

FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



**Deterioro en el aprendizaje y memoria espacial dependiente de  
hipocampo como consecuencia de la disminución de la  
expresión del canal de calcio receptor de ryanodina tipo 2  
(RyR2) en el hipocampo**

JAMILETH Y. MORE DE LA CRUZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN  
CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

MENCIÓN NEUROCIENCIA

.....  
Directora: Dra. M. Cecilia Hidalgo

.....  
Co-Directora: Dra. Andrea Paula-Lima

.....  
Co-Director: Dr. José Luis Valdés

2015

## 1. INDICE

<b>2. RESUMEN</b>	<b>IV</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Hipocampo: Aprendizaje y Memoria</b>	<b>5</b>
<b>3.2. Procesos celulares que subyacen al aprendizaje y memoria:</b>	
<b>Transmisión sináptica y LTP.</b>	<b>8</b>
<b>3.3. Señalización mediada por calcio y su rol en neuronas.</b>	<b>10</b>
<b>3.4. Canal Receptor de Ryanodina (RyR): participación en la actividad neuronal.</b>	<b>13</b>
<b>3.5. Receptor de ryanodina y desregulación en enfermedad de Alzheimer.</b>	<b>16</b>
<b>4. HIPOTESIS</b>	<b>20</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>20</b>
<b>5.1. Objetivos Específicos</b>	<b>20</b>
<b>6. METODOLOGÍA UTILIZADA PARA DESARROLLAR LOS OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>Modelo experimental in vivo de la enfermedad de Alzheimer: inyecciones bilaterales de oligómeros del péptido <math>\beta</math>-amiloide (A<math>\beta</math>Os) en el hipocampo, variables conductuales determinantes del aprendizaje dependiente de hipocampo y contenido proteico de RyR2 y RyR3.</b>	<b>32</b>
<b>Modelo <i>knock-down</i> de RyR2 (inyección de anti-RyR2): inyecciones bilaterales e intra-hipocampales de oligonucleótidos anti-sentido para suprimir la expresión de RyR2 en ratas macho adultas, variables</b>	

conductuales determinantes de la memoria dependiente de hipocampo y contenido proteico de RyR2 y RyR3. _____	41
8. <i>DISCUSIÓN</i> _____	50
9. <i>CONCLUSIONES</i> _____	57
10. <i>BIBLIOGRAFÍA</i> _____	58

## 2. RESUMEN

Procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria, dependen en gran medida del hipocampo, donde subyacen procesos de plasticidad sináptica estructural y/o funcional, asociados al procesamiento de la información y almacenaje en memorias de largo plazo. Durante estos procesos ocurre una fina regulación de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , que inician con su entrada a través de los receptores de NMDA (NMDAr) y la consecutiva liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplasmico (ER), mediante el mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR), mediado por el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  receptor de ryanodina (RyR), que incrementa las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático tras ser activado por  $\text{Ca}^{2+}$ . El canal RyR tiene un importante rol en los procesos de memoria, destacándose principalmente la isoforma tipo 2 (RyR2) como la más importante, adicionalmente la disminución de su expresión se ha vinculado con el deterioro cognitivo que subyace durante la enfermedad de Alzheimer (EA) o en presencia de oligómeros del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\text{A}\beta\text{Os}$ ) en neuronas de cultivos primarios. Nuestra hipótesis plantea que la disminución de la expresión del canal receptor de ryanodina tipo 2 (RyR2), por oligómeros del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\text{A}\beta\text{Os}$ ) o por oligonucleótidos anti-sentido para RyR2, deteriora el aprendizaje y la memoria espacial dependiente de hipocampo. Para poner a prueba esta hipótesis, realizamos inyecciones intra-hipocampales bilaterales de  $\text{A}\beta\text{Os}$  o de oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2 y evaluamos el aprendizaje y la memoria espaciales dependientes de hipocampo, utilizando dos configuraciones de la tarea *Oasis maze*. Los resultados obtenidos señalan que las ratas inyectadas con  $\text{A}\beta\text{Os}$  o con los oligonucleótidos anti-RyR2 exhiben una disminución del contenido de la proteína RyR2, sin alteración del contenido proteico de RyR3. Esta disminución se reflejó con un deterioro paralelo en el rendimiento de los animales en las tareas de aprendizaje y memoria. Estos resultados sugieren que la participación de RyR2 es crucial para los procesos de memoria espacial, y sugieren que una señalización deficiente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RyR2 contribuye al déficit en el aprendizaje y la memoria inducido por  $\text{A}\beta\text{Os}$ .

### **3. INTRODUCCIÓN**

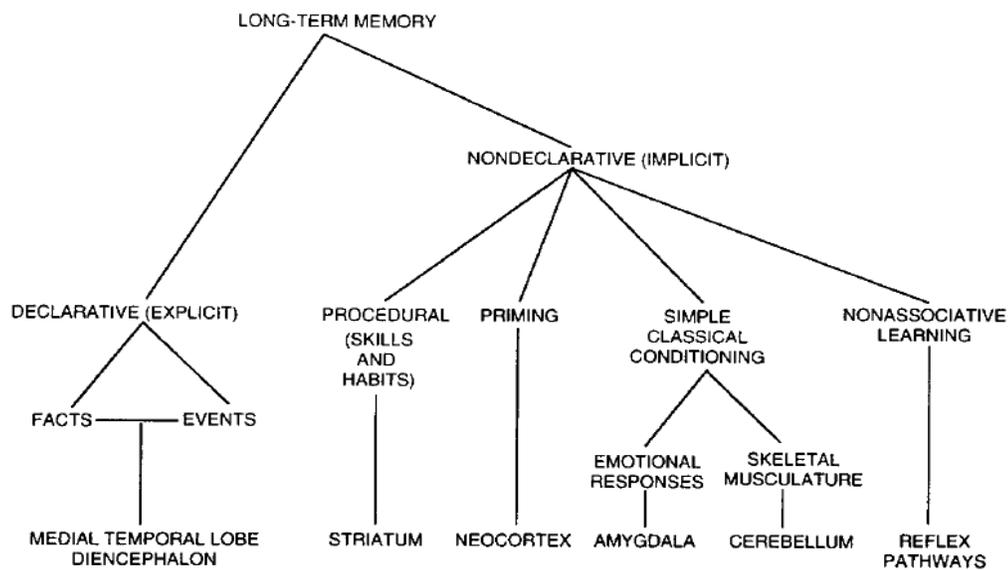
#### **3.1 Hipocampo: Aprendizaje y Memoria**

El cerebro es el órgano responsable del procesamiento de la información, compuesto de una gran cantidad y variedad de interacciones entre células nerviosas. Las funciones cognitivas del cerebro son diversas, e incluyen la percepción, control ejecutivo, motivación, atención, aprendizaje y memoria, entre otras (Kandel, E. y Schwartz, J.H. 1982, Huang Y y Kandel, E, 1996).

El aprendizaje es el proceso mediante el cual nuestro sistema nervioso adquiere nueva información lo cual se hace evidente por un cambio en el comportamiento del individuo, mientras que la memoria es el proceso por el cual el conocimiento es codificado, almacenado y posteriormente recuperado. (Knowlton, B. y Squire, L. 1993). Específicamente, la memoria puede ser clasificada, según el tiempo de almacenamiento (memoria a corto y largo plazo) y de acuerdo a la naturaleza de la información almacenada (Izquierdo, I y Medina, J.H., 1997, Milner, B. y Squire, L. 1998). La memoria a corto plazo mantiene información transitoria relevante para objetivos inmediatos y posteriormente es transferida selectivamente a una forma de memoria de largo plazo. Por otro lado, la memoria a largo plazo implica la retención de información en una forma más permanente de almacenamiento, por días, semanas o incluso toda la vida. Esta forma de almacenamiento depende de cambios en la maquinaria neuronal que modifican la eficacia de la transmisión sináptica y/o el crecimiento y reordenamiento de las conexiones neuronales (Kandel, E. y Schwartz, J.H. 1982, Squire L., y Zola S. 1996, Huang Y y Kandel, E, 1996).

Adicionalmente, la memoria a largo plazo puede ser clasificada como explícita o implícita. La memoria implícita (no declarativa) almacena formas de conocimiento que normalmente se adquieren sin esfuerzo consciente y que guían el comportamiento inconsciente, este tipo de memoria puede ser asociativo o no asociativo (Milner, B. y Squire, L. 1998., Squire L., y Zola S. 1996). La memoria implícita hace referencia a los recuerdos que se adquieren

gradualmente a través de múltiples ensayos (hay excepciones como el “*priming*” o aversión condicionada a sabores, que pueden ocurrir después de un único ensayo), y tiende a ser inflexible (Knowlton, B. y Squire, L. 1993). La memoria explícita (declarativa) tiene formas episódicas y semántica y su procesamiento implica al menos cuatro operaciones distintas: codificación, almacenamiento, consolidación y recuperación, además de depender de la interacción entre el lóbulo temporal medial y cortezas de asociación (Miller, E y Cohen, J. 2001).



**Figura 1.** Taxonomía de los sistemas de memoria a largo plazo, con estructuras específicas del cerebro involucradas en cada sistema. (Squire L., y Zola S. 1996).

Antecedentes previos como las observaciones clínicas realizadas a los pacientes H.M., N.A. y R.B., han revelado importantes datos sobre los sistemas cerebrales responsables del almacenamiento a corto plazo y la consolidación de la información declarativa. Estos casos aportan evidencia sobre la importancia de estructuras como la línea media diencefálica, el lóbulo temporal medial y particularmente el hipocampo, que es relevante en el establecimiento de nuevas memorias declarativas. (Scoville, W y col. 1957, Corkin, S. y col. 1997).

Uno de los casos más famosos es el del paciente H.M., diagnosticado con una pérdida de la función de memoria declarativa a corto plazo luego de una

extirpación quirúrgica bilateral del lóbulo temporal medial (Scoville, W y col. 1957). Otro interesante caso fue el del paciente N.A., apuñalado a través de la fosa nasal derecha perforando la lámina cribosa y la zona anterior del hemisferio izquierdo del cerebro, lo que condujo a una amnesia anterograda severa para la memoria declarativa (Squire L. y col. 1989, Remple-Clower, N. y col. 1996). Como ejemplo, este paciente no veía televisión ya que olvidaba el contenido de los programas durante los comerciales. Además presentó una incapacidad verbal más que espacial, a pesar de mantener una buena memoria de los contenidos previos al accidente. Finalmente un caso de gran relevancia que apoya la importancia del hipocampo en la memoria, es el del paciente R.B., quien tras un accidente isquémico de cirugía de bypass cardiaco, presentó lesiones bilaterales del hipocampo, con pérdida específica de células en la región de CA1 del hipocampo, con extensión por toda la longitud rostral caudal del hipocampo, generando una incapacidad para establecer nuevos recuerdos declarativos (aprendizaje semántico) (Zola M., y col. 1986, Remple-Clower, N. y col. 1996). En conjunto estas observaciones clínicas sugieren que las lesiones hipocampales son suficientes para generar amnesia anterograda de la memoria declarativa. (Remple-Clower, N. y col. 1996).

Adicionalmente, el papel del hipocampo como una estructura fundamental para el aprendizaje y memoria se ha evaluado en modelos animales (Kubie, J. y col. 1999). En ratas adultas, se ha observado que las lesiones en el hipocampo dorsal alteran el rendimiento de los individuos, de igual forma que lesiones completas del hipocampo (Morris, R. y col. 1982, Kubie, J. y col. 1999, Bannerman, D.M. y col. 2004), y como éstas alteran la memoria espacial remota, evaluadas en tareas conductuales como el *Morris water maze*, *Oasis maze* y *anular water maze*, en intervalos de tiempo de 1 a 14 semanas post-lesión. Esta alteración de la memoria espacial remota refleja una disrupción de la información espacial adquirida previamente. (Clark, R. y col. 2005).

Estos antecedentes han llevado a proponer que el hipocampo juega un importante rol en algunas formas de memoria, en las cuales podría establecer

una interacción prolongada entre el hipocampo y la neocorteza, en la cual ocurre una reconfiguración gradual de la información almacenada. Una hipótesis formulada de la consolidación es que en un periodo prolongado después de la experiencia inicial, de alguna manera se “orquesta” la actividad espontánea hipocámpal, la coordinada recuperación de los diversos componentes de una experiencia dada, que supuestamente se han almacenado como patrones escasamente distribuidos a través de modelos neocorticales interconectados (Morris, R. y col. 1982, Miller, E y Cohen, J. 2001, Bruno, A.M, 2012, Schimanski, L. y col. 2013).

La formación hipocámpal puede almacenar conjunciones que vinculan la memoria distribuida en sitios de almacenamiento próximos hasta que se forman conexiones corticales más permanentes. Este sistema puede servir para unir aspectos dispares de una memoria y destilarlos en un trazo de memoria coherente que puede ser mediada subsecuentemente por muchas rutas (Morris, R. y col. 1982, Knowlton B. y Squire. 1993, Squire L., y Zola S. 1996, Knowlton, B. Fanselow, M. 1998).

Cabe destacar que la amnesia retrograda, definida como la pérdida de memoria para eventos que preceden a una lesión o enfermedad, es más típica de las lesiones generalizadas asociadas con traumatismo encefalocraneanos y trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer (La Ferla, F y col. 2007).

### **3.2. Procesos celulares que subyacen al aprendizaje y memoria: Transmisión sináptica y LTP.**

El estudio de los procesos de aprendizaje y memoria, no solo se ha evaluado desde una perspectiva conductual, sino también a nivel celular. Las primeras sinapsis en ser identificadas en el cerebro de mamíferos, fueron las conexiones excitatorias de la vía perforante en células granulares del hipocampo, una estructura cortical requerida para la formación de la memoria

consciente en el humano. (Bliss, T y Collingridge, G. 1993, Burns, G y Youg, M. 2000., Citri, A y Malenka, R. 2008).

En la vías excitatorias mono-sinápticas del hipocampo, se ha observado que estimulando con breves trenes de alta frecuencia, se genera un abrupto y sostenido incremento en la eficiencia de la transmisión sináptica, proceso descrito como *Long-term potentiation* (LTP) (Bliss, T y Collingridge, G. 1993, Citri, A y Malenka R. 2008). La LTP se ha observado en vías excitatorias del hipocampo y otras regiones del cerebro y existen numerosas pruebas de que este proceso subyace al menos a ciertas formas de memoria, por lo cual los cambios celulares y moleculares que median este proceso son ampliamente considerados como bases celulares de la memoria (Caroni, P. y col. 2012, Sayer, R. y col. 1990).

Una de las vías excitatorias del hipocampo más estudiadas y en la cual la estimulación tetánica induce LTP, corresponde al circuito CA3-CA1 o vía colateral de Schaffer, que comprende la sinapsis entre los terminales pre-sinápticos de las neuronas piramidales en CA3 y las neuronas piramidales post-sinápticas de CA1 (Emptage N y col. 1990, Huang, Y. y Kandel, E. 1996, Kandel E. y col. 1999).

La LTP observada en la región CA1 del hipocampo requiere de dos tipos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, que contribuyen a la respuesta post-sináptica en las sinapsis glutamatérgicas: receptores de  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid* (AMPAr) y de N-methyl-D-aspartate (NMDAr). (Sayer, R. y col. 1990, Huang, Y. y col. 1996, Citri A. y Malenka, R 2008).

El AMPAr es un canal permeable a cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) y su activación en respuesta a la liberación del neurotransmisor glutamato producida por la estimulación sináptica, proporciona la mayor parte de la corriente de entrada que genera la respuesta sináptica excitatoria, que conlleva a una despolarización sináptica moderada (Muller, D y Lynch G, 1988, Emptage N y col. 1990). En contraste a los AMPAr, los NMDAr presentan una fuerte

dependencia de voltaje, debido al bloqueo de su canal a potenciales de membrana negativos por  $Mg^{2+}$  extracelular, generando una pequeña contribución de los NMDAr a la respuesta post-sináptica durante la actividad sináptica basal. Sin embargo, cuando la célula es despolarizada por activación de AMPAr, el  $Mg^{2+}$  se disocia desde su sitio de unión con el canal NMDAr, lo que permite una entrada de iones  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  a la célula, y esto ha sido particularmente observado en espinas dendríticas post-sinápticas (Sayer, R. y col. 1990, Emptage N y col. 1990, Clark KA y Collingridge GL. 1995).

La generación de LTP en la región de CA1 que ocurre en respuesta a una fuerte despolarización post-sináptica, requiere activación de NMDAr, lo que conduce a un incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  post-sináptico, que debe llegar a cierto valor crítico para activar los procesos bioquímicos necesarios para generar la LTP (Emptage N y col. 1990, Bliss y Collingridge 1993).

### **3.3. Señalización mediada por calcio y su rol en neuronas.**

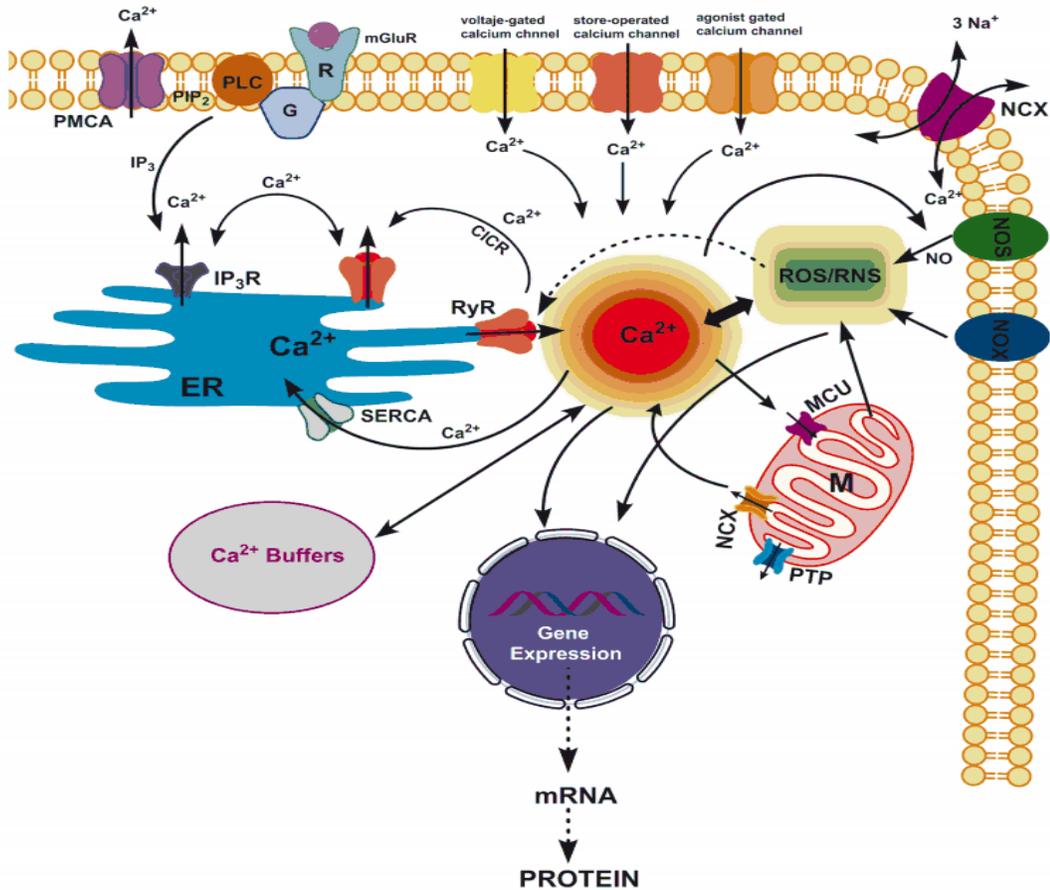
Es interesante comprender el proceso de entrada de  $Ca^{2+}$  que se produce luego de la activación de los NMDAr (Caroni P, y col. 2012, Bliss y Collingridge 1993) y como la disminución de estas concentraciones de  $Ca^{2+}$ , mediante el uso de quelantes, pueden prevenir la inducción de la LTP (Citri A. y Malenka, R 2008). También se ha propuesto que las alteraciones en la regulación de  $Ca^{2+}$  pueden jugar un importante rol en el envejecimiento del cerebro y la enfermedad de Alzheimer (Stutzmann et al., 2006, Paula-Lima, A y col. 2014).

Debido a su importante rol, la señalización por  $Ca^{2+}$  es altamente regulada (Berridge, M. 1998, Zhao et al., 2000). La regulación de los niveles de  $Ca^{2+}$  neuronal dependen del funcionamiento de numerosos canales y transportadores de  $Ca^{2+}$  presentes en diferentes regiones de la célula y que realizan distintas funciones. En terminales pre-sinápticos la actividad de canales de calcio dependientes de voltaje o "*voltage operated-channels*" (VOC) tipo N y P/Q, disparan la liberación de neurotransmisores (Berridge, M. 1998, Berridge

M. y col. 2000). Estos canales funcionan como “filtros cinéticos” lo que les permite responder eficientemente a pequeñas despolarizaciones.

La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en espinas, que es responsable de mediar las modificaciones sinápticas tempranas implicadas en el aprendizaje y la memoria, son proporcionadas por la entrada a través de VOCs y a través de “canales operados por receptores o *receptor-operated channels*” (ROCs), como el NMDAr (Berridge, 1998; Berridge et al., 2000) y por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el “retículo endoplasmático” (ER) a través del canal receptor de IP3 (inositol-1,4,5-trisphosphate receptor) y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  receptor de Ryanodina (RyR) (Verkhatsky, A. 2005. Zalk. R. 2007).

En neuronas hipocampales, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de VOCs, y en particular del NMDAr, activa a los canales RyR, cuyo principal agonista es el propio  $\text{Ca}^{2+}$  y se produce así una liberación sinérgica de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el ER (Berridge M. 2000; Hidalgo, C. 2004., Zalk, R 2007), en un proceso de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR), que establece interacciones entre estas vías, amplificando y propagando la señal inicial de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que activa factores de transcripción regulados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Hidalgo, C. 2005).



**Figura 2.** Esquema de entidades moleculares responsables de la generación de señales de  $Ca^{2+}$  en neuronas. La entrada de  $Ca^{2+}$  se inicia luego del cambio al estado abierto de los canales de membrana dependientes de voltaje o de canales de  $Ca^{2+}$  activados por agonistas como los NMDAr, e incluso puede participar el intercambiador  $Na^{+}/Ca^{2+}$  (NCX). Esta entrada de calcio activa la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplasmático (ER) a través del receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3R$ ) y/o del canal de  $Ca^{2+}$  receptor de ryanodina ( $RyR$ ), via *calcium induced calcium release* (CICR). Dependiendo de la intensidad y de la localización de la señal, el calcio es transportado a la mitocondria por el uniporter mitocondrial (MCU), hacia el medio extracelular o el ER por bombas de  $Ca^{2+}$  dependiente de ATP, presentes en la membrana plasmática (PMCA) y el ER (SERCA), o por el NCX hacia el exterior.

Reservorios de  $Ca^{2+}$  como el ER, tienen un importante rol en muchos aspectos de la función neuronal, ya que mantienen un importante gradiente de  $[Ca^{2+}]$  entre el lumen y el citoplasma de las células en reposo (Verkhatsky A. 2005).

La activación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el ER a través de los canales IP3R/RyR genera un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citoplasmático que participa en varios procesos de señalización (Hidalgo, C. 2004). Sin embargo, el rol que desempeña la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el ER en los procesos de plasticidad sináptica neuronal, aprendizaje y memoria han sido estudiados con menor atención (Verkhatsky, A. Paula-Lima y col. 2014).

#### **3.4. Canal Receptor de Ryanodina (RyR): participación en la actividad neuronal.**

En el hipocampo de mamíferos se expresan tres isoformas del canal RyR, la isoforma 1 (RyR1), la isoforma 2 (RyR2) y la isoforma 3 (RyR3), codificadas por diferentes genes. La importancia de las diferentes isoformas se evidencia en estudios realizados en ratones *knock-out* (KO), demostrando que animales KO para RyR1 y RyR2 son letales. Se requiere RyR1 para la contracción de los músculos del sistema respiratorio, que es esencial para la respiración después del nacimiento. En el caso de RyR2, su ausencia no permite la formación del corazón durante el desarrollo embrionario (Paula-Lima y col. 2014, Del, Prete, D. y col. 2014). Sin embargo, los ratones KO para RyR3 son viables (Matsuo, N. y col. 2009).

En neuronas hipocampales se ha observado que opera un mecanismo acoplado entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L  $\text{Ca(v)1.3}$  y RyR2 (Kim S, Yun HM, Baik JH, Chung KC, Nah SY, and Rhim H., 2007, Bengston, C. y col. 2010), de manera similar al proceso que ocurre en músculo esquelético donde la activación de RyR1 se produce vía un acoplamiento conformacional dependiente de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje  $\text{Ca(v)1.1}$  (Paula-Lima y col. 2014). Respecto al acoplamiento observado en neuronas, aun es poco conocida su contribución en los procesos de plasticidad sináptica. Las tres isoformas del canal RyR se encuentran presentes en neuronas piramidales de CA1, incluyendo espinas y ejes dendríticos.

Otra vía de liberación de  $Ca^{2+}$  desde el ER es a través del receptor de IP3, sin embargo se ha sugerido que la ausencia del receptor de IP3 tipo 1, el más abundante de las 3 isoformas en hipocampo, solo afecta a nivel de deontenciación posterior a un estímulo de baja frecuencia y no durante el proceso de LTP o luego de un estímulo tetánico (Fujii S. y col 2000). Adicionalmente el IP3 tipo 2, la segunda isoforma más abundante en neuronas piramidales de CA1, no afecta la actividad sináptica excitatoria basal, como fue determinado en registros espontáneos de corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC). (Petraovic J., y col. 2008). Adicionalmente, en las regiones CA3 y giro dentado del hipocampo, los niveles de IP3R son mucho menores que los del canal RyR (Sharp AH, McPherson PS, Dawson TM, Aoki C, Campbell KP, and Snyder SH. 1993).

Otras investigaciones más recientes han destacado no solo la distribución de las isoformas de RyR, también su comparación con el IP3R, que participa en la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el ER. (Hertle, D y Yeckel, M. 2007). En resumen las observaciones respecto a la distribución de IP3R y RyR en hipocampo, evidencia una alta distribución de las isoformas de RyR a nivel hipocampal respecto a la distribución de IP3R (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resumen de detección por inmuno-histoquímica, para IP3R y RyR (Hertle D y Yeckel M. 2007)

	CA1	CA3	Dentate Gyrus	
InsP <sub>3</sub> R1	+++	++	+	+ detected
InsP <sub>3</sub> R2	+	+	+	++ strong labeling
InsP <sub>3</sub> R3	+			+++ very strong labeling
RyR1	+++	++	+	
RyR2	+	++	+++	
RyR3	+	+	+	

Como se mencionó anteriormente, la amplia distribución que presenta el canal RyR, siendo uno de los dos canales de calcio intracelular de mayor abundancia, y debido a su participación en el mecanismo de CICR, lo hace un

interesante blanco de estudio en neuronas. De hecho su participación en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido descrita como determinante para las funciones del cerebro tales como el aprendizaje y la memoria (Zhao y col, 2000, Hidalgo, C. 2005. Paula-Lima y col. 2014). Adicionalmente, la presencia de canales RyR en espinas concuerda con los hallazgos que muestran que la estimulación sináptica de neuronas de la región de CA1 del hipocampo, genera una importante liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RyR desde el ER en las espinas post-sinápticas (Paula-Lima 2014).

Mediante hibridación *in situ*, Mori F. y col. (2000) demostraron cambios dinámicos en la distribución de las tres isoformas de RyR en el periodo post-natal temprano, cuando las neuronas están experimentando la diferenciación estructural y funcional. Se observó que durante la etapa embrionaria los niveles de RNAm de RyR1 fueron más altos en la placa cortical rostral, en tanto los de RNAm de RyR3 fueron mayores en la placa cortical caudal e hipocampo. Bajos niveles de mRNA de RyR2 se encontraron en el diencéfalo y el tronco cerebral. Sin embargo, desde el día postnatal 7 en adelante, el RNAm de RyR2 se convirtió en la principal isoforma en muchas regiones del cerebro, y sus niveles se encontraron considerablemente altos en el giro dentado y en la capa de células de Purkinje. La *down-regulation* post-natal en la corteza cerebral caudal restringe la expresión de RNAm de RyR3 en el hipocampo, particularmente la región CA1.

A pesar de que inicialmente la atención se concentró en RyR3 debido a su presencia en el cerebro, RyR2 es la isoforma que más se ha destacado en los mecanismos moleculares de plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria. Trabajos como el de Zhao W. y col. (2000) han reportado que 12 h y 24 h después del entrenamiento de ratas en la tarea *Morris water maze* producen un aumento en los niveles de RNAm y proteína de RyR2, en fracciones microsomales de hipocampo. En consecuencia las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por RyR2 pueden estar involucradas en el procesamiento de la memoria luego del aprendizaje espacial. Considerando las temporalidades en las cuales se

observaron los cambios, es posible razonar que los incrementos de RyR2 contribuyen a cambios más permanentes como modificaciones estructurales durante el almacenamiento de la memoria a largo plazo.

La disminución de la expresión de las diferentes isoformas de RyR, mediante el uso de oligonucleótidos anti-sentido, ha demostrado que los niveles de RyR2 y RyR3 alteran los procesos de memoria, evaluada en una tarea de evitación pasiva (Galeotti N. y col 2008). Otros datos conductuales, como los reportados por Matsuo y col. (2009) señalan que animales *knock-out* para RyR3, exhiben hiperactividad, disminución de la interacción social, leve daño en la inhibición de pre-pulso e inhibición latente, sin anomalías significativas en las funciones motoras y de trabajo, indicando que RyR3 tiene un importante rol en la actividad locomotora y el comportamiento social.

Adicionalmente, se ha observado como la administración mediante inyecciones intra-cerebro ventricular de agonistas del canal RyR, como el 4-cloro metil cresol (4-Cmc) o concentraciones estimuladoras de Ryanodina, mejoran las funciones de memoria (Galeotti y col. 2008, Adasme y col. 2011).

Estos datos en conjunto, señalan a los canales RyR como elementos importantes para las funciones cognitivas, que van desde actividad locomotora, comportamiento social, aprendizaje y memoria. Sin embargo, poco se conoce aún respecto a la participación específica de la isoforma tipo 2 de los canales RyR, en los procesos de aprendizaje y memoria de tipo espacial.

### **3.5. Receptor de ryanodina y desregulación en enfermedad de Alzheimer.**

Hace más de 20 años que se propuso que la perturbación de la homeostasis de  $Ca^{2+}$  juega un rol clave en la EA (Del Prete, D. y col. 2014). La desregulación de  $Ca^{2+}$  dentro de los terminales pre-sinápticos y las espinas dendríticas, es el tipo de disfunción sináptica que mejor se correlaciona con la devastadora pérdida de la memoria en la EA (Chakroborty, S y col. 2012). Esta relación tiene sentido, considerando que las sinapsis son los sitios donde los

fenómenos de plasticidad dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen lugar y que son claves para los procesos de aprendizaje y memoria (Bliss T y Collingridge G. 1993., Whitlock J. y col. 2006)

Adicionalmente, diversas investigaciones destacan el rol clave de la desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  asociada al ER en el entorno y desarrollo de la EA (Chami, M y Checler, F 2014), y del aumento de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desde el ER (Popugaeva E y Bezprozvanny I, 2013).

El péptido  $\beta$ -amiloide ( $\text{A}\beta$ ), principal componente de las placas seniles en la EA, incrementa la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el ER a través de los IP3R y RyR (Ferreiro, E. y col. 2004). Por otro lado, la producción de  $\text{A}\beta$  es aumentada por el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  relacionado al incremento de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RyR (Querfurth, H y col. 1997).

Un trabajo anterior Oulès, B. y col. (2012) señala que la sobre-expresión de la proteína precursora de amiloide (*APP, amyloid precursor protein*) humana en su forma nativa genera un aumento en la expresión de RyR y en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RyR. En concordancia, el tratamiento con dantroleno que inhibe la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RyR, reduce la producción de  $\text{A}\beta$  *in vitro* en células de neuroblastoma SH-SY5Y y cultivos primarios de neuronas de ratón transgénico (Tg2576) que expresa una forma mutante de APP, la “isoforma 695”, con la mutación sueca. La disminución de  $\text{A}\beta$  por dantroleno, reduce las lesiones histológicas y desacelera el déficit en el aprendizaje y la memoria, evaluado en la tarea *Morris water maze* en ratones Tg2576.

Otras investigaciones reportan disminución de proteína de RyR2 en tejido post-mortem de pacientes en las etapas finales de la EA (V-VI) (Kelliher, M y col. 1999). Sin embargo, Bruno, A. y col. (2012) han reportado un aumento en los niveles de mRNA de RyR2 en tejido post-mortem de individuos con deterioro cognitivo leve (MCI) -*mild cognitive impairment*, condición de deterioro cognitivo presente frecuentemente previo al desarrollo de la EA, comparado con tejido de individuos sin deterioro cognitivo. Estas alteraciones en la expresión de RyR2 en

la etapa temprana de la EA podrían reflejar el inicio de mecanismos patológicos que conducen a una posterior neurodegeneración.

Experimentos *in vitro* de nuestro laboratorio utilizando cultivos de neuronas hipocampales, a los cuáles se adicionaron A $\beta$ O en concentraciones sub-letales, demostraron que la incubación durante 6 h con A $\beta$ O genera señales aberrantes de Ca<sup>2+</sup> mediadas por RyR y disminuye los niveles de mRNA y de la proteína RyR2 (Paula-Lima y col. 2011). Adicionalmente, se ha vinculado de forma importante la participación de la isoforma RyR3 a la enfermedad de Alzheimer. Supnet, C. y col. (2010), investigaron el efecto de la sobre-expresión de RyR3 y consecuente incremento en la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el ER, encontrando que ésta no altera la susceptibilidad a la muerte celular, el estrés celular o la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>, comparado con neuronas no transgénicas. Al contrario, la disminución de la expresión de RyR3 utilizando un RNA de interferencia específico (siRNA) en cultivos de neuronas corticales de ratones transgénicos (TgCRND8) que expresan un mutante de APP humano a niveles aproximados 5 veces mayor que el APP murino endógeno, aumenta la muerte neuronal.

Posteriormente, Liu, J. y col. (2014), observaron que en diversos tipos de ratones transgénicos jóvenes ( $\leq$  6 meses), incluyendo APPPS1 (ratón transgénico para APP), con mutación sueca y PSEN1 con la mutación L166P, ambos bajo el control del promotor Thy1 (la expresión del transgen humano APP es 3 veces mayor que el APP endógeno), la supresión de RyR3 incrementa la excitabilidad de la red neuronal hipocampal y acelera la patología de la EA, llevando a la pérdida de espinas tipo *mushroom* e incrementando la acumulación de amiloide. De forma contraria, la supresión de RyR3 en ratones APPPS1 de mayor edad ( $\geq$  6 meses) recupera la excitabilidad, la pérdida de espinas tipo *mushroom* y reduce el tamaño de las placas amiloides, así como los eventos espontáneos convulsivos. Estos resultados sugieren contradicciones en el rol desempeñado por RyR3 en la EA en diferentes modelos transgénicos de distintas edades.

Asimismo, estos antecedentes en conjunto vinculan la participación de RyR en el desarrollo de la EA, sin embargo aún resulta controversial cual es la isoforma involucrada principalmente en esta patología. En este contexto, resulta de gran interés evaluar los posibles cambios a nivel de expresión que puedan presentarse en las diferentes isoformas de RyR, con especial atención en RyR2 y RyR3 en un modelo neurodegenerativo, como la EA, así como las modificaciones a nivel conductual en los individuos que la presenten, ya que esta patología se caracteriza por el deterioro de funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria dependientes de hipocampo.

#### 4. HIPOTESIS

La disminución de la expresión del canal receptor de ryanodina tipo 2 (RyR2), por oligómeros del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ Os) o por oligonucleótidos anti-sentido para RyR2, deteriora el aprendizaje y la memoria espacial dependiente de hipocampo.

#### 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar en modelos *in vivo* si la supresión de la expresión de RyR2 inducida por A $\beta$ Os o oligonucleótidos anti-sentido para RyR2, altera los procesos de aprendizaje y memoria espacial dependientes de hipocampo.

##### 5.1. **Objetivos Específicos**

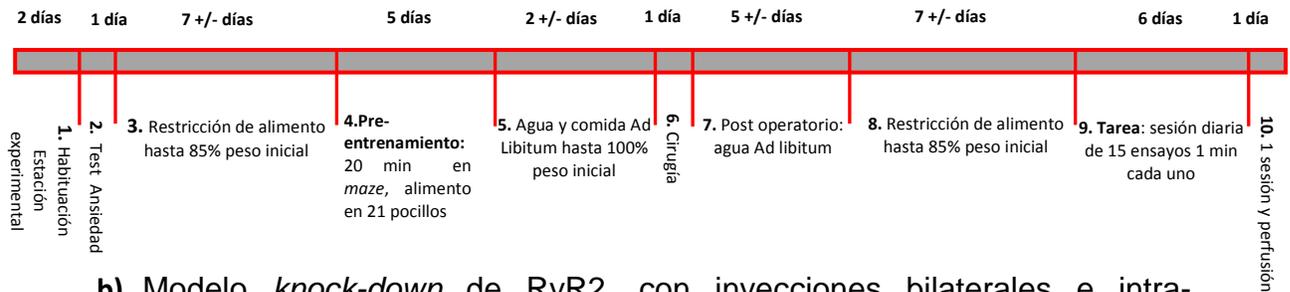
- 1) Establecer un modelo experimental *in vivo* no transgénico de la enfermedad de Alzheimer, mediante inyección bilateral en el hipocampo con oligómeros solubles del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ Os). **Objetivo cumplido**
- 2) Evaluar variables conductuales determinantes del aprendizaje dependiente de hipocampo, utilizando la tarea del *Oasis maze*, en ratas inyectadas bilateralmente en el hipocampo con oligómeros del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ Os). **Objetivo cumplido**
- 3) Establecer un modelo *knock-down* para RyR2, mediante inyecciones bilaterales e intra-hipocampales de oligonucleótidos anti-sentido para suprimir la expresión de RyR2 en el hipocampo de ratas macho adultas. **Objetivo cumplido**
- 4) Evaluar variables conductuales determinantes de la memoria y el aprendizaje dependiente de hipocampo, utilizando la tarea de *Oasis maze* en los animales *knock-down* para RyR2. **Objetivo cumplido**

**5)** Determinar, mediante inmunofluorescencia, la expresión de las proteínas RyR2 y RyR3, en el hipocampo de las ratas usadas en los modelos experimentales establecidos en los objetivos 1 y 3. **Objetivo cumplido**

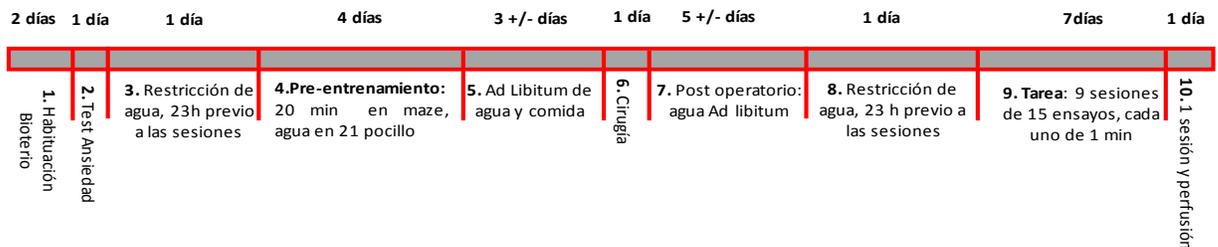
## 6. METODOLOGÍA UTILIZADA PARA DESARROLLAR LOS OBJETIVOS

### Planificación de trabajo: Líneas de tiempo

a) Modelo experimental *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer con inyecciones bilateral e intra-hipocampal de A $\beta$ O.



b) Modelo *knock-down* de RyR2, con inyecciones bilaterales e intra-hipocampales de oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2.



1. Habitación a la estación experimental: Tiempo de adaptación del animal a la estación de experimentación y manipulación del operador, que busca reducir el nivel de estrés que pueda alterar el desempeño de los animales.

2. Test de ansiedad: Consiste en la exposición del animal a una arena circular de 1.40m de diámetro durante 5 min. El desempeño o recorrido que realice el animal se graba y posteriormente se analiza utilizando una rutina de Matlab y se evalúa el tiempo de permanencia en el centro de la arena respecto a la periferia (tigmotactismo).

3. Restricción de agua o alimento: Con el fin de aumentar la motivación por la búsqueda de comida/agua durante las tareas, las ratas se restringen de alimento o agua por un período previo al experimento.

- **Modelo experimental *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer producido por inyecciones bilateral e intra-hipocampal de A $\beta$ O $_s$** : restricción de alimento hasta alcanzar un 85% de su peso inicial.

- **Modelo *knock-down* de RyR2, con inyecciones bilateral e intra-hipocampal de oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2**: restricción de agua durante 23 h previas a cada sesión de pre-entrenamiento y tarea. Se entrenaron las ratas a buscar una recompensa de agua en distintos escenarios.

4. Pre-entrenamiento: Ver sección “Conducta”,
5. *Ad libitum*: Consumo libre de comida y agua, para reponer peso al 100% en el caso de restricción de alimento o rehidratación libre previa a la cirugía.
6. Cirugía: Ver sección “Animales y cirugía”.
7. Post-operatorio: Después del procedimiento quirúrgico de implante crónico de cánulas de inyección en el hipocampo, los animales deben tener una semana de recuperación de peso y cicatrización, antes de volver a la restricción alimenticia o restricción de agua.
8. Restricción de alimento o agua: Se repite el procedimiento descrito en la punto 3 de esta sección.
9. Tarea: Ver sección “conducta”
10. Perfusión: cada animal fue perfundido transcardialmente y bajo anestesia con solución salina (NaCl 0.9%), seguido de paraformaldehído 4% en Buffer fosfato (0.1M), pH 7.4, para fijar y posteriormente remover el cerebro. Los cerebros removidos fueron post-fijados por 2h en paraformaldehído y luego crio-preservados en una solución de sacarosa al 30% en PBS (buffer fosfato salino) con azida de sodio al 0.03%, hasta que los cerebros se hundan completamente en la solución y luego se realizaron cortes coronales de 40  $\mu$ m en un micrótopo de congelación e inmunohistoquímica.

## Animales y cirugía

Se utilizaron ratas machos Sprague-Dawley, con un peso entre 250–280 g, obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales fueron mantenidos en ciclo luz/oscuridad 12/12 hrs (encendido de luces 07:00 AM) con agua y alimentación *ad libitum*, excepto cuando se indican otras condiciones. La temperatura ambiental controlada a 23°C en las habitaciones de mantención y de entrenamiento. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a la guía de cuidados y manejos de animales del NIH (*Committee on guidelines for the use of animals in neuroscience and behavioral research institute for laboratory animal research division on earth and lifes studies. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. The National Academies Press, Washington, D.C.2003*) y bajo la aprobación del comité de ética local CBH 0431 Facultad de Medicina, Univerdad de Chile, minimizando el número y sufrimiento de animales.

Todas las ratas evaluadas conductualmente se encontraban implantadas de forma bilateral con cánulas de inyección en las regiones:

- CA1: para inyecciones del oligonucleótido anti-RyR2 (experimental) y secuencia “*scrambled*” (control).
- CA3: para inyecciones de A $\beta$ Os (experimental), vehículo solución salina (control).

**Tabla 2.** Reactivos para inyección intra-hipocampal en región CA1 y CA3

Reactivo en solución	$\mu$ L
Secuencia anti-RyR2, oligonucleótidos con bases tipo DNA; 18 bases, 61,1% contenido de GC y 4 modificaciones de enlaces fosforotioato (*). 5`T*T*C GCCCGCA TC AGC C*A*T-3`	1
Secuencia scrambled, oligonucleótidos con bases tipo DNA, 18 bases, 72,2% contenido de GC y 4 modificaciones de enlaces fosforotioato (*). 5`C*G*G CAG GAG TCT GTG C*G*C-3`	1
A $\beta$ péptido (A $\beta$ 1-42) Bachem Inc. (Torrance, CA)	0,5
Solución salina inyectable intravenosa, NaCl 0,9%, pH 7,4. Laboratorio Sanderson S.A.	0,5

### **Conducta: Oasis maze**

Para determinar los efectos conductuales de las inyecciones de A $\beta$ O<sub>s</sub> sobre el aprendizaje y de las inyecciones anti-RyR2 sobre la memoria, se utilizó la tarea espacial dependiente de hipocampo *Oasis Maze*, que es una versión seca del Laberinto Acuático de *Morris*.

La tarea del *Oasis Maze* consiste de dos etapas, pre-entrenamiento y tarea; esta última adaptada a cada modelo experimental, según el aspecto cognitivo a evaluar con mayor relevancia, aprendizaje y/o memoria. El aparato consiste en una arena circular negra de 1,4 m de diámetro con 21 pocillos equidistantes y una clave visual proximal (Figura 3).

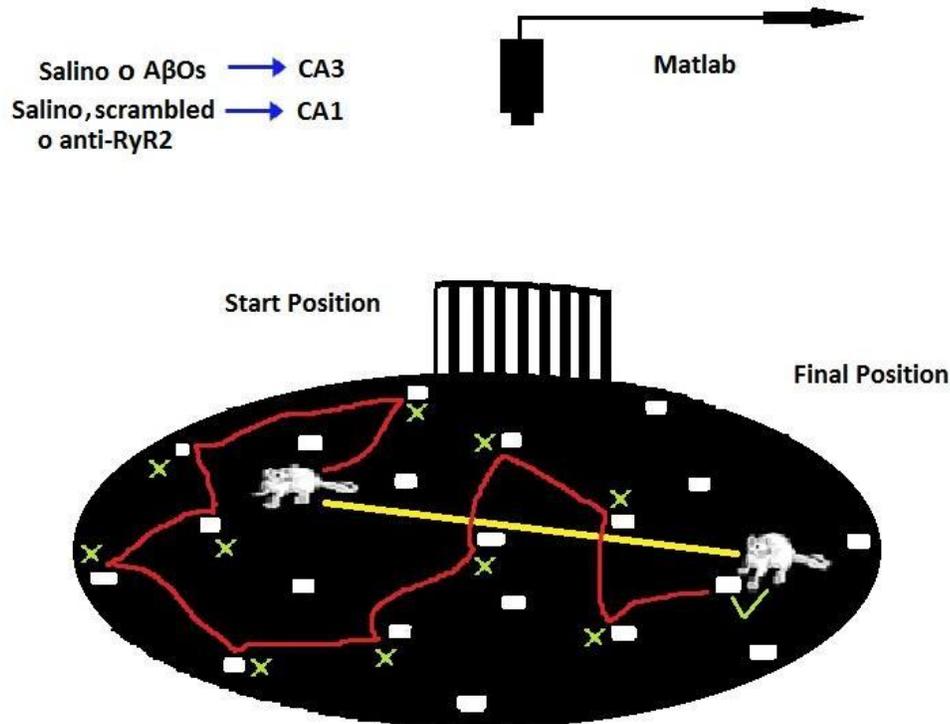
Pre-entrenamiento: En esta fase las ratas son expuestas durante 15 minutos al oasis *maze*, con la clave visual y los 21 pocillos, cada uno con recompensa, agua o comida, según sea el caso. La recompensa es 0.4 g aprox. de pellet regular ó 0,1 ml aprox. de agua. Estas sesiones se repiten diariamente durante al menos 4 días consecutivos y se verifica si hay consumo de la recompensa en todos los pocillos o el porcentaje de pocillos que permanecieron con la recompensa. Para los experimentos se consideraron aquellas ratas que presentaron en promedio entre el 95 y 100% (20 a 21 pocillos) de consumo de las recompensas.

Tarea: Sesión compuesta de 15 ensayos, cada uno con duración máxima de 1 min o hasta que el animal encuentre la recompensa. Durante cada ensayo solo 1 de los 21 pocillos ubicados en el *maze* contiene la recompensa. Los ensayos consisten en colocar a la rata dentro de un cilindro negro, ubicado en la arena en una posición aleatoria y distante al sitio de recompensa (Figura 3). El cilindro negro impide la visión de la clave visual y al ser retirado, la rata tiene acceso a su posición en la arena (posición inicial) y se le permite buscar la recompensa.

Cada ensayo termina cuando la rata encuentra el pocillo con recompensa (posición final) o al final del minuto transcurrido a partir del inicio del ensayo

(Figura 3). Para el siguiente ensayo la rata es nuevamente rodeada por el cilindro y ubicada en una posición inicial diferente (aleatoria) y se renueva la recompensa en el mismo pocillo para todos los ensayos de una sesión.

- a) **Modelo experimental *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer (inyecciones de A $\beta$ Os):** Para evaluar los cambios asociados al aprendizaje, en cada sesión se seleccionó aleatoriamente 1 de los 21 pocillos disponibles como punto de recompensa. El cambio en la posición de la recompensa es para asegurar que el animal requiera aprender nuevamente, evitando así el desarrollo de conductas procedurales o estereotipadas.
  
- b) **Modelo *knock-down* de RyR2 (inyección de anti-RyR2):** Para evaluar el efecto del anti-RyR2 sobre la memoria, se seleccionó como punto de recompensa a 1 de los 21 pocillos disponibles y este se mantuvo constante durante todas las sesiones evaluadas. La tarea conductual se inició una vez que los animales alcanzaron una tasa de éxito (*hit rate*) cercana a 1, asociada a la formación de memoria.



**Figura 3.** *Oasis maze*. La línea amarilla indica el mejor recorrido (recorrido esperado), en función de la posición inicial hasta la posición final. La línea roja indica el recorrido observado que realizan las ratas durante la tarea. Las cruces amarillas indican los pocillos sin recompensa que visitó el animal durante la tarea (cada uno representa un error). Todas las sesiones fueron grabadas y posteriormente analizadas mediante una rutina de Matlab.

**Variables cuantificadas:**

Tasa de éxito. Proporción de ensayos exitosos entre ensayos totales por sesión. Se considera un ensayo exitoso cuando la rata encuentra el pocillo con recompensa dentro de un periodo límite de 1 min. Esta variable permite comparar diferentes sesiones a lo largo del periodo de adquisición.

Número de errores. Corresponde al número de veces en que la rata visita un pocillo sin recompensa durante un ensayo (cruces amarillas en la Figura 3). Los números de errores se cuantifican visualmente. Esta variable permite comparar diferentes ensayos a lo largo de una sesión como parámetro de aprendizaje y

memoria de corto plazo y entre sesiones como parámetro de memoria de más largo plazo.

Recorrido observado / recorrido esperado. Mediante una rutina en el programa Matlab reconstruimos el recorrido de la rata asignando un valor a la posición del animal en un plano de coordenadas (x, y) en píxeles (pictograma por pictograma). El recorrido observado es el que sigue la rata a lo largo del ensayo (línea roja en Figura 1).

El recorrido esperado es una línea recta entre la posición inicial y el pocillo con recompensa (línea amarilla Figura 3). Los valores de la relación de recorridos observado/esperado cercanos a 1 indican que la rata se desplazó en línea casi recta desde la posición inicial hasta el pocillo con recompensa, consistiendo en un recorrido óptimo. También esta rutina de Matlab nos permite calcular la velocidad de desplazamiento del animal, y el tiempo en actividad y quietud en cada ensayo.

### **Inmunohistoquímica para detección de RyR2 y RyR3 y microscopia confocal**

- Los cortes previamente obtenidos se incuban en solución de bloqueo/permeabilización por 2 horas a temperatura ambiente (TA), (ver tabla 3).
- Inmediatamente se incuban con 200-300 µl del anticuerpo primario (diluido en solución de bloqueo/permeabilización) en pocillos de vidrio, por toda la noche a 4°C con agitación, (ver tabla 4 y 5).
- Al siguiente día, los cortes se lavan 3 veces x 5 minutos con PBS (Buffer fosfato salino, 1X, pH 7,4), seguido de un lavado x 5 minutos con solución de bloqueo/permeabilización.
- Luego, se incuban con 200-300 µl del anticuerpo secundario (diluido en sol. de bloqueo), por dos horas a TA, con agitación.

- Se lava 3 veces con PBS, por 10 minutos cada vez, a TA y con agitación.
- Se incuba con Hoechst 33258 (anticuerpo para detección de núcleo celular, 1:1000, Invitrogen) por 5 minutos a TA, con agitación.
- Se lava el Hoechst 33258, 3 x 5 minutos a TA, con agitación.
- Los cortes se montan sobre portaobjetos y se recubren con solución de montaje (Vectashield) para preservar la fluorescencia.
- Para inmunohistoquímica doble, se incuba la mezcla de los anticuerpos primarios manteniendo las diluciones correspondientes para cada uno. Los anticuerpos secundarios también se incuban juntos.
- Una vez finalizada la inmunohistoquímica se procede a la captura de imágenes por microscopia confocal. Se realiza Z-stack, capturando imágenes de 1,5  $\mu\text{m}$  de espesor con un total de 20 imágenes por corte evaluado.

**Tabla 3.** Solución de Bloqueo/Permeabilización

Suero de burro	3%
Triton X-100	0,25%
PBS (Buffer fosfato salino)	1X

**Tabla 4.** Anticuerpos Primarios

<b>Anticuerpos</b>	<b>Dilución</b>
MA3-916 Thermo Scientific Ryanodine (RyR2)	1:50
Rbx Ryanodine Receptor 3 Monoclonal Mouse Milipore AB9082	1:100
Beta-amyloid antibody (H31L21), Rabbit monoclonal. Life Technologies #700254	1:50

**Tabla 5.** Anti-cuerpos secundarios

<b>Anticuerpos</b>	<b>Dilución</b>
Alexa 488 goat anti-mouse (RyR2)	1:300
Alexa 488 chicken anti-rabbit (RyR3 y AβOs)	1:300
Hoesch 3342, Life Technologies	1:1000

Respecto a las otras isoformas del canal RyR, se decidió cuantificar solo RyR3 y no realizar por ahora la cuantificación de RyR1, considerando que no contamos con un anticuerpo comercial específico para esta isoforma de RyR, que permita su cuantificación proteica.

#### **Inmuno-histoquímica para detección c-Fos.**

- Para la detección de la proteína c-Fos, los cortes fueron lavados 2 veces por 10 min con PBS 0,01 M y seguidamente incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en PBS 0,01 M por 30 min.
- Se realizaron 2 lavados por 10 minutos cada uno, con PBS 0,01 M y posteriormente los cortes fueron transferidos a una solución de bloqueo (0,4% Triton X-100, 0,02% de azida de sodio y 3% de suero normal de cabra en PBS) por 1 hora.
- Posteriormente, los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario (Ab-5, policlonal de conejo, de Oncogene, San Diego, CA, USA) diluido 1:20000 en la solución de bloqueo durante toda una noche a temperatura ambiente.
- Se realizaron 6 lavados de 10 min cada uno y seguidamente incubados con el anticuerpo secundario [Biotin-SP-conjugated Affinipure goat antirabbit IgG (H+L) de Jackson InmunoResearch, PA, USA] diluido 1:1000 en PBS con 0,4% Triton X-100 y suero de cabra al 1,5%.
- Se repitieron 4 lavados de 10 min cada uno con PBS 0,01 M y posteriormente los cortes fueron incubados por 1 h con el complejo ABC del Kit Vectastain ABC Elite (Laboratorios Vector, CA, 33 USA) diluido 1:500 en PBS.

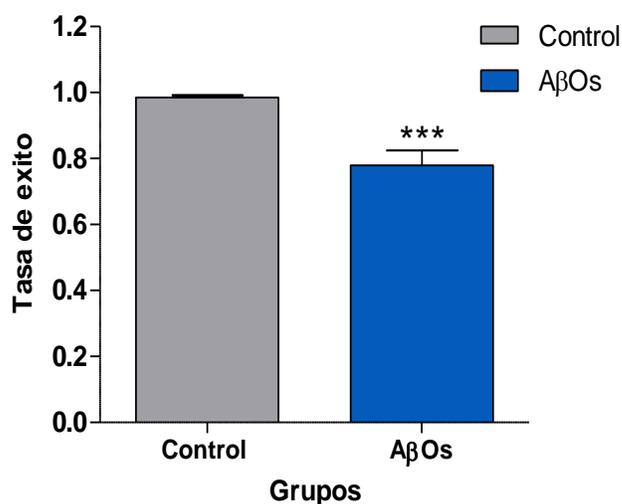
- Finalmente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS 0,01 M y se procedió al revelado con DAB (3- 3'diaminobencidina Hidrocloruro, 5mg/mL, disuelto en buffer Tris 0.2 M pH 7.6) al 0,05% en PBS con 0,003% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0,05% cloruro de níquel para generar una reacción cuyo producto fuera azul oscuro como detección de c-Fos.
- Los cortes son montados en portaobjetos gelatinizados, cubiertos con solución de montaje (Entellan) y observados en microscopio de campo claro.

## 7. RESULTADOS

### **Modelo experimental in vivo de la enfermedad de Alzheimer: inyecciones bilaterales de oligómeros del péptido $\beta$ -amiloide (A $\beta$ Os) en el hipocampo, variables conductuales determinantes del aprendizaje dependiente de hipocampo y contenido proteico de RyR2 y RyR3.**

Para evaluar el efecto de las inyecciones bilaterales e intra-hipocampales de A $\beta$ Os sobre el aprendizaje dependiente de hipocampo en ratas, los animales realizaron la tarea *Oasis Maze* y su desempeño fue comparado con el grupo control, cuyos animales recibieron inyecciones de solución salina.

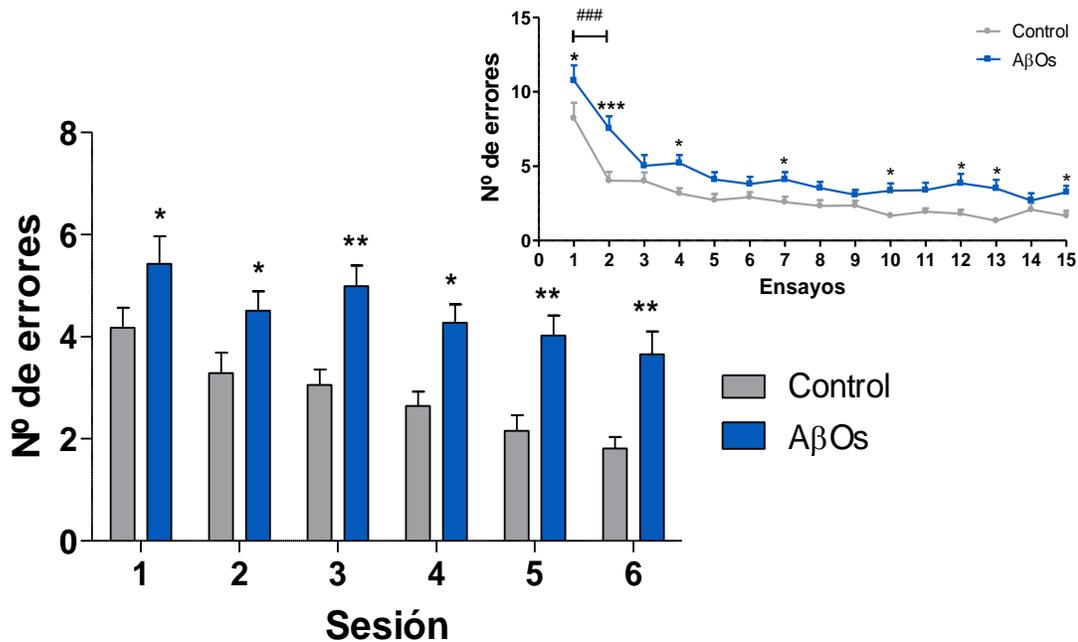
La tasa de éxito del grupo control fue de  $0,985 \pm 0,0071$ , un valor muy cercano a 1, que corresponde al máximo rendimiento posible para este parámetro, mientras el grupo A $\beta$ Os presentó una tasa de éxito de  $0,779 \pm 0,0451$ , con una diferencia significativa comparado con el grupo control, con  $p < 0,001$  (Figura 4).



**Figura 4. Tasa de éxito:** relación entre el número de veces que la rata encuentra la recompensa/el total de veces que realiza la búsqueda, durante sesiones diarias de 15 ensayos. El resultado representa el promedio de las tasas de éxito por grupo experimental, (6 animales por grupo, 6 sesiones por animal, 15 ensayos por sesión). Análisis estadístico: t-test para comparar el efecto de los tratamientos.  $n = 6$  para cada grupo,  $***p < 0,001$ .

La Figura 5, que muestra el promedio del número de errores en los distintos grupos por día, evidencia una mejora en el rendimiento del grupo control en la medida que transcurren los días, representada por una continua disminución en el número de errores a lo largo de los días. Por otro lado, el grupo A $\beta$ Os tiene en promedio un mayor número de errores en cada uno de los días evaluados, con diferencias significativas para todos los días respecto al grupo control. Además,

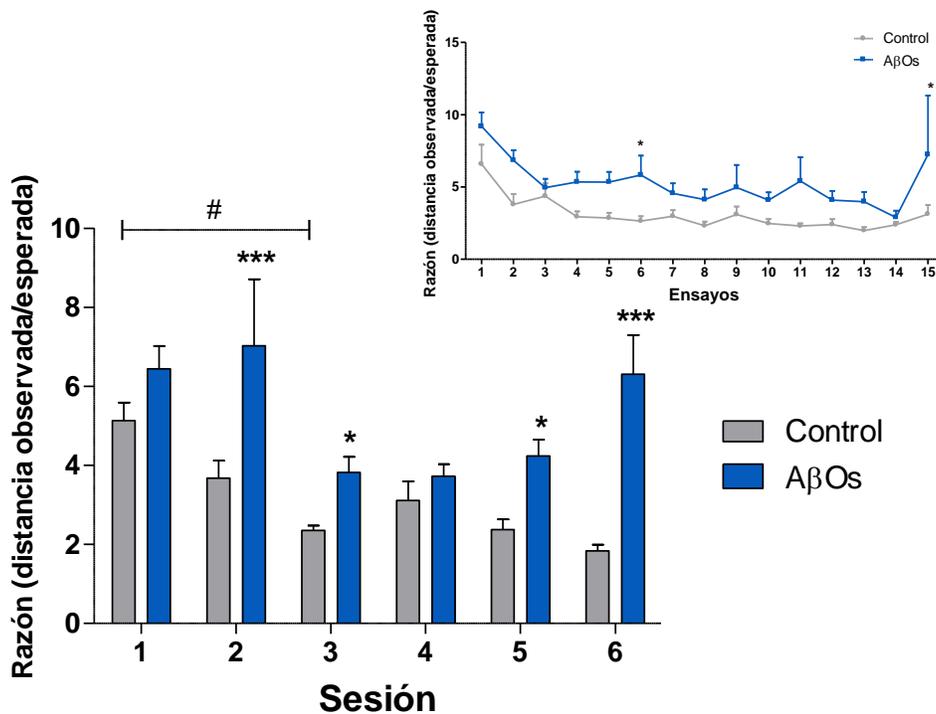
a diferencia de los controles, los animales inyectados con A $\beta$ Os no mejoraron su desempeño, evaluado por el número de errores a lo largo de los días. La figura del inserto superior presenta el promedio del número de errores por cada ensayo (15 ensayos por día de sesión) de todos los animales durante los 6 días; se observa en el grupo control una rápida disminución en el número de errores entre los ensayos 1 y 2 (~50% con  $p < 0,001$ ), mientras el grupo inyectado con A $\beta$ Os reduce el número de errores en menor proporción (~30% con  $p < 0,001$ ).



**Figura 5. Número de errores observados por día.** El parámetro número de errores representa las veces que la rata visita un pocillo sin recompensa durante la tarea. **A)** Los valores representan el promedio del número de errores en cada sesión diaria. **Inserto:** Promedio del número de errores en cada ensayo por grupo. El análisis estadístico fue realizado empleando ANOVA de dos vías seguido por Holm-Sidak post hoc test para comparar el efecto de los tratamientos. Todos los experimentos representan  $n = 6$  para cada grupo. Entre grupos  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ . En grupo control y A $\beta$ Os  $###p < 0,001$ .

Otro parámetro evaluado es la razón entre las distancias observadas y esperadas, que establece la relación entre la distancia real recorrida y la menor distancia posible para el recorrido que realiza la rata entre la posición inicial y final en busca de la recompensa en el laberinto, reflejando una mejora progresiva en la orientación del animal respecto al blanco. En la Figura 6, se observa que el grupo control presenta una disminución en el valor de esta razón

durante los primeros días, con una diferencia significativa a partir del día 3 respecto al día 1 ( $p < 0,05$ ), que se mantiene constante hasta el día 6, sin diferencias significativas entre los días 2, 3, 4 y 6. En contraste, el grupo inyectado con A $\beta$ O $s$  presenta un aumento de la razón de distancias con diferencias significativas para los días 2, 3, 5 y 6 respecto al grupo control. El inserto superior de la Figura 6 representa el promedio de la razón de distancias por ensayo para cada grupo, y muestra un aumento en esta razón, observándose diferencias significativas para los ensayos 6 y 15 ( $p < 0,05$ ). Estos resultados en conjunto indican que las ratas inyectadas con A $\beta$ O $s$  realizan un recorrido mayor, y por lo tanto menos eficiente, comparado con el recorrido esperado que se estima teóricamente (línea recta) durante la búsqueda de recompensa.

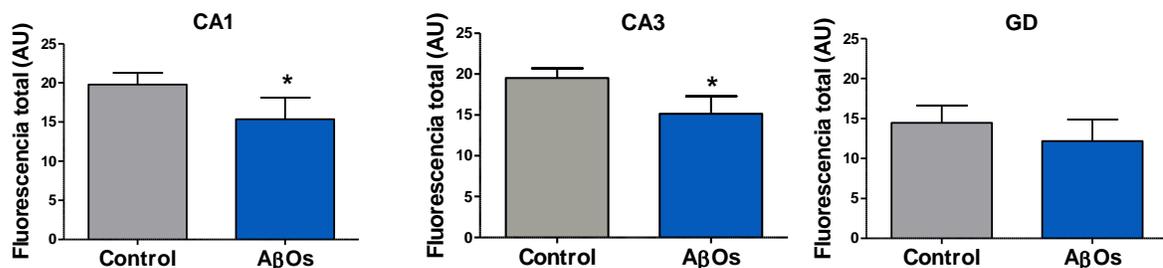


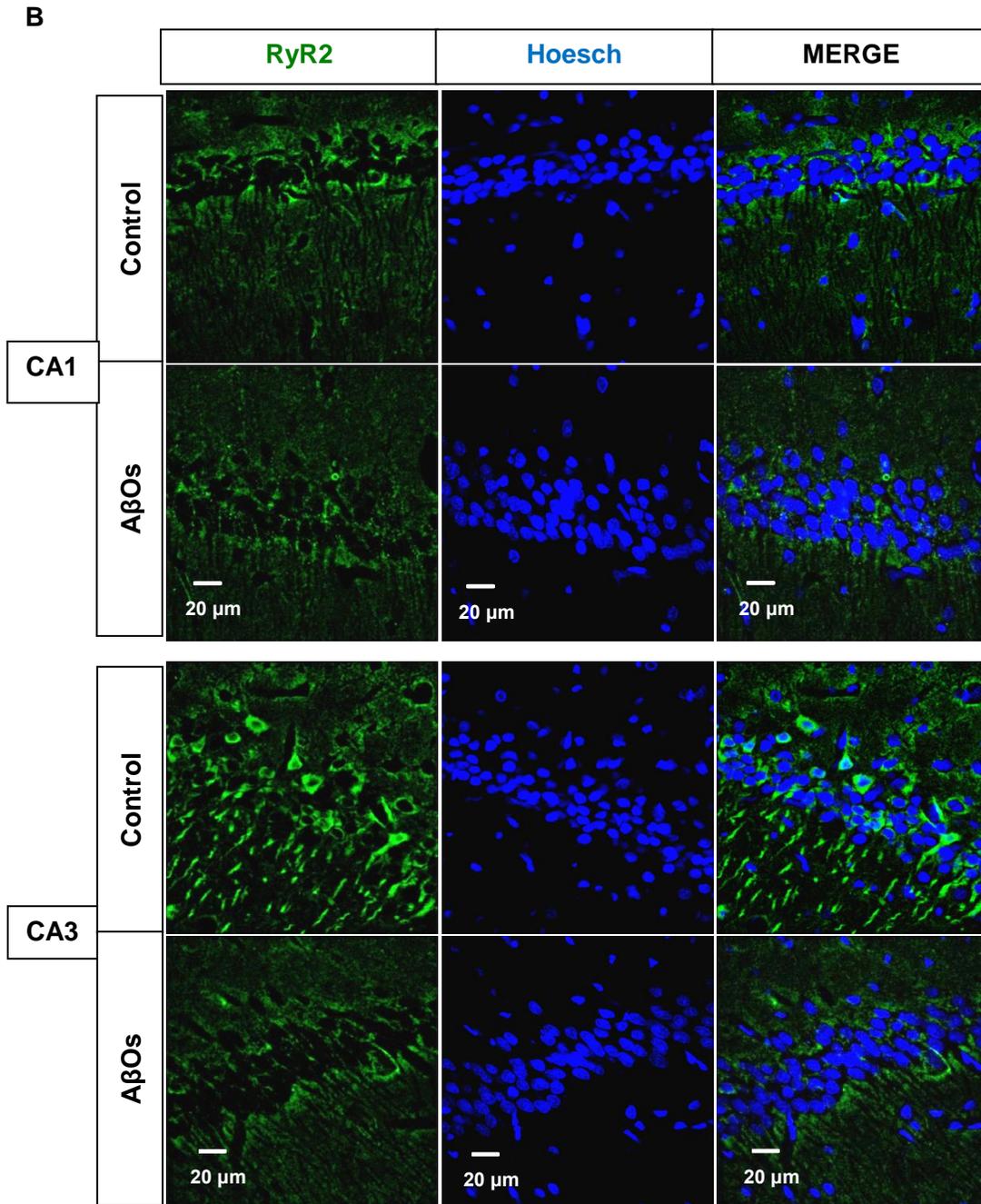
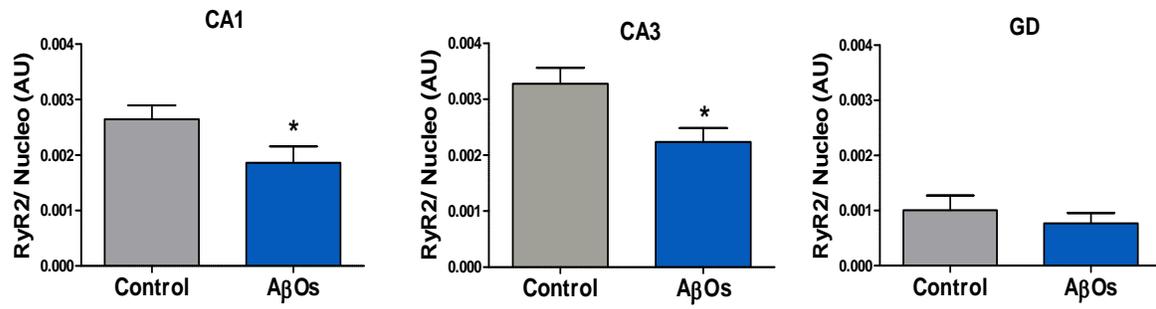
**Figura 6. Razón entre la distancia observada/distancia esperada:** Los valores graficados representan el promedio de todos los valores por sesión. **Figura inserto:** promedio de la razón entre la distancia observada/distancia esperada por ensayo para cada grupo. El análisis estadístico fue realizado por una ANOVA de dos vías seguido por Holm-Sidak post hoc test para comparar el efecto de los tratamientos. Los gráficos representan  $n = 6$  experimentos para cada grupo. Entre grupos \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ . En grupo Control # $p < 0,05$ , entre sesión 1 y 3.

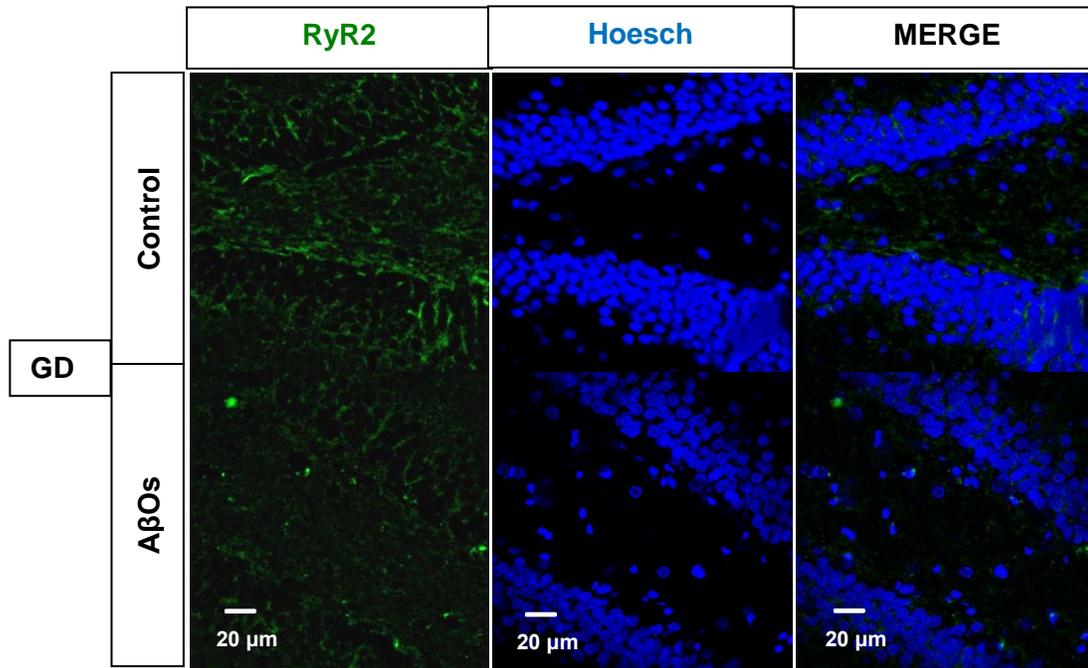
Trabajos previos del laboratorio reportan que la adición de A $\beta$ Os a cultivos primarios de neuronas hipocampales genera una disminución en el contenido de proteína RyR2, sin generar cambios en RyR3 (Paula-Lima et al., 2011). Considerando los hallazgos previos, se procedió a determinar si la inyección de A $\beta$ Os en el hipocampo de las ratas, que generó una alteración en la conducta (figuras 4 a 6 modelo *in vivo* de Alzheimer), presentaban también cambios en el contenido proteico de RyR2 y RyR3. Para ello, tras la realización de la tarea de memoria espacial los animales fueron perfundidos con paraformaldehído para luego obtener sus cerebros y procesarlos para inmunodetección por fluorescencia de las proteínas RyR2 y RyR3.

La Figura 7 muestra la inmunodetección de RyR2 en rebanadas de hipocampo (40  $\mu$ m) de las ratas control y de las inyectadas con A $\beta$ Os, utilizando un anticuerpo que detecta específicamente esta isoforma y no reconoce la isoforma RyR3. Se obtuvieron imágenes de 20 cortes confocales (1,5  $\mu$ m de espesor) de las rebanadas de hipocampo para posterior deconvolución en el programa ImageJ. Las imágenes deconvolucionadas fueron proyectadas en una imagen 3D en la cuál se determinó los niveles absolutos de fluorescencia total. Con esto, se evidenció una disminución significativa en la inmunodetección del contenido proteico de RyR2 en las regiones CA1 y CA3,  $p < 0,05$  respecto al grupo control. Sin embargo, en la región del GD la cuantificación de fluorescencia total (Figura 5 A, G y D) no mostró diferencias significativas entre los dos grupos.

A

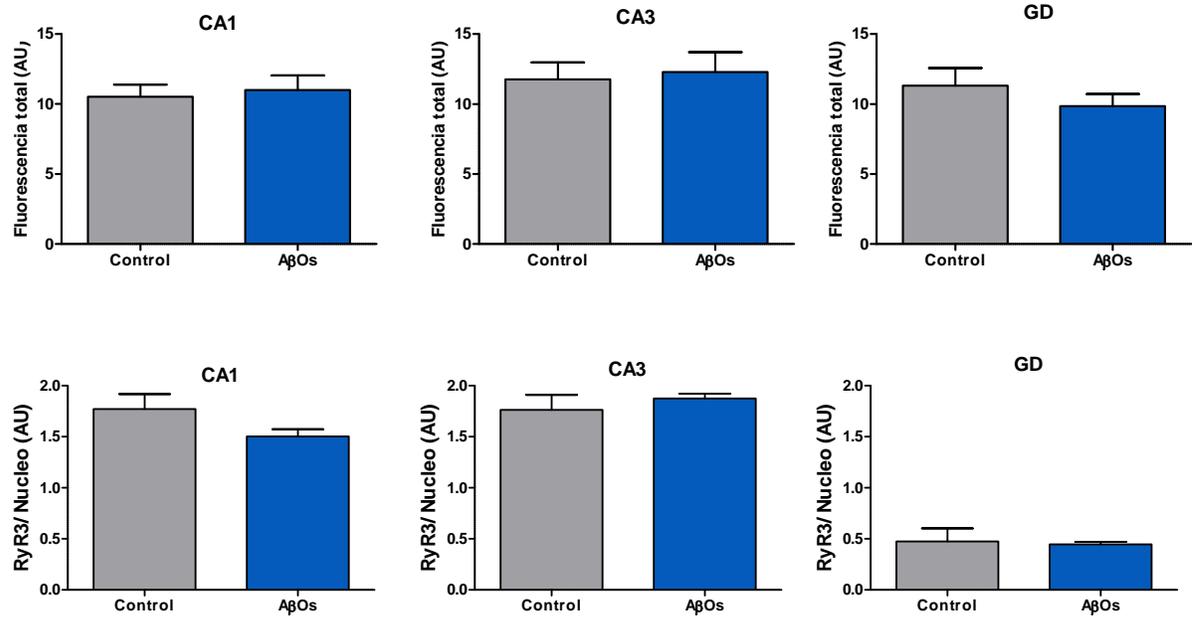
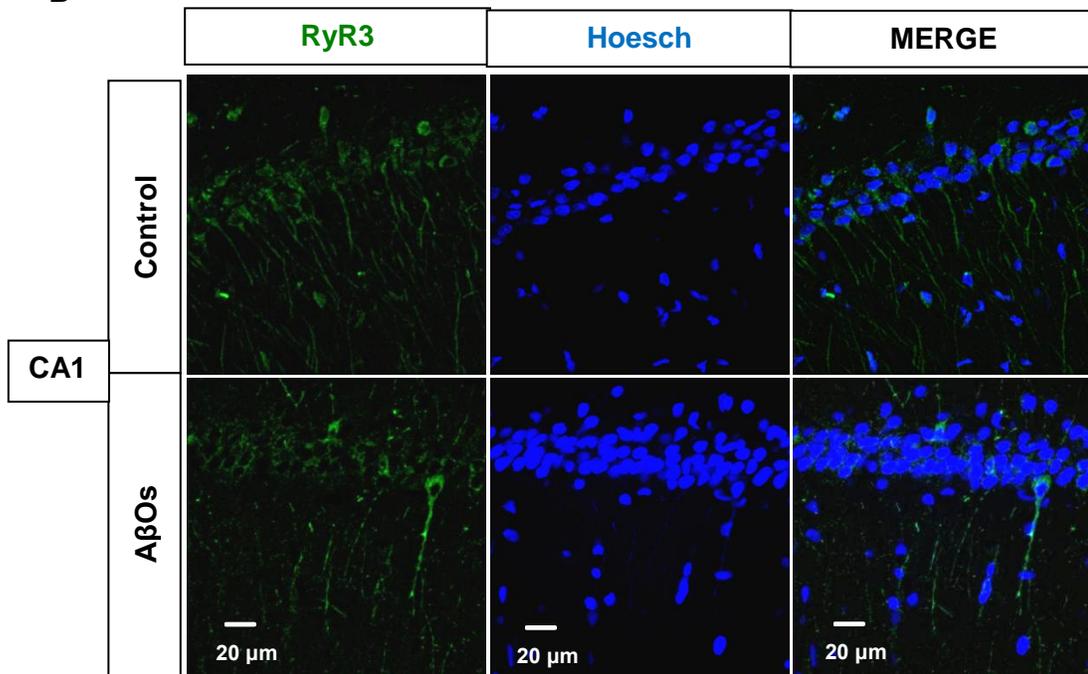


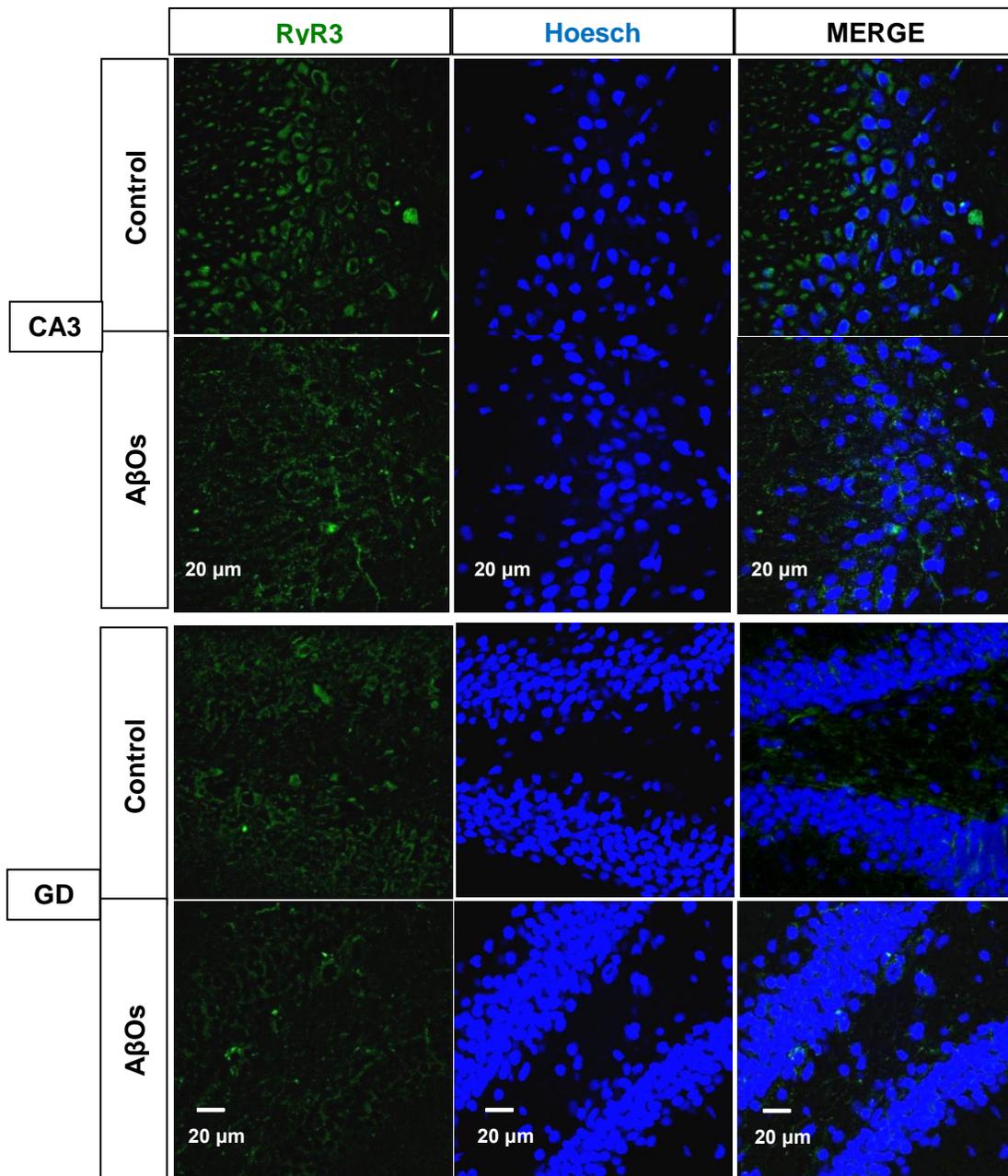




**Figura 7. A y B. Inmunodetección de RyR2 tras la inyección de AβOs. (A)** cuantificación del contenido de la proteína RyR2 mediante inmunofluorescencia y normalización del contenido proteico de RyR2, respecto a la fluorescencia total del núcleo. **(B)** Las imágenes de 20 cortes confocales de 1,5 μm capturadas con microscopio confocal fueron analizadas con image J, donde fueron deconvolucionadas y proyectadas en un imagen 3D cuya fluorescencia total fue determinada. El análisis estadístico fue realizado por t-test para comparar la inmunodetección de RyR2 en cada región del hipocampo entre los grupos experimentales. Los gráficos en A representan 6 experimentos independientes para cada grupo. \*p< 0,05.

De la misma manera se procedió a determinar los efectos de la inyección de AβOs sobre la expresión de RyR3. Sin embargo, a diferencia de lo observado con la inmunodetección de RyR2, la cuantificación del contenido proteico de RyR3 por inmunofluorescencia indicó que no existen diferencias entre el grupo control y el inyectado con AβOs, en ninguna de las regiones hipocampales estudiadas anteriormente. **(Figura 8).**

**A****B**



**Figura 8. A y B Inmunodetección de RyR3 tras la inyección de AβOs. (A)** Cuantificación del contenido de la proteína RyR3 mediante inmunofluorescencia y normalización del contenido proteico de RyR3, respecto a la fluorescencia total del núcleo. **(B)** Las imágenes de 20 cortes confocales de 1,5 μm capturadas con microscopio confocal fueron analizadas con image J, donde fueron deconvolucionadas y proyectadas en un imagen 3D cuya fluorescencia total fue determinada. El análisis estadístico fue realizado por t-test para comparar la inmunodetección de RyR3 en cada región del hipocampo y entre los grupos experimentales. Los experimentos son n= 6 para cada grupo.

Adicionalmente realizamos inmunofluorescencia para la detección de A $\beta$ O en la región de CA3, donde realizamos las inyecciones intra-hipocampales (Figura 9). Las imágenes revelaron la presencia de A $\beta$ O en CA3.

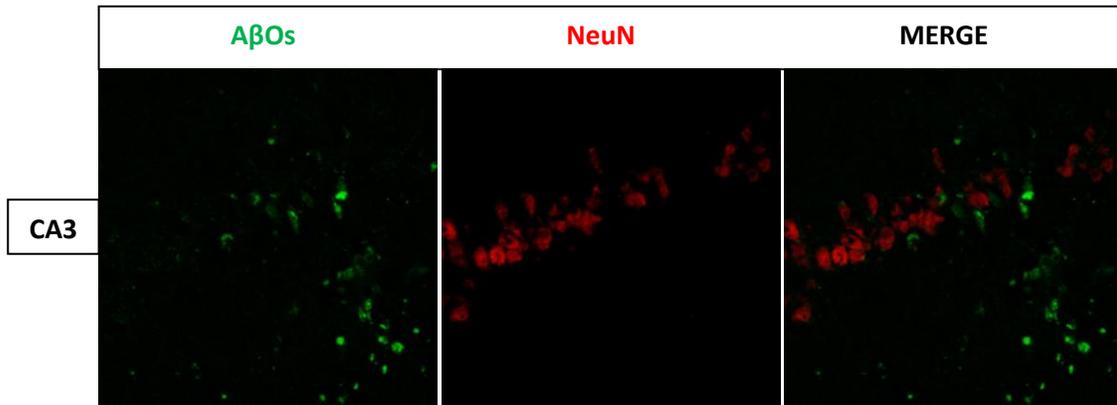
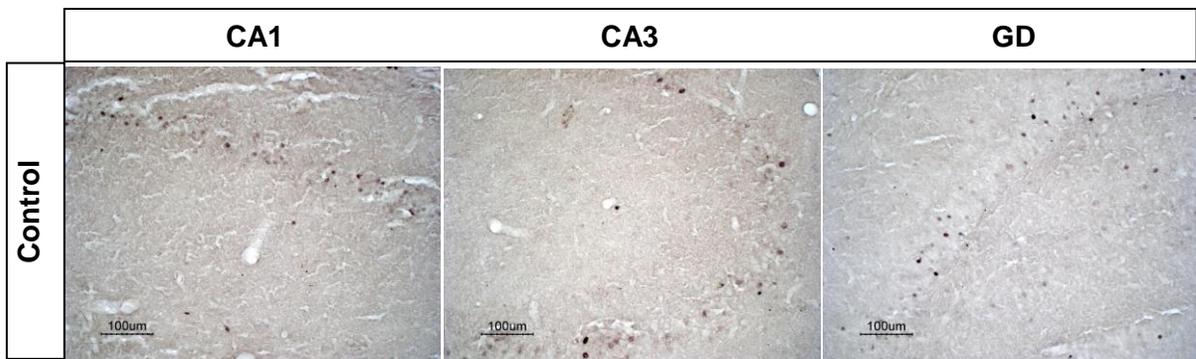
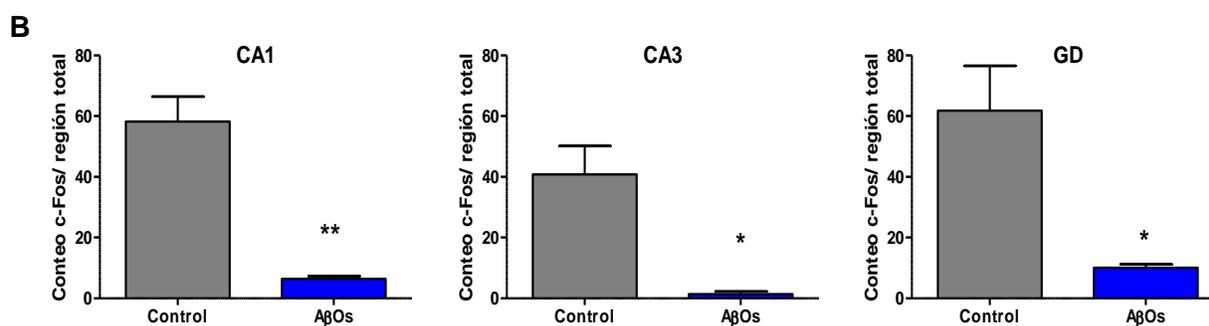
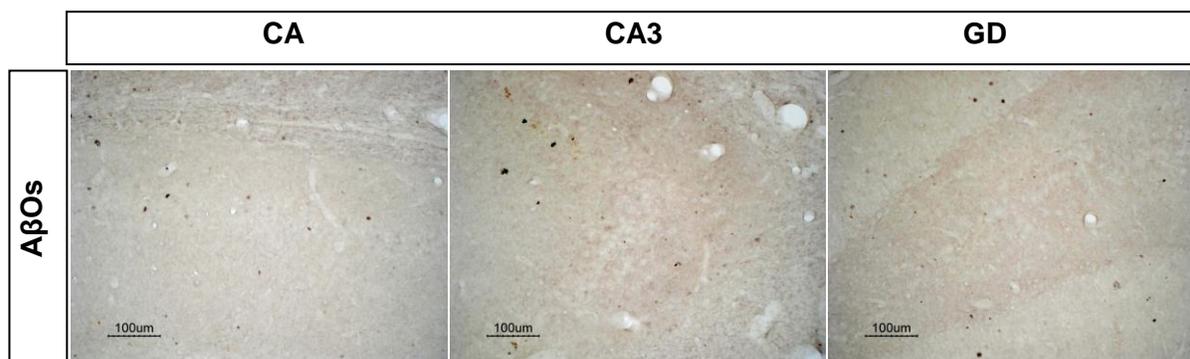


Figura 9. Inmunodetección de A $\beta$ O (verde) y NeuN (Núcleo neuronal, rojo), en la región de CA3.

Es conocido que tras la experiencia o proceso de plasticidad sináptica, ocurre la activación de genes de expresión temprana como c-FOS (Cirelli C. y Tononi G. 2000), cuya expresión se ha visto disminuida o ausente en modelos animales con daños cognitivos que afectan los procesos de aprendizaje y memoria (Christensen, D. y col. 2013). Para nuestro modelo, consideramos evaluar el nivel de expresión de c-Fos en las diferentes regiones del hipocampo, de ratas controles e inyectadas con A $\beta$ O (Figura 10). La Figura 10.A. indica la cuantificación de los niveles de expresión de c-FOS, mostrando una disminución significativa en las regiones CA1, CA3 y GD de los animales inyectados con A $\beta$ O, respecto al grupo control, como se observa en los gráficos mostrados en A Figura 10.B.





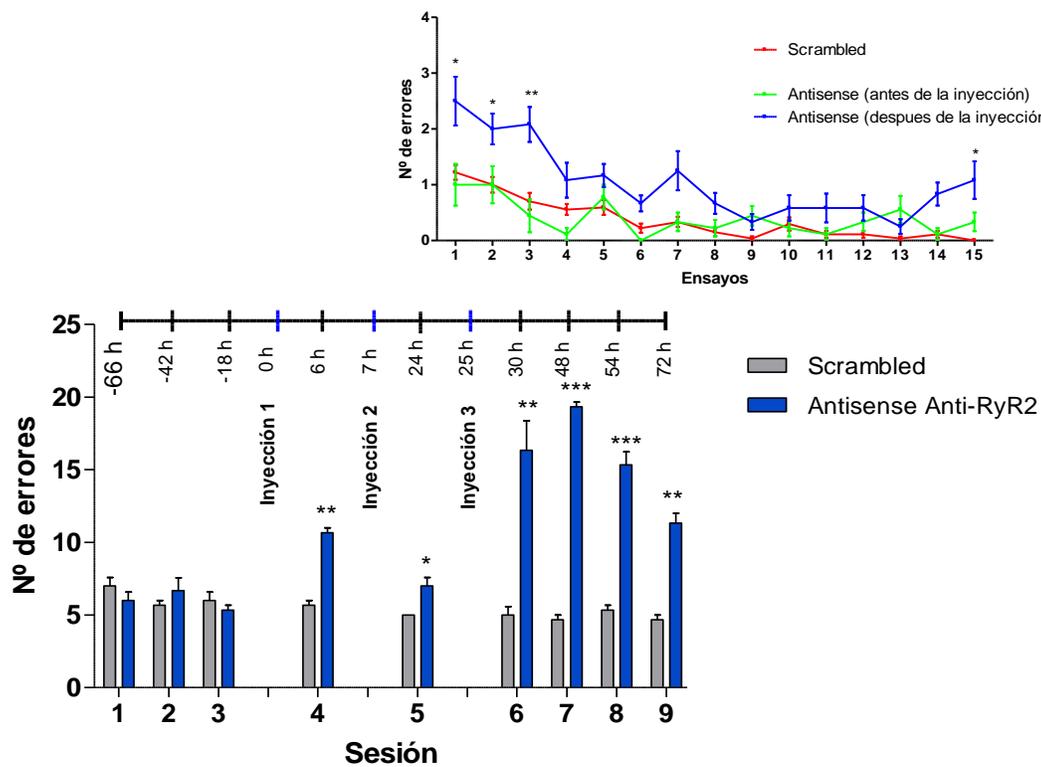
**Figura 10. A y B.** Detección inmunohistoquímica de c-Fos y conteo de marcas de c-Fos en el total de área observada. Análisis estadístico fue determinado por t-test para comparar los en cada región del hipocampo entre los grupos de tratamientos. Los gráficos representan n= 6 experimentos para cada grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

**Modelo *knock-down* de RyR2: inyecciones bilaterales e intra-hipocampales de oligonucleótidos anti-sentido para suprimir la expresión de RyR2 en ratas macho adultas, variables conductuales determinantes de la memoria dependiente de hipocampo y contenido proteico de RyR2 y RyR3.**

Considerando los cambios observados en el contenido proteico de RyR2 tras la inyección con AβOs que causa déficit de memoria espacial en la tarea de *Oasis Maze* (Figuras 4-8) y basados en antecedentes previos (Galleotti 2008) que destacan la importancia de RyR en los procesos de aprendizaje y memoria, decidimos investigar directamente si la disminución del contenido de RyR2 *in vivo* afecta negativamente los procesos de aprendizaje y memoria. Para ello, nos propusimos intervenir en los niveles del mensajero de RyR2, inyectando

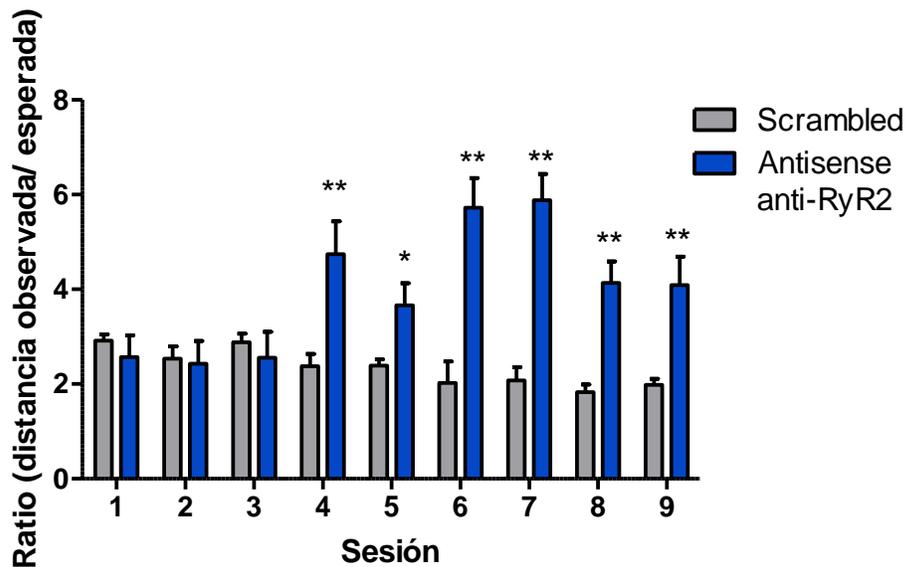
oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2 (anti-RyR2) en la región CA1 del hipocampo de las ratas, para tratar de reducir el contenido proteico de RyR2. Como control, utilizamos animales inyectados con la secuencia palindrómica o *scrambled de RyR2*.

La administración de la secuencia anti-RyR2 RNAm, que inhibe la expresión del RyR2, generó un deterioro en el rendimiento cognitivo de los animales observado como el aumento en el número de errores en cada sesión (Figura 11) y ensayos (inserto), es decir durante el desarrollo de la sesión.



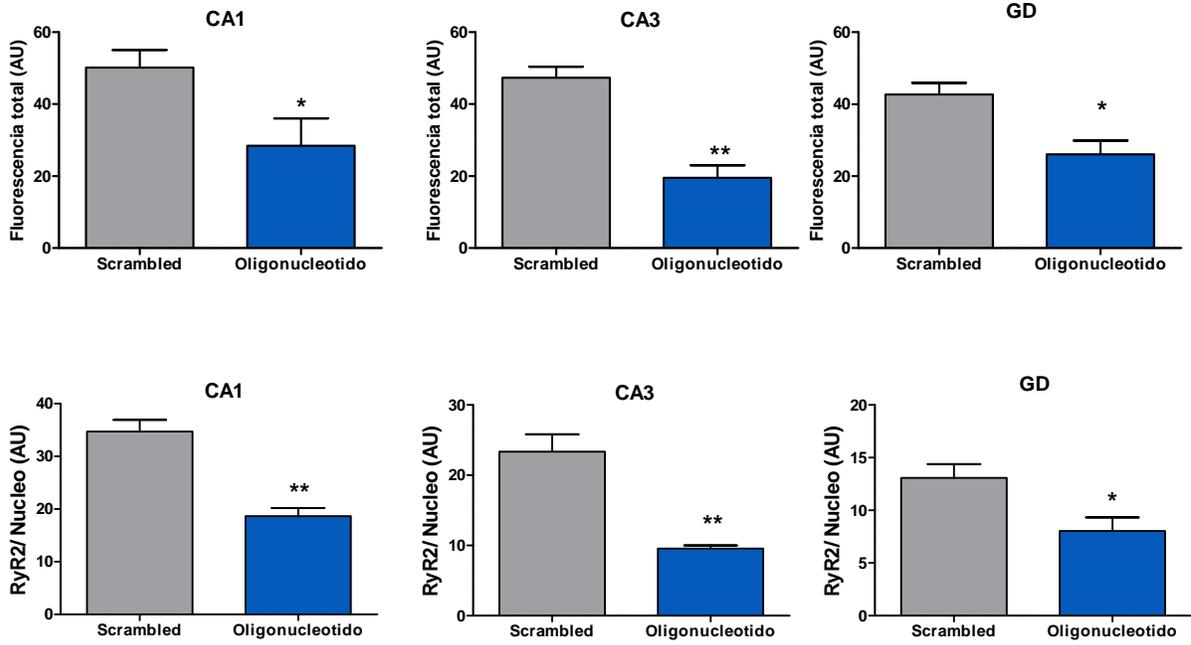
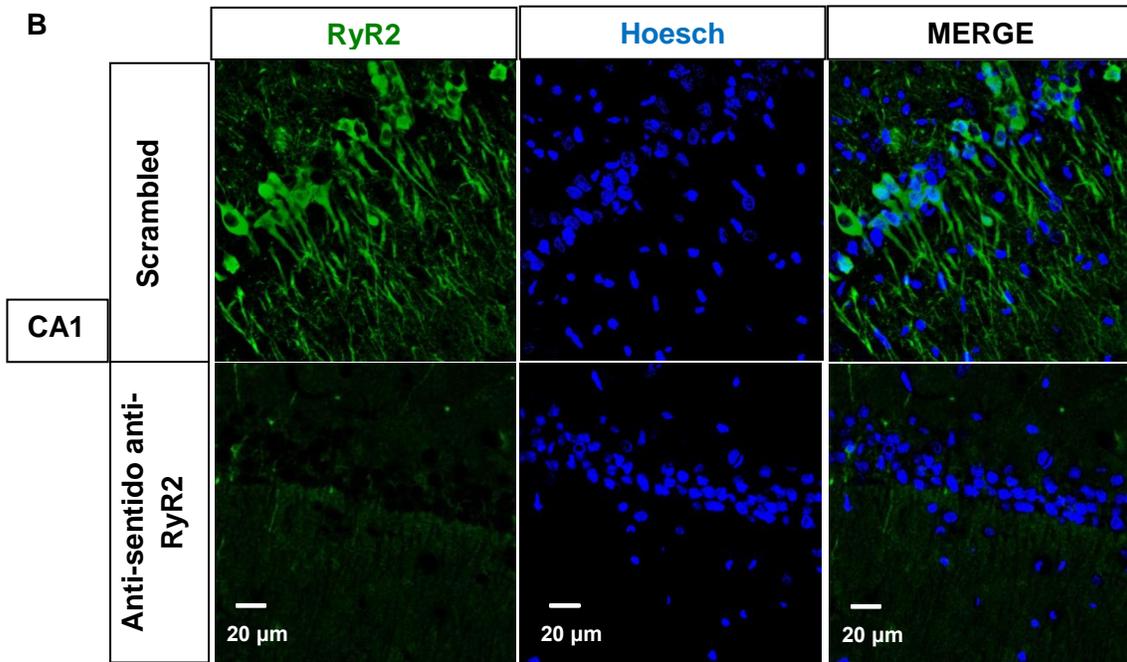
**Figura 11. Número de errores:** veces que la rata visita un pocillo sin recompensa durante la tarea. **A)** Los valores representan el promedio del número de errores en cada sesión. **Inserto:** Promedio del numero de errores en cada ensayo por grupo. El análisis estadístico fue realizado utilizando un ANOVA de dos vías seguido por Holm-Sidak post hoc test, para comparar el efecto de los tratamientos a lo largo del tiempo y de los ensayos. Los gráficos representan 3 experimentos para cada grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

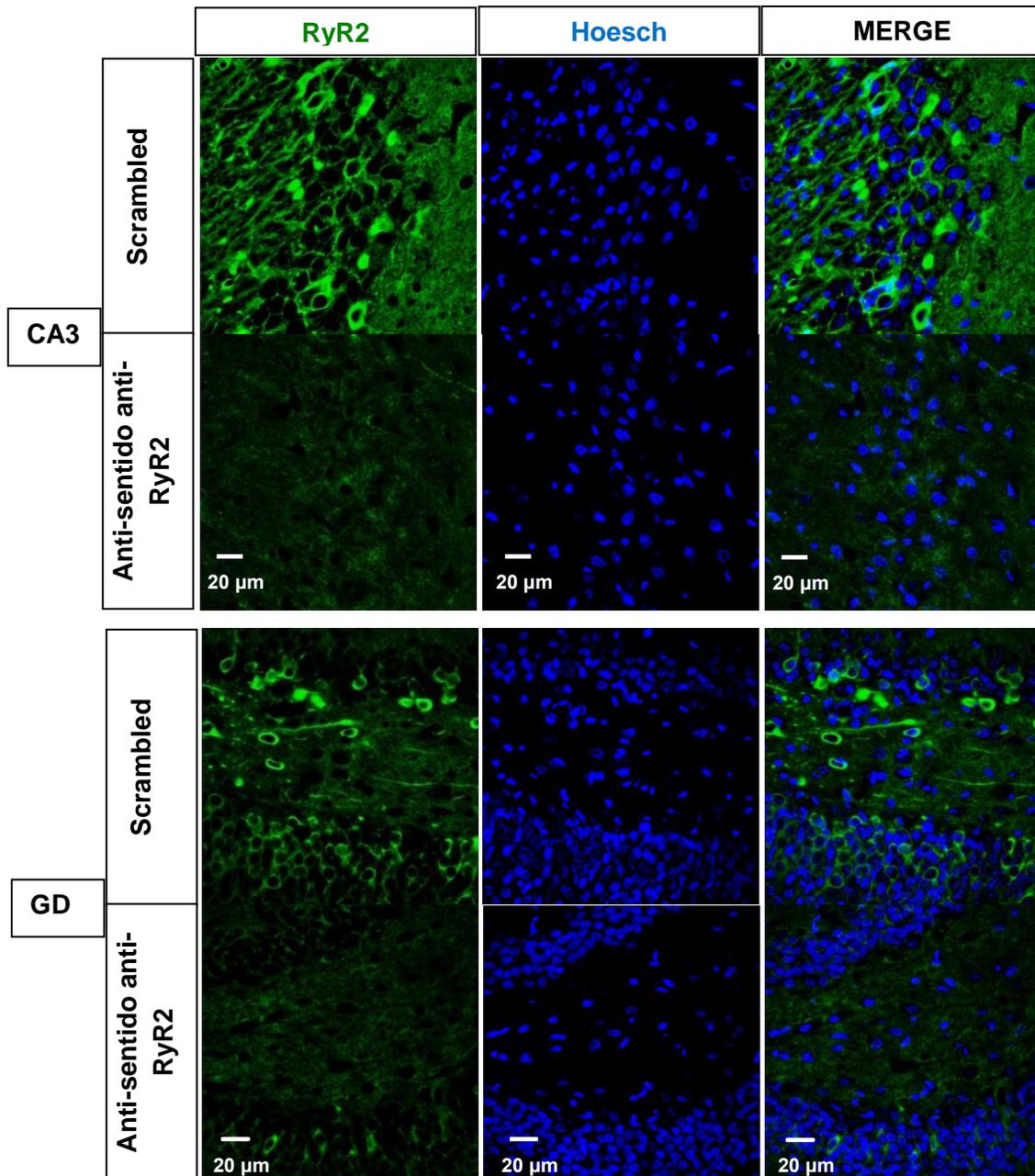
La Figura 12 ilustra el aumento en la razón entre la distancia observada y esperada durante las sesiones de tarea en el *Oasis Maze*, posterior a las inyecciones bilaterales e intra-hipocampales en CA1 de los oligonucleótidos anti-sentido anti RyR2. El grupo control inyectado con oligonucleótido *scrambled* no presentó cambios en las distintas sesiones evaluadas, contrario al grupo inyectado con oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2 que presentó un aumento en la razón de distancias luego de la primera inyección, lo que indica un daño a la memoria espacial.



**Figura 12. Razón entre la distancia observada / distancia esperada:** El gráfico representa el promedio de los valores obtenidos para cada grupo por sesión. El análisis estadístico fue realizado utilizando ANOVA de dos vías seguido por Holm-Sidak post hoc test para comparar el efecto de los tratamientos. Los gráficos representan n= 3 experimentos independientes para cada grupo. \*p< 0,05, \*\*p<0,01.

La inmunodetección de RyR2 y posterior análisis de las imágenes de las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo de las ratas utilizadas para el desarrollo del objetivo 2, indicaron cambios significativos en el contenido de RyR2 en la región CA1 entre los grupos inyectados con anti-RyR2 vs *scrambled* (p< 0,05), como se observa en la Figura 13. La disminución del contenido de RyR2, indica un efecto localizado al hipocampo.

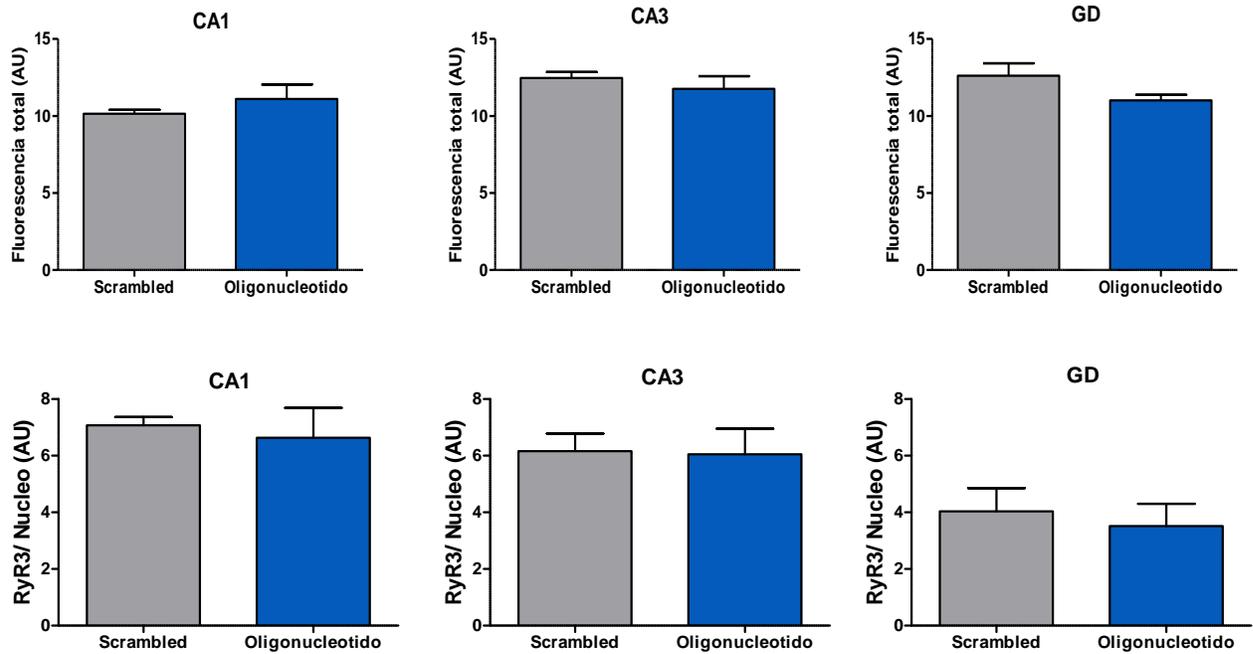
**A****B**



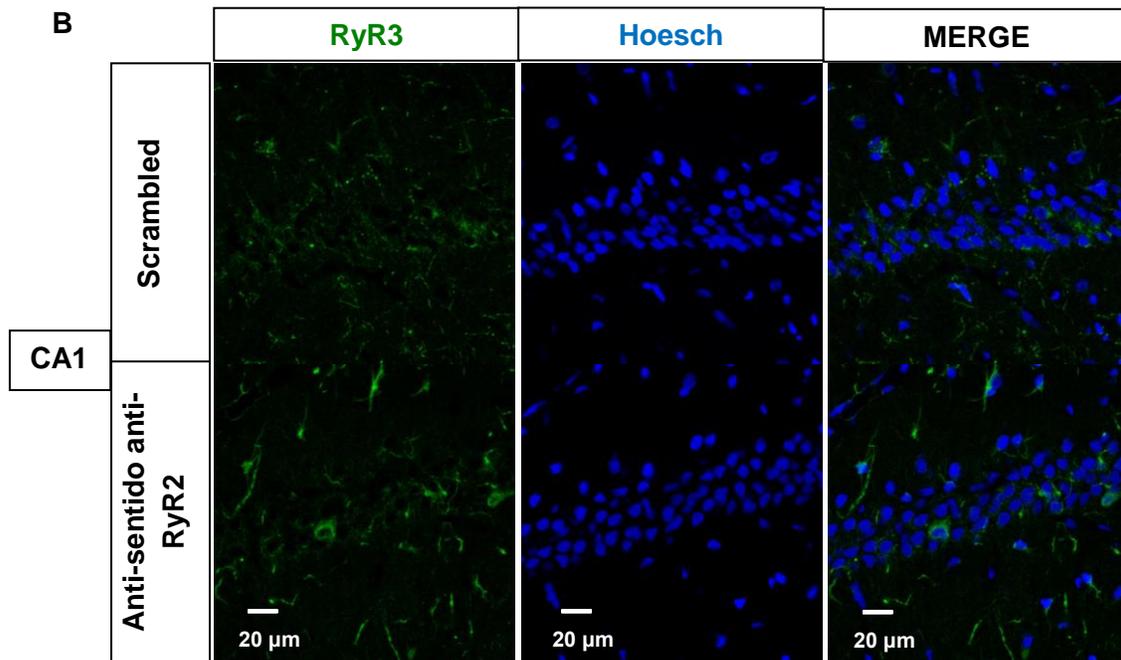
**Figura 13. A y B. Inmunodetección de RyR2 tras la inyección de oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2, (A)** cuantificación del contenido de la proteína RyR2 mediante inmunofluorescencia y normalización del contenido proteico de RyR2, respecto a la fluorescencia total del núcleo. **(B)** Las imágenes de 20 cortes confocales de 1,5  $\mu\text{m}$  capturadas con microscopio confocal fueron analizadas con image J, donde fueron deconvolucionadas y proyectadas en un imagen 3D cuya fluorescencia total fue determinada. El análisis estadístico fue realizado por t-test para comparar la inmunodetección de RyR2 en cada región del hipocampo entre los grupos experimentales. Todos los experimentos son  $n=3$  para cada grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

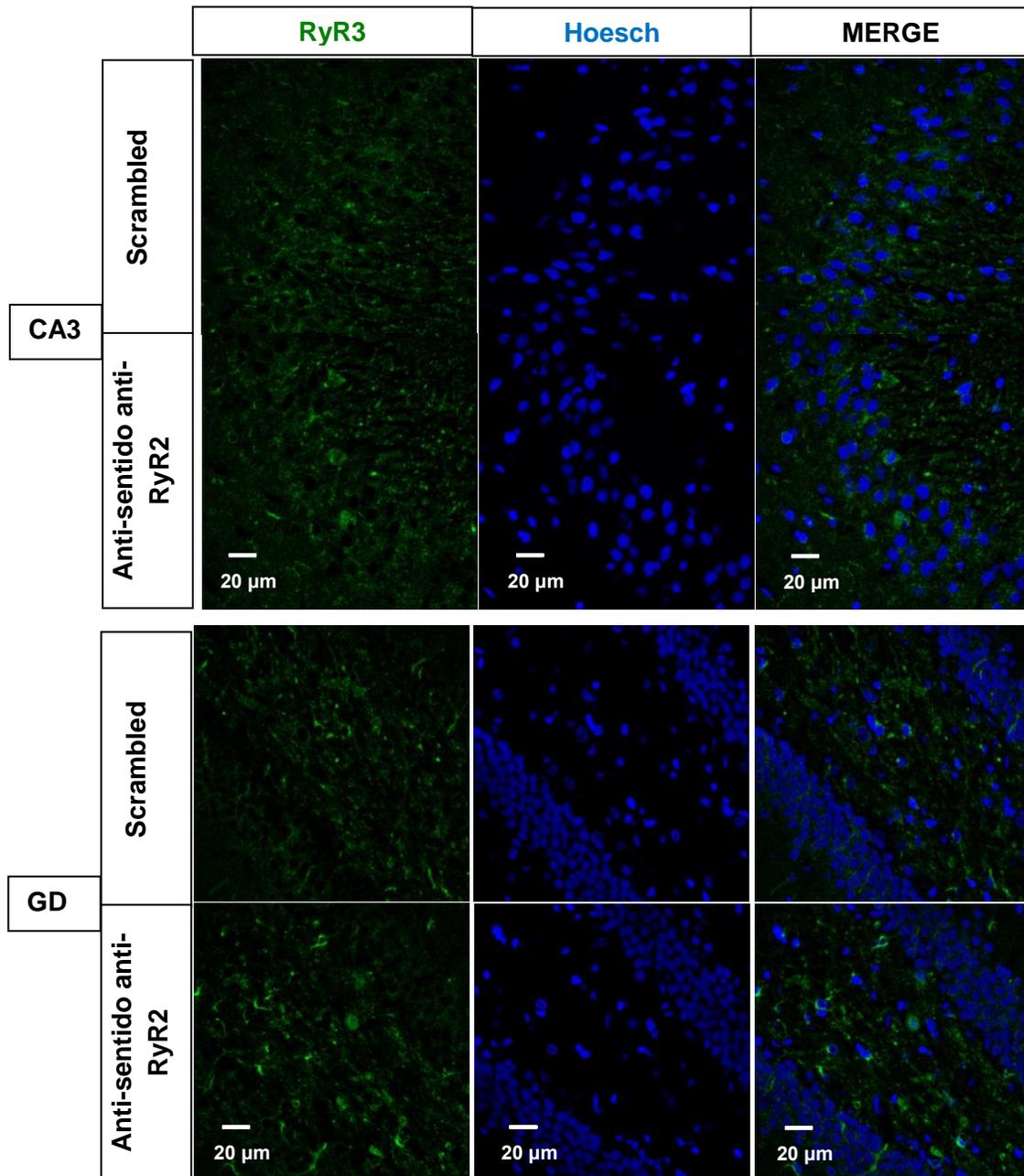
Por otro lado, el contenido proteico de RyR3 en las regiones evaluadas, no presentó cambios entre los grupos comparados, anti-RyR2 vs scrambled o anti-RyR2 vs salino (**Figura 14**).

**A**



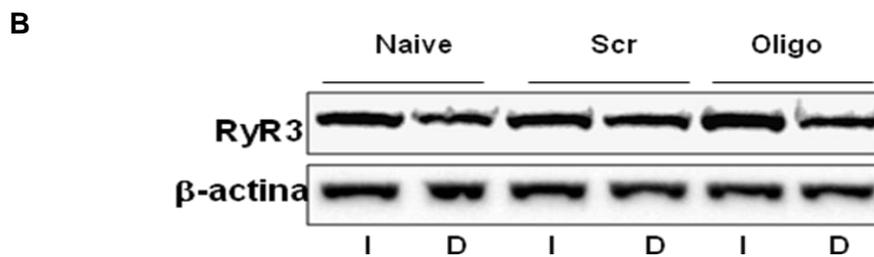
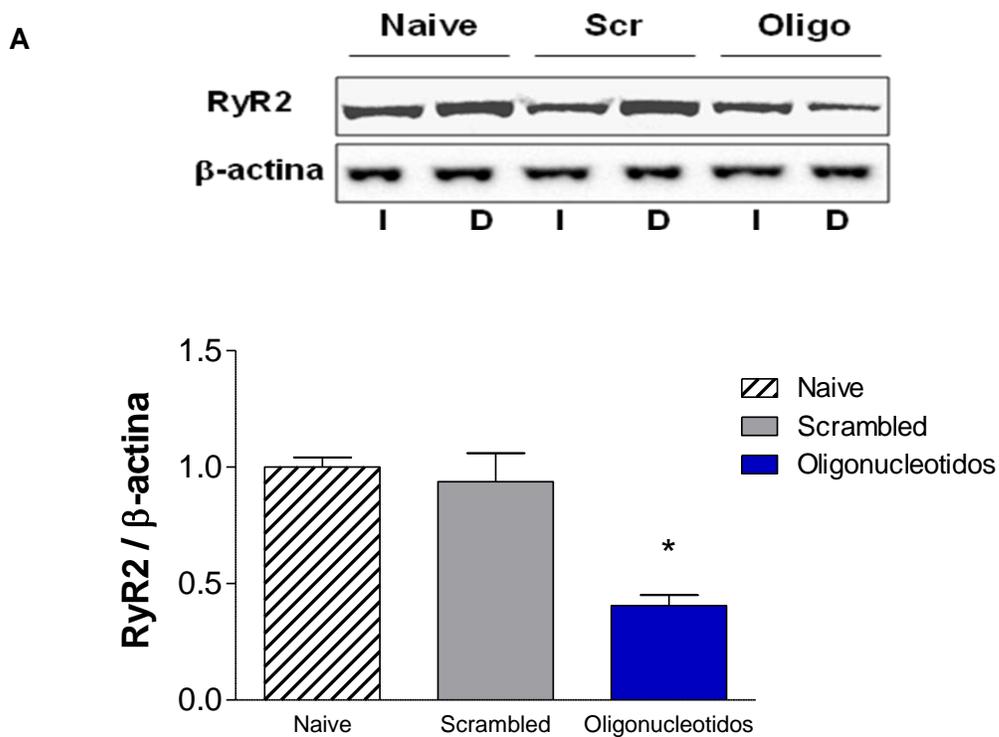
**B**

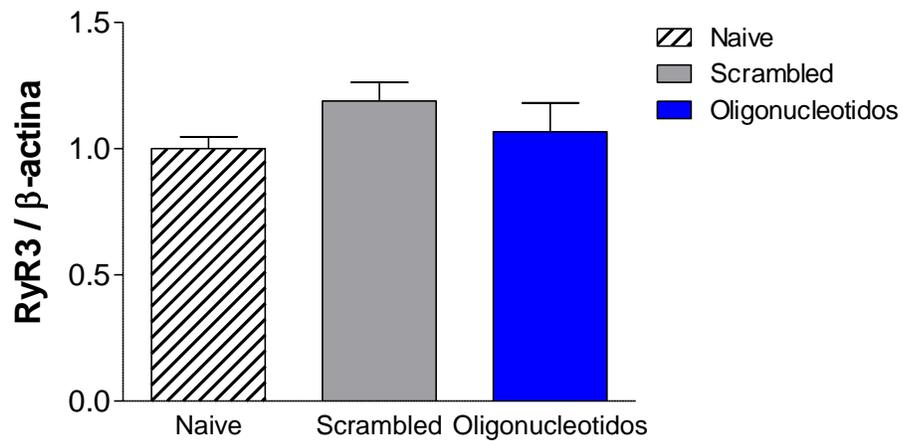




**Figura 14. A y B. Inmunodetección de RyR3 tras la inyección de oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2 (A)** cuantificación del contenido de la proteína RyR3 mediante inmunofluorescencia y normalización del contenido proteico de RyR3, respecto a la fluorescencia total del núcleo. **(B)** Stack de 20 imágenes capturadas con microscopio confocal y analizadas con image J, deconvolución y proyección 3D. Análisis estadístico fue determinado por t-test para comparar los en cada región del hipocampo entre los grupos de tratamientos. Todos los experimentos son n= 3 para cada grupo, sin diferencias estadísticas.

Finalmente realizamos western-blot para analizar el contenido proteico de RyR2 y RyR3 en el hipocampo de los animales inyectados con el oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2, scrambled y control *naive* (**Figura 15**). En la **figura 15.A** se observa una disminución en el contenido proteico de RyR2 en el hipocampo, derecho (D) e izquierdo (I), de los animales inyectados con oligo-nucleotidos anti-RyR2, respecto a los controles *naive* y scrambled. Por otro lado, el contenido proteico de RyR3 en el hipocampo de los grupos evaluados, no presentó cambios (**Figura 15.B**).





**Figura 15. (A)** Western-blot y cuantificación normalizada por  $\beta$ -actina, del contenido de la proteína RyR2 en hipocampo derecho (D), e izquierdo (I), para el grupos control naive, e inyectados con scrambled u oligonucleótidos anti-RyR2. **(B)** Western-blot y cuantificación normalizada por  $\beta$ -actina, del contenido de la proteína RyR3 en hipocampo derecho (D), e izquierdo (I), para el grupo control naive, e inyectados con scrambled u oligonucleótidos anti-RyR2. Análisis estadístico fue determinado por t-test para comparar entre los grupos de tratamientos. Todos los experimentos son n= 4 (4 hipocampos, 2 animales por condición) para cada grupo. \*p< 0,05.

## 8. DISCUSIÓN

Estudios en modelos animales o en pacientes humanos con lesiones a nivel hipocampal, proporcionan los mejores precedentes respecto a la importancia del hipocampo en el aprendizaje, formación y mantención de la memoria, particularmente de tipo espacial y declarativa (Scoville, W y col. 1957, Morris, R. y col. 1982, Zola M., y col. 1986, Squire L. y col. 1989, Rempel-Clower, N. y col. 1996, Kubie, J. y col. 1999, Bannerman, D.M. y col. 2004). Evidencia previa sugiere que tales procesos cognitivos, implican cambios en la plasticidad y fuerza sináptica de neuronas hipocampales, las cuáles requieren la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente de reservorios intracelulares, como el ER (Berridge M. 2000, Hidalgo, C. 2004, Bliss T y Collingridge, G 2013).

El canal RyR presente en el ER, ha sido vinculado como una proteína clave en los procesos de plasticidad sináptica que subyacen al aprendizaje y memoria, así como en el deterioro cognitivo que se desarrolla durante el envejecimiento o en la EA (Del Prete, D. 2014, Paula-Lima, A. y col. 2014). En este contexto, los eventos que impulsan el deterioro cognitivo a nivel de aprendizaje y memoria espacial, su vinculación con la desregulación del calcio intracelular y los mecanismos involucrados, aunque ampliamente estudiados, aun no han sido completamente dilucidados. (Galeotti, N. 2008; Zhao, W. 2000, Adasme, T. y col. 2011).

Trabajos previos (Zhao y cols., 2000; Adasme y cols. 2011) demuestran la correlación que existe entre los niveles de expresión de RyR2 y un aumento en el rendimiento de ratas evaluadas en la tarea de navegación espacial *Morris water maze*. Por otro lado, datos previos de nuestro laboratorio demuestran en experimentos *in vitro*, que la adición de A $\beta$ Os a cultivos de neuronas hipocampales induce una alteración de la liberación de calcio mediada por RyR y una disminución en los niveles de expresión de RNAm y proteína de RyR2 (Paula Lima, A. y col. 2011).

Las investigaciones que preceden a este trabajo destacan la importancia del canal RyR (Galeotti, 2008, Zhao W. y col. 2000, Zalk, R. y col. 2007), y en

particular del canal RyR2, en funciones cognitivas de tipo aprendizaje y memoria (Adasme T. y col. 2011, Mori, F. 2000); sin embargo no se ha evaluado el efecto de los A $\beta$ Os sobre los niveles de expresión de RyR2 *in vivo*, o si la disminución de esta isoforma *in vivo*, puede alterar funciones cognitivas de tipo aprendizaje y memoria espacial. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de RyR2 en el proceso de aprendizaje y memoria de tipo espacial, en un modelo experimental de la EA y en un modelo *knock-down* tejido específico de RyR2, mediante la tarea *Oasis maze* y cuantificación de los niveles de expresión del RyR2.

En conjunto los resultados obtenidos en los experimentos conductuales del modelo de la EA, revelan que 3 inyecciones de A $\beta$ Os en el hipocampo de las ratas, son suficientes para inducir deterioro cognitivo característico, similares a los que presentan individuos con EA. El deterioro cognitivo presente en el grupo inyectado con A $\beta$ Os, reflejado por un aumento en el número de errores y en la razón entre la distancia observada/esperada (Figuras 5 y 6), demuestran los efectos deletéreos de los A $\beta$ Os sobre la cognición, corroborando otros trabajos (Jia, J y col. 2013 y Pinçon A y col. 2015) en los cuales la inyección intracerebro ventricular (i.c.v.) de A $\beta$ 42, genera una alteración en el aprendizaje y memoria a largo plazo, evaluados en la tarea *Morris water maze*. De forma similar, se observó déficit de memoria espacial durante la ejecución de la tarea en el laberinto de *Morris water maze* (Galeano, P y col. 2014), en un nuevo modelo transgénico para la EA, el McGill-R-Thy1-APP Tg(+/-), que acumula A $\beta$ Os en el cerebro con la edad, y exhibe una gama de alteraciones comportamentales y cognitivas características de la enfermedad.

Los resultados presentados en esta tesis muestran que el grupo experimental, tratado con inyecciones de A $\beta$ Os (grupo A $\beta$ Os), presentó un menor rendimiento en la tarea *Oasis maze*, evidenciado en cada una de las variables evaluadas. La tasa de éxito muestra una diferencia significativa entre el grupo control  $0,9852 \pm 0,0070$  y A $\beta$ Os  $0,7796 \pm 0,0451$  (Figura 4), que representa una menor capacidad del animal para encontrar la recompensa, indicando que un minuto en cada ensayo no es suficiente para lograrlo, aun

cometiendo muchos errores. De hecho, el número es significativamente mayor para el grupo A $\beta$ Os lo que se evidencia al analizar el número de errores realizado por sesión y ensayo (Figura 5).

El número de errores en cada sesión, es mayor en el grupo A $\beta$ Os que en el grupo control, es decir que durante su recorrido, el animal realiza muchos intentos fallidos en la búsqueda del pocillo con recompensa. En cada sesión el pocillo blanco es cambiado, lo que sugiere que el insulto generado por A $\beta$ Os, puede alterar la capacidad de un nuevo aprendizaje, que es requerido para que el animal pueda actualizar su posición en el espacio durante la realización de la tarea. En otros trabajos donde se evalúa el desempeño de ratas en tareas de navegación espacial tras una lesión hipocampal localizada, también se observa una alteración en el nuevo aprendizaje espacial (Knowlton B y Fanselow M, 1998, Clark y col. 2005, Schimanski, L. y col. 2013).

Finalmente, al evaluar la razón entre la distancia observada y la distancia esperada, encontramos que el promedio de la razón es mayor en las sesiones 2, 3, 5 y 6 vs el grupo control, observando recorridos menos eficientes respecto al grupo control, lo que indica una deficiente estrategia de navegación de los animales inyectados con A $\beta$ Os, que amerita futuros análisis y modelamientos. Estos resultados destacan la importancia del hipocampo para el desarrollo de habilidades que permitan realizar tareas de navegación espacial o recordar localizaciones específicas, como se reporta en otros trabajos (Scoville, W y Milner, B. 1957, Huang, Y. y col. 1996, Izquierdo, I. y col. 1997, Clark y col. 2005); sin embargo, en nuestro modelo, el deterioro a nivel hipocampal es producto de las inyecciones de A $\beta$ Os en la región de CA3 del hipocampo y de su acumulación en las neuronas piramidales de esta región (Figura 9). Esta acumulación ha sido identificada mediante inmuno-fluorescencia, como anteriormente se ha descrito para detectar dicha acumulación en regiones específicas del cerebro, posterior a inyecciones i.c.v. de A $\beta$ Os (Forny-Germano, L 2014).

Interesantemente el deterioro cognitivo se vio acompañado por la disminución del contenido proteico de RyR2 (Figura 7), hallazgo que concuerda

con observaciones provenientes de modelos *in vitro*, establecidos en nuestro laboratorio, donde señalan que la adición de A $\beta$ O<sub>s</sub> en concentraciones sub-letales disminuye el contenido de RNAm y de proteína RyR2 en cultivos primarios de neuronas hipocampales (Paula-Lima, A y col. 2011). Asimismo, al analizar tejido post-mortem de pacientes en las etapas finales de la EA (V-VI) se ha observado una disminución del RNAm y de proteína RyR2 (Kelliher, M y col. 1999). Sin embargo, existe contradicción respecto a la expresión de RyR en los modelos de EA, posiblemente debido a la variable regulación de RyR durante el desarrollo de la enfermedad y las diferencias entre las áreas del cerebro (Del Prete, D y col. 2014).

Adicionalmente y para validar nuestro modelo experimental de la EA, decidimos identificar mediante inmuno-fluorescencia la presencia de A $\beta$ O<sub>s</sub> en la región del hipocampo donde se realizaron las inyecciones, CA3, (**Figura 9**), encontrando acumulación de A $\beta$ O<sub>s</sub> en el cuerpo dendrítico de las neuronas piramidales de CA3, de manera similar a otros trabajos donde se produce acumulación de A $\beta$ O<sub>s</sub> en regiones específicas del cerebro posterior a inyecciones de A $\beta$ O<sub>s</sub> (Forny-Germano, L 2014). Por otro lado, es conocido que procesos cognitivos tales como el aprendizaje y memoria involucran actividad neuronal capaz de generar activación de genes de expresión temprana, tales como c-Fos (Hoffman y col. 1993, Cirelli, C. y Tononi, G, 2000), por lo cual la identificación de su forma proteica resulta un excelente marcador, para validar que el deterioro cognitivo observado a nivel conductual es producto de un déficit en la actividad neuronal producto de la inyección de A $\beta$ O<sub>s</sub> en las neuronas piramidales de CA3. Los resultados, presentados en la Figura 10, muestran una disminución significativa respecto al nivel de expresión de c-Fos no solamente en la región de CA3, también en las regiones CA1 y GD del hipocampo, lo que revela que la inyección en CA3 produce un efecto generalizado del deterioro en la actividad neuronal en el hipocampo.

En conjunto, los resultados indican que la adición de A $\beta$ O<sub>s</sub> mediante inyecciones bilaterales e intra-hipocampales permitió desarrollar un modelo

murino agudo de la EA, presentando deterioro cognitivo a nivel de aprendizaje, evaluado en la tarea dependiente de hipocampo *Oasis maze*, acompañado de una disminución significativa en los niveles de expresión de la forma proteica del canal RyR2, sin cambios en la expresión del canal RyR3. Adicionalmente, nuestro modelo evidenció acumulación de A $\beta$ O<sub>s</sub> en las neuronas hipocampales de CA3 y una disminución significativa en los niveles de expresión de c-Fos, utilizado como marcador de actividad neuronal, lo que indica una relación entre la acumulación de A $\beta$ O<sub>s</sub>, el deterioro en la actividad neuronal y la pérdida o déficit en las funciones cognitivas como el aprendizaje, con la disminución en la expresión del canal RyR2. Estas alteraciones, deben ser estudiadas en mayor detalle, sin embargo apoyan la idea presentada por otros trabajos, que destacan la importancia del canal RyR (Ferreiro, E. y col. 2004, Del Prete, D. 2014), mediando señales de calcio provenientes del ER, en los procesos de plasticidad sináptica que subyacen al aprendizaje y memoria dependiente de hipocampo (Kelliher, M y col. 1999, Zhao, W. y col. 2000, Adasme, T. y col. 2011).

Posteriormente decidimos evaluar directamente si la modulación negativa de la expresión de RyR2 *in vivo*, utilizando una secuencia de oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2, afecta los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria. El desarrollo de un modelo *knock-down* para RyR2 fue el paso inicial para evaluar su participación en los procesos de memoria. Para ello realizamos inyecciones intra-hipocampales de secuencias de oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2 en la región de CA1.

Adicionalmente se ajustó el protocolo conductual, con el fin de evaluar la memoria más remota hipocampal, considerando datos previos obtenidos en el laboratorio, que evidencian aumentos del contenido proteico de RyR2 tras la generación de LTP inducida por un protocolo de TBS (*Theta burst stimulation*)(Datos no publicados, Unidad de Investigación More, J) y que en presencia de concentraciones inhibitorias de Ryanodina para inhibir el canal RyR, no se genera LTP (Datos no publicados, tesis de Doctorado Valdés, Ismael.). Estos hallazgos sugieren la participación del canal RyR en los

procesos de plasticidad sináptica asociados a la memoria hipocampal, por lo cual fue utilizada una nueva configuración de la tarea *Oasis maze* en este modelo experimental, con el fin de evaluar la memoria dependiente de hipocampo.

Al evaluar conductualmente el modelo *knock-down* para RyR2, observamos un aumento en el número de errores y en la razón entre la distancia observada/esperada (Figuras 9 y 10), posterior a las primeras 3 sesiones en las que se evaluó la consolidación de la memoria, esto implica un deterioro cognitivo en la memoria de los animales. Los resultados demuestran que la *down-regulation* del canal RyR2 resulta deletérea para la mantención de la memoria, generando deterioro en esta habilidad, destacando el canal RyR2 como un elemento importante en la memoria. Esta idea que ha sido inicialmente propuesta en un estudio utilizando animales entrenados en la tarea de *Morris water maze*, los cuáles exhibieron un aumento en los niveles de RNAm de RyR2 asociado a la obtención de memoria (Zhao, W. y col. 2000, Adasme, T. y col. 2011) y en ratones *knock-down*, donde se ha demostrado que la disminución de RyR2 por inyección intra-cerebroventricular de oligonucleótidos anti-sentido, se correlaciona con una alteración de los procesos de memoria en una tarea de evitación pasiva (Galeotti, N. y col 2008). En nuestro modelo, realizamos la canulación en la región CA1, ya que ensayos de nuestro laboratorio de facilitación por pulso pareado en rebanadas de hipocampo, pre-incubadas con concentraciones inhibitorias de ryanodina que bloquean todas las isoformas de RyR, no indican cambios en la facilitación del pulso pareado, lo que sugiere que ryanodina estaría afectando principalmente el compartimiento post-sináptico del circuito CA3-CA1 del hipocampo (Datos no publicados, tesis Valdés, Ismael.), idea que se ve fuertemente apoyada con los datos presentados tras la inyección de oligonucleótidos anti-sentido en la región de CA1, responsables del deterioro en la memoria de tipo espacial.

Finalmente la cuantificación del contenido proteico de RyR2, señala la eficacia de la secuencia de oligonucleótido anti-sentido para disminuir

selectivamente esta isoforma, estableciendo cambios significativos respecto al contenido proteico de RyR2 en el grupo con inyecciones de secuencias *scrambled* (Figura 9 y Figura 15.A.). Respecto al contenido proteico de RyR3, no se observaron diferencias significativas en comparación con los controles (Figura 12 y Figura 15.B.), lo que refleja una especificidad de las secuencias de oligonucleótidos utilizados, para disminuir de forma específica los niveles de expresión de la forma proteica de RyR2.

Cabe destacar que la participación de RyR3 se ha vinculado principalmente con la actividad locomotora y el comportamiento social, donde modelos *knock-out* para RyR3 exhiben hiperactividad, disminución de la interacción social, leve daño en la inhibición de pre-pulso e inhibición latente, sin anomalías significativas en las funciones motoras, de trabajo y test de memoria (Matsuo N. y col. 2009), alteraciones que no fueron observadas en nuestro modelo *knock-down* de RyR2.

Los resultados presentados muestran que las ratas inyectadas con A $\beta$ O<sub>s</sub> o secuencias oligonucleótidos anti-RyR2 exhiben una disminución en el contenido proteico de RyR2, sin alteración en los niveles de proteína de RyR3. La disminución de proteína de RyR2 fue paralela al deterioro en el rendimiento de los animales en las tareas de aprendizaje y memoria. Estos resultados, en conjunto con datos de la literatura, sugieren que RyR2 es crucial para los procesos de aprendizaje y memoria espacial e implican que la deficiencia en la señalización de Ca<sup>2+</sup> dependiente de RyR puede contribuir al déficit de aprendizaje y memoria inducido por los A $\beta$ O<sub>s</sub> en la enfermedad de Alzheimer.

## 9. CONCLUSIONES

- Los resultados sugieren que RyR2 participa en los procesos de aprendizaje y memoria espacial e implican que la deficiente señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de RyR2, puede contribuir al déficit en el aprendizaje y memoria inducido por A $\beta$ Os.
- La inyección de los oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2 provoca la pérdida de la memoria espacial, en una tarea aprendida previamente. Esto sugiere que RyR2 es crucial para los procesos de memoria.
- Los resultados presentados muestran que las ratas inyectadas con A $\beta$ Os u oligonucleótidos anti-sentido anti-RyR2 exhiben una disminución en contenido de proteína de RyR2, sin alteración en los niveles de proteína RyR3.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

- Adasme, T., Haeger, P., Paula-Lima, A.C., Espinoza, I., Casas-Alarcon, M.M., Carrasco, M.A., and Hidalgo, C. (2011). Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 3029-3034.
- Bannerman, D.M., Matthews, P., Deacon, R.M., and Rawlins, J.N. (2004). Medial septal lesions mimic effects of both selective dorsal and ventral hippocampal lesions. *Behav Neurosci* 118, 1033-1041.
- Behnisch, T., and Reymann, K.G. (1995). Thapsigargin blocks long-term potentiation induced by weak, but not strong tetanisation in rat hippocampal CA1 neurons. *Neurosci Lett* 192, 185-188.
- Bengtson C. Peter, Eckehard H. Freitag, Weislogel Jan-Marek, Bading Hilmar. (2010) Nuclear Calcium Sensors Reveal that Repetition of Trains of Synaptic Stimuli Boosts Nuclear Calcium Signaling in CA1 Pyramidal Neurons. *Biophysical Journal*. 99:4066-4077
- Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21, 13-26.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: LTP in the hippocampus. *Nature* 361:31–39.
- Bruno, A., Huang, J., Bennett, D., Marr, R., Hastings, M., Stutzmann G. (2012). Altered Ryanodine Receptor Expression in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging*. 33(5).

- Burns, G.A., and Young, M.P. (2000). Analysis of the connectional organization of neural systems associated with the hippocampus in rats. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 55-70.
- Caroni, P., Donato, F., and Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat Rev Neurosci* 13, 478-490.
- Christensen, D., Thomsen, M., Mikkelsen, J. (2013). Reduced basal and novelty-induced levels of activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) and c-Fos mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 transgenic mice. *Neurochem. Int.* 63(1): 54-60.
- Cirelli, C. y Tononi G. (2000) On the functional significance of c-fos induction during the sleep-waking cycle. *Sleep* 23(4): 9-25.
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18-41.
- Clark K A, Collingridge GL. (1995) Synaptic potentiation of dual-component excitatory postsynaptic currents in the rat hippocampus. *J Physiol.* 482:39–52.
- Corkin, S., Amaral, D.G., Gonzalez, R.G., Johnson, K.A., and Hyman, B.T. (1997). H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 17, 3964-3979.
- Del Prete, D., Checler, F., Chami, M. (2014). Ryanodine receptors: physiological function and deregulation in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener*, 9, 1-15.
- Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira C (2004) Involvement of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide. *J Neurosci Res* 76:872– 880.

- Fujii, S. Matsumoto, M., Igarashi, K., Kato H., Mikoshiba K. (2000) Synaptic Plasticity in Hippocampal CA1 Neurons of Mice Lacking Type 1 Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptors. *Learn. Mem.* 7: 312-320
- Emptage N, Bliss TV, Fine A. (1999) Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron.* 22:115–124.
- Galeano P, Martino Adami PV, Do Carmo S, Blanco E, Rotondaro C, Capani F, Castaño EM, Cuello AC, Morelli L. (2014). Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. *Front Behav Neurosci.*, 8, 321.
- Galeotti, N., Quattrone, A., Vivoli, E., Norcini, M., Bartolini, A., and Ghelardini, C. (2008). Different involvement of type 1, 2, and 3 ryanodine receptors in memory processes. *Learning & Memory* 15, 315-323.
- Hertle DN, Yeckel MF. (2007). Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor isoforms and ryanodine receptor isoforms during maturation of the rat hippocampus. *Neuroscience.* 150:625–638.
- Hidalgo, C. (2004). Calcium signaling: a universal mechanism of cellular communication. *Biol Res* 37(4): 495.
- Hidalgo, C. (2005). Cross talk between Ca<sup>2+</sup> and redox signalling cascades in muscle and neurons through the combined activation of ryanodine receptors/Ca<sup>2+</sup> release channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 2237-2246.
- Huang, Y.Y., and Kandel, E.R. (1996). Modulation of both the early and the late phase of mossy fiber LTP by the activation of beta-adrenergic receptors. *Neuron* 16, 611-617.

- Huang, Y.Y., Nguyen, P.V., Abel, T., and Kandel, E.R. (1996). Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn Mem* 3, 74-85.
- Izquierdo, I., and Medina, J.H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68, 285-316.
- Kandel, E.R., and Schwartz, J.H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* 218, 433–443
- Knowlton, B., Squire, L. (1993). The learning of categories: Parallel Brain Systems for Item Memory and Category Knowledge. *Science*. 262: 1747-1749.
- Kubie John L., Sutherland Robertj., Muller Robert U. (1999). Hippocampal lesions produce a temporally graded retrograde amnesia on a dry version of the Morris swimming task. *Psychobiology*. 27(3): 313-330
- Kelliher, M., Fastbom, J., Cowburn, RF., Bonkale, W., Ohm, TG., Ravid, R., Sorrentino, V., O'Neill, C. 1999. Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and beta-amyloid pathologies. *Neuroscience.*, 92(2), 499-513.
- Knowlton B. y Fanselowt, M (1998). The hippocampus, consolidation and on-line memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8(2):293-6.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8, 499-509.
- Liu J, Supnet C, Sun S, Zhang H, Good L, Popugaeva E, Bezprozvanny I. (2014). The role of ryanodine receptor type 3 in a mouse model of Alzheimer disease. *Channels (Austin)*. ;8(3):230-42.

- Lu, Y.F., and Hawkins, R.D. (2002). Ryanodine receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurophysiol* 88, 1270-1278.
- Matsuo, N., Tanda, K., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Toyama, K., Takao, K., Takeshima, H., Miyakawa, T. (2009). Comprehensive behavioral phenotyping of ryanodine receptor type 3 (RyR3) knockout mice: decreased social contact duration in two social interaction tests. *Front Behav Neurosci.* 3, 1-13.
- Milner, B. Squire, L. Kandel, E. (1998). *Cognitive Neuroscience and the Study of Memory Neuron.* 20: 445–468.
- Miller Earl Cohen K. D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:167–202.
- Mori, F., Fukaya, M., Abe, H., Wakabayashi, K. Watanabe. M. (2000). Developmental changes in expression of the three ryanodine receptor mRNAs in the mouse brain. *Neuroscience. Letter.* 285 (1): 57-60.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- Oulès B, Del Prete D, Greco B, Zhang X, [Lauritzen J](#), Sevalle J, Moreno S, Paterlini-Bréchet P, Trebak, M, Checler, F., Benfenati, F., Chami, M. (2012) Ryanodine receptor blockade reduces amyloid- $\beta$  load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease. *J Neurosci.* 32(34):11820-34.
- Paula-Lima, A.C., Adasme, T., SanMartín, C., Sebollela, A., Hetz, C., Carrasco, M.A., Ferreira, S.T., and Hidalgo, C. (2011). Amyloid  $\beta$ -Peptide Oligomers Stimulate RyR-Mediated Ca<sup>2+</sup>Release Inducing Mitochondrial Fragmentation in Hippocampal Neurons and Prevent RyR-Mediated Dendritic

Spine Remodeling Produced by BDNF. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 1209-1223.

➤ Petravicz, J., Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2008). Loss of IP3 receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *J Neurosci* 28, 4967-4973.

➤ Querfurth HW, Jiang J, Geiger JD, Selkoe DJ (1997) Caffeine stimulates amyloid beta-peptide release from beta-amyloid precursor proteintransfected HEK293 cells. *J Neurochem* 69:1580 –1591.

➤ Rempel-Clower, N., Zola, S., Squire L., Amaral D. (1996). Three Cases of Enduring Memory Impairment after Bilateral Damage Limited to the Hippocampal Formation. *The Journal of Neuroscience*, 16 (16):5233–5255

➤ Sayer RJ, Friedlander MJ, Redman SJ. (1990) The time course and amplitude of EPSPs evoked at synapses between pairs of CA3/CA1 neurons in the hippocampal slice. *J Neurosci.* ;10:826–836.

➤ Schimanski, L.A., Lipa, P., and Barnes, C.A. (2013). Tracking the Course of Hippocampal Representations during Learning: When Is the Map Required? *Journal of Neuroscience* 33, 3094-3106.

➤ Scoville WB, Milner B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry.* 20:11–21.

➤ Squire L., Zola, S. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 13515–13522.

➤ Stutzmann, G.E., Smith, I., Caccamo, A., Oddo, S., Laferla, F.M., and Parker, I. (2006). Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca<sup>2+</sup> disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 26, 5180-5189.

- Supnet C, Grant J, Kong H, Westaway D, Mayne M. (2006) Amyloid-beta-(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function in neurons of TgCRND8 mice. *J Biol Chem.* 281(50):38440-7.
- Supnet C, Bezprozvanny I. (2010). The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell Calcium.* 47(2):183-9.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, BearMF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313: 1093–1097.
- Zalk, R., Lehnart, S.E., and Marks, A.R. (2007). Modulation of the Ryanodine Receptor and Intracellular Calcium. *Annual Review of Biochemistry* 76, 367-385.
- Zhao, W., Meiri, N., Xu, H., Cavallaro, S., Quattrone, A., Zhang, L., and Alkon, D.L. (2000). Spatial learning induced changes in expression of the ryanodine type II receptor in the rat hippocampus. *FASEB J* 14, 290-300.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6:2950 –2967.