

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***“PARTICIPACIÓN DE LAS SEÑALES DE Ca^{2+} NUCLEARES EN
LA EXPRESIÓN GÉNICA DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD
NEURONAL HIPOCAMPAL Y EN LA SINAPTOTOXICIDAD DEL
PEPTIDO BETA AMILOIDE”***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctor en Farmacología por:

Pedro Elizardo Lobos Zambrano

Directoras de Tesis: Dra. Andrea Paula-Lima
Dra. M. Cecilia Hidalgo

Santiago-CHILE

Diciembre 2021

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Pedro Elizardo Lobos Zambrano

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dra. M. Cecilia Hidalgo _____

Co-director de Tesis:

Dra. Andrea Paula-Lima _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Pablo Caviedes _____

Dra. Paola Morales _____

Dra. María Isabel Behrens _____

Dra. Rommy von Bernhardi _____

Agradecimientos

*“La lucha por medir el cielo ha sido ganada, pero los ciudadanos del mundo siguen siendo derrotadas día a día en la lucha por conseguir el pan de sus hijos. Y la ciencia debe ocuparse de esas dos luchas por igual. Una Humanidad que se debate en las tinieblas de la superstición y la mentira, y es demasiado ignorante para desarrollar sus propias fuerzas, no será capaz tampoco de dominar las fuerzas de la naturaleza, que Uds. Los científicos descubren y le revelan. (...) ¿Con qué objetivos trabajan ustedes? **Mi opinión es que el único fin de la ciencia consiste en aliviar la miseria de la existencia humana.** Si los científicos se dejan atemorizar por los tiranos y se limitan a acumular conocimientos por el conocimiento mismo, la ciencia se convertirá en un inválido y las nuevas máquinas sólo servirán para producir nuevas calamidades. Tal vez, con el tiempo, ustedes lleguen a descubrir todo lo que hay para descubrir, pero ese progreso sólo los alejará más y más de la Humanidad. Y el abismo entre ella y ustedes, los científicos, puede llegar a ser tan profundo que cuando griten de felicidad ante algún nuevo descubrimiento, el eco les devolverá un alarido de espanto universal.”*

Extracto de Galileo Galilei por Bertolt Brecht

En las siguientes líneas quisiera agradecer a todos aquellos que, me han ayudado a emprender este trabajo

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

A la comisión revisora, Dr. Pablo Caviedes, Dra. Paola Morales, Dra. María Isabel Behrens, Dra. Romy Von Bernhardi por sus aportes , comentarios y correcciones de este escrito.

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

A Barbara Bruna y su familia, mi hermosa compañera de quién he aprendido y compartido en tantos momentos bonitos y maravillosos durante toda esta etapa, quien me ha acompañado y brindado más de lo que puedo retribuir y que ha traído la verdadera felicidad a mi vida.

A todos los integrantes del laboratorio de Transducción de Señales Medidas por Calcio, Laboratorio de Biología Molecular y Celular, REDECA y muchas personas que estas líneas no hacen justicia, entre ellos:

Cecilia Hidalgo
Andrea Paula-Lima
John Alex Córdova
Omar A. Ramírez
Ignacio Vega
Mauricio Cerda
Steffen Härtel
Jorge Toledo
Manuel Estrada
Genaro Barrientos
Paola Llanos
Jorge Hidalgo
Tatiana Adasme
Barbara Bruna
Jamileth More
Nicole Henríquez
Alejandro Luarte
Francisco Fuentealba
Silvia Gleitze
José L Galaz
Luis Montecinos
Virginia Sánchez

Este trabajo fue realizado con el apoyo de ANID Beca doctorado 21161086; BNI-09-015F; FONDECYT 1170053; 1150736; 3120093; FONDEQUIP EQM14015

Índice

Resumen	7
Abstract	8
1. INTRODUCCION	9
Descubriendo los mecanismos de la plasticidad sináptica: desde los primeros dibujos a la microscopía avanzada	9
Desde las espinas dendríticas al núcleo: breve repaso de estudios de una comunicación fundamental para la actividad neuronal.....	10
El mensajero apropiado: La universalidad de las señales de Ca²⁺.....	11
Las neuronas, células especializadas en producción de señales de Ca²⁺.....	13
El mensajero llega al núcleo, producción de señales de Ca²⁺ en el núcleo.....	15
Acerca de la necesidad de mecanismos activos de propagación de señales de Ca²⁺ al núcleo: El papel del retículo endoplásmico.....	16
El receptor de ryanodina (RyR) y la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺.....	16
Incremento de actividad neuronal e inducción de genes de respuesta temprana, rol de Npas4.....	18
Bases celulares y moleculares involucradas en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer (EA).....	20
De placas a sinaptotoxinas: Los oligómeros solubles del péptido β-amiloide (AβOs).....	21
Alternativas farmacológicas para tratar la enfermedad de Alzheimer y el daño cognitivo.....	24
2. HIPOTESIS	26
3. OBJETIVO GENERAL	26
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6. RESULTADOS	33
1.-Detección y caracterización de señales de Ca²⁺ nucleares inducidos por la estimulación eléctrica de campo en cultivo primario de neuronas hipocampales.....	33
2. La liberación de Ca²⁺ mediada por los canales RyR contribuye a la señal de Ca²⁺ nuclear inducida por la estimulación eléctrica de campo.....	35
3.- Detección y caracterización de señales Ca²⁺ nucleares inducidas por antagonismo de GABA_A R en cultivo primario de neuronas hipocampales.....	39
4.- La liberación de Ca²⁺ mediada por los Receptores de Ryanodina contribuye a la señal de Ca²⁺ nuclear inducida por Gabacina en neuronas hipocampales.....	41
5.-Los AβOs alteran los transitorios de Ca²⁺ en el núcleo inducidos por aumento de actividad sináptica.....	44
6.-El tratamiento con Gabacina induce un aumento en la actividad neuronal que desencadena la activación e inducción de genes de respuesta temprana y de enzimas antioxidantes.....	47
7.-La liberación de Ca²⁺ mediada por los canales RyR contribuyen a la activación de CREB y al aumento del mRNA de Npas4 y RyR2 inducido por aumento de la actividad neuronal.....	50
8.- El tratamiento con AβOs disminuye la fosforilación de CREB y previene el incremento en los niveles de mRNA de Npas4, Bdnf, GCL y Nqo1 inducidos por el incremento de la actividad sináptica causado por GBZ.....	53

7. Conclusiones	56
8. Discusión	57
Contribución de la liberación de Ca²⁺ mediada por RyR en la comunicación entre sinapsis y la producción de señales de Ca²⁺ núcleo.	57
Contribución conjunta de los canales de la membrana plasmática mGluR, NMDAr y VGCC en la propagación de la señales de Ca²⁺ al núcleo.	58
Contribución de la isoforma RyR2 a la propagación de la señal de Ca²⁺ al núcleo y control de la actividad neuronal.	60
Contribución de los canales RyR a la expresión génica dependiente de actividad sináptica. Papel de la activación de CREB, Npas4 y Bdnf.	62
Relevancia de las señales de Ca²⁺ nucleares en la sinaptotoxicidad asociada al péptido β-amiloide y a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.	64
Contribución de los canales RyR al control de la actividad y regulación homeostática de las redes neuronales; implicancias en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.	65
Interrupción de la activación neuroprotectora antioxidante por la sinaptotoxicidad asociado al péptido β-amiloide.	67
9.-Bibliografía	69
10.-Anexo	77
Publicaciones derivadas del trabajo de tesis	77
Presentaciones en Congresos	78

Resumen

La comunicación sinapsis-núcleo es fundamental para la adecuada integración de los estímulos sinápticos que constantemente reciben las neuronas, y que resultan tanto en cambios en la estructura y la función de las espinas dendríticas como en la activación de programas de remodelación global. Gran parte de esto se logra a través de la activación de vías de señalización mediadas por el ion Ca^{2+} , que iniciadas en las sinapsis y espinas dendríticas, desembocan en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el núcleo, donde inducen la expresión de programas de expresión génica. El tratamiento con oligómeros solubles del péptido β -amiloide ($\text{A}\beta\text{Os}$), consideradas las principales sinaptotoxinas que median la enfermedad de Alzheimer, induce estrés oxidativo y señales aberrantes de Ca^{2+} , que interrumpen los procesos de plasticidad sináptica. Sin embargo, no se ha descrito si los $\text{A}\beta\text{Os}$ están implicados en la propagación y en los efectos de las señales de Ca^{2+} nucleares.

En este trabajo de tesis se estudió el efecto del tratamiento con los $\text{A}\beta\text{Os}$ y la contribución de la liberación de Ca^{2+} a través de los canales Receptores de Ryanodina (RyR), en la producción de señales de Ca^{2+} en el núcleo y en los cambios en la expresión de genes inducidos por el incremento de actividad neuronal. Se encontró que el tratamiento con Ryanodina en concentraciones inhibitorias, que suprimen la actividad de los canales RyR, así como el silenciamiento de su isoforma 2 (RyR2), disminuyeron significativamente el aumento de Ca^{2+} nuclear inducido por protocolos de estimulación eléctrica de campo. Además, tanto la incubación con $\text{A}\beta\text{Os}$ por 6 horas o con Ryanodina en concentraciones inhibitorias disminuyeron la producción de transitorios de Ca^{2+} nucleares, la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta a adenosina monofosfato cíclico (CREB), la expresión de la proteína neuronal de dominio Per Arnt Sim 4 (Npas4) y del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y de las enzimas antioxidantes glutatión cisteína ligasa (GCL) y NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) inducidas por el incremento de actividad sináptica con Gabazina. En conclusión, se propone que la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) mediada por los canales RyR, representa un mecanismo de amplificación y propagación de la señal para lograr la comunicación espacial y funcional entre actividad neuronal y la expresión génica. Estos procesos serían alterados por los $\text{A}\beta\text{Os}$, desencadenando la interrupción de la expresión de genes de respuesta temprana y de enzimas antioxidante, con potenciales efectos en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Abstract

Postsynaptic Ca^{2+} signals generated in spines, dendrites, or the soma by neuronal stimulation can reach the nucleus, where they exert a key role in the fast activation of transcription factors and the expression of genes, including neurotrophins and antioxidant enzymes that are implicated in a wide range of neuronal processes, such as synaptic plasticity, learning, and memory. Soluble Amyloid-beta oligomers ($\text{A}\beta\text{Os}$) are synaptotoxins that disrupt excitatory glutamate neurotransmission and generate aberrant Ca^{2+} signals; however, their effects on activity-generated nuclear Ca^{2+} signals have not been reported.

In this work, we present the inhibitory effects of suppressing Ca^{2+} release mediated by the Ryanodine Receptor channel type-2 isoform (RyR2) and of $\text{A}\beta\text{Os}$ treatment on the production of Ca^{2+} signals in the nucleus induced by the addition of the GABA(A) receptor blocker gabazine (GBZ) to primary hippocampal neurons. We also show that suppression of RyR-mediated Ca^{2+} release significantly reduced the increase in CREB phosphorylation and Npas4 and RyR2 mRNA expression induced by GBZ. Additionally, $\text{A}\beta\text{Os}$ addition reduced the enhanced CREB phosphorylation and diminished the increased mRNA levels of Npas4, BDNF, and the antioxidant enzymes Glutamate-Cysteine-Ligase and NADPH-Quinone-Oxidoreductase induced by GBZ.

Based on these results, it is proposed that RyR-mediated Ca^{2+} release induced by neuronal activity plays a central role in activity-dependent transcription required for synaptic plasticity and memory processes. It is also proposed that $\text{A}\beta\text{Os}$ treatment disrupts nuclear Ca^{2+} signals generated by neuronal activity, leading to a disruption of neuroprotective gene expression pathways and thus contributing to the progression of neurodegenerative diseases.

1. INTRODUCCION

Descubriendo los mecanismos de la plasticidad sináptica: desde los primeros dibujos a la microscopía avanzada

Desde los comienzos del estudio del cerebro la observación de su intrincada y complicada estructura suