit 2 7.
- Vodovotz, Y., M.S. Lucia, K.C. Flanders, L. Chesler, Q.W. Xie, T.W. Smith, J. Weidner, R. Mumford, R. Webber, C. Nathan, A.B. Roberts, C.F. Lippa, and M.B. Sporn. 1996. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med* 184:1425-1433.
- Vossel, K.A., K.G. Ranasinghe, A.J. Beagle, D. Mizuiri, S.M. Honma, A.F. Dowling, S.M. Darwish, V. Van Berlo, D.E. Barnes, M. Mantle, A.M. Karydas, G. Coppola, E.D. Roberson, B.L. Miller, P.A. Garcia, H.E. Kirsch, L. Mucke, and S.S. Nagarajan. 2016. Incidence and impact of subclinical epileptiform activity in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 80:858-870.
- Walsh, D.M., I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.K. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, and D.J. Selkoe. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.
- Wallace, M.N., J.G. Geddes, D.A. Farquhar, and M.R. Masson. 1997. Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques. *Exp Neurol* 144:266-272.
- Wan, J., A.K. Fu, F.C. Ip, H.K. Ng, J. Hugon, G. Page, J.H. Wang, K.O. Lai, Z. Wu, and N.Y. Ip. 2010. Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:6873-6881.
- Wang, C., J.A. Kaufmann, M.G. Sanchez-Ross, and K.M. Johnson. 2000. Mechanisms of N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in phencyclidine-treated cultured forebrain neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 294:287-295.
- Wang, T., W. Yuan, Y. Liu, Y. Zhang, Z. Wang, X. Zhou, G. Ning, L. Zhang, L. Yao, S. Feng, and X. Kong. 2015. The role of the JAK-STAT pathway in neural stem cells, neural progenitor cells and reactive astrocytes after spinal cord injury. *Biomed Rep* 3:141-146.
- Wang, X., V.C. Culotta, and C.B. Klee. 1996. Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature* 383:434-437.
- Wang, Y., C. Chen, G.J. Loake, and C. Chu. 2010. Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death? *Protein Cell* 1:133-142.
- Wang, Y., T. Veremeyko, A.H. Wong, R. El Fatimy, Z. Wei, W. Cai, and A.M. Krichevsky. 2017. Downregulation of miR-132/212 impairs S-nitrosylation balance and induces tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 51:156-166.
- Wang, Y., J. Yang, and J. Yi. 2012. Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxid Redox Signal* 16:649-657.
- Webster, B., L. Hansen, A. Adame, L. Crews, M. Torrance, L. Thal, and E. Masliah. 2006. Astroglial activation of extracellular-regulated kinase in early stages of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:142-151.
- Wen, Z., and J.E. Darnell, Jr. 1997. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res* 25:2062-2067.
- Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell, Jr. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82:241-250.
- Wenk, G.L. 2006. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 3:3-7; quiz 23.
- Weston, L., A.S. Coutts, and N.B. La Thangue. 2012. Actin nucleators in the nucleus: an emerging theme. *J Cell Sci* 125:3519-3527.

- White, J.A., A.M. Manelli, K.H. Holmberg, L.J. Van Eldik, and M.J. Ladu. 2005. Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol Dis* 18:459-465.
- Widmer, C.C., C.P. Pereira, P. Gehrig, F. Vallelian, G. Schoedon, P.W. Buehler, and D.J. Schaer. 2010. Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Antioxid Redox Signal* 12:185-198.
- Wilhelmsson, U., E.A. Bushong, D.L. Price, B.L. Smarr, V. Phung, M. Terada, M.H. Ellisman, and M. Pekny. 2006. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17513-17518.
- Winterbourn, C.C., and M.B. Hampton. 2008. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med* 45:549-561.
- Wong, A., H.J. Luth, W. Deuther-Conrad, S. Dukic-Stefanovic, J. Gasic-Milenkovic, T. Arendt, and G. Munch. 2001. Advanced glycation endproducts co-localize with inducible nitric oxide synthase in Alzheimer's disease. *Brain Res* 920:32-40.
- Wu, H.Y., E. Hudry, T. Hashimoto, K. Kuchibhotla, A. Rozkalne, Z. Fan, T. Spires-Jones, H. Xie, M. Arbel-Ornath, C.L. Grosskreutz, B.J. Bacskai, and B.T. Hyman. 2010. Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. *J Neurosci* 30:2636-2649.
- Wu, H.Y., K. Tomizawa, Y. Oda, F.Y. Wei, Y.F. Lu, M. Matsushita, S.T. Li, A. Moriwaki, and H. Matsui. 2004. Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. *J Biol Chem* 279:4929-4940.
- Wyssenbach, A., T. Quintela, F. Llaverro, J.L. Zugaza, C. Matute, and E. Alberdi. 2016. Amyloid beta-induced astrogliosis is mediated by beta1-integrin via NADPH oxidase 2 in Alzheimer's disease. *Aging Cell*
- Xie, C.W. 2004. Calcium-regulated signaling pathways: role in amyloid beta-induced synaptic dysfunction. *Neuromolecular Med* 6:53-64.
- Xie, Y., S. Kole, P. Precht, M.J. Pazin, and M. Bernier. 2009. S-glutathionylation impairs signal transducer and activator of transcription 3 activation and signaling. *Endocrinology* 150:1122-1131.
- Xu, M., Y. Dong, S. Wan, T. Yan, J. Cao, L. Wu, K. Bi, and Y. Jia. 2016. Schisantherin B ameliorates Abeta1-42-induced cognitive decline via restoration of GLT-1 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav* 167:265-273.
- Yang, J., M. Chatterjee-Kishore, S.M. Staugaitis, H. Nguyen, K. Schlessinger, D.E. Levy, and G.R. Stark. 2005. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 65:939-947.
- Yang, J., and G.R. Stark. 2008. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* 18:443-451.
- Yang, R.B., M.R. Mark, A. Gray, A. Huang, M.H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W.I. Wood, A.L. Gurney, and P.J. Godowski. 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395:284-288.
- Yang, Y., S. Song, H. Min, X. Chen, and Q. Gao. 2016. STAT3 degradation mediated by calcineurin involved in the neurotoxicity of isoflurane. *Neuroreport* 27:124-130.
- Yatin, S.M., S. Varadarajan, and D.A. Butterfield. 2000. Vitamin E Prevents Alzheimer's Amyloid beta-Peptide (1-42)-Induced Neuronal Protein Oxidation and Reactive Oxygen Species Production. *J Alzheimers Dis* 2:123-131.
- Yeh, C.Y., B. Vadhwana, A. Verkhatsky, and J.J. Rodriguez. 2011. Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *ASN Neuro* 3:271-279.
- Yermolaieva, O., N. Brot, H. Weissbach, S.H. Heinemann, and T. Hoshi. 2000. Reactive oxygen species and nitric oxide mediate plasticity of neuronal calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:448-453.
- Yew, D.T., H.W. Wong, W.P. Li, H.W. Lai, and W.H. Yu. 1999. Nitric oxide synthase neurons in different areas of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 89:675-686.
- Yokokura, M., T. Terada, T. Bunai, K. Nakaizumi, K. Takebayashi, Y. Iwata, E. Yoshikawa, M. Futatsubashi, K. Suzuki, N. Mori, and Y. Ouchi. 2017. Depiction of microglial activation in aging and dementia: Positron emission tomography with [(11)C]DPA713 versus [(11)C](R)PK11195. *J Cereb Blood Flow Metab* 37:877-889.
- Yoon, Y., E.W. Krueger, B.J. Oswald, and M.A. McNiven. 2003. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23:5409-5420.
- Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9:798-809.
- Yuan, S., and B.D. Burrell. 2012. Long-term depression of nociceptive synapses by non-nociceptive afferent activity: role of endocannabinoids, Ca(2)+, and calcineurin. *Brain Res* 1460:1-11.
- Zamanian, J.L., L. Xu, L.C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R.G. Giffard, and B.A. Barres. 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 32:6391-6410.
- Zhang, H., S. Sun, A. Herreman, B. De Strooper, and I. Bezprozvanny. 2010a. Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. *J Neurosci* 30:8566-8580.
- Zhang, P., P.C. Yu, A.H. Tsang, Y. Chen, A.K. Fu, W.Y. Fu, K.K. Chung, and N.Y. Ip. 2010b. S-nitrosylation of

- cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) regulates its kinase activity and dendrite growth during neuronal development. *J Neurosci* 30:14366-14370.
- Zhang, Q., S. Guo, X. Zhang, S. Tang, L. Wang, X. Han, W. Shao, L. Cong, and Y. Du. 2015. Amyloid beta oligomer-induced ERK1/2-dependent serine 636/639 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 impairs insulin signaling and glycogen storage in human astrocytes. *Gene* 561:76-81.
- Zhang, S., W. Li, W. Wang, S.S. Zhang, P. Huang, and C. Zhang. 2013. Expression and activation of STAT3 in the astrocytes of optic nerve in a rat model of transient intraocular hypertension. *PLoS One* 8:e55683.
- Zhao, J., T. O'Connor, and R. Vassar. 2011. The contribution of activated astrocytes to Abeta production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation* 8:150.
- Zhao, Q.F., J.T. Yu, and L. Tan. 2015. S-Nitrosylation in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 51:268-280.
- Zheng, J.Y., J. Sun, C.M. Ji, L. Shen, Z.J. Chen, P. Xie, Y.Z. Sun, and R.T. Yu. 2017. Selective deletion of apolipoprotein E in astrocytes ameliorates the spatial learning and memory deficits in Alzheimer's disease (APP/PS1) mice by inhibiting TGF-beta/Smad2/STAT3 signaling. *Neurobiol Aging* 54:112-132.
- Zhong, Z., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264:95-98.
- Zhou, M., Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, and R.P. Haugland. 1997. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* 253:162-168.
- Zorzato, F., E. Scutari, V. Tegazzin, E. Clementi, and S. Treves. 1993. Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release. *Mol Pharmacol* 44:1192-1201.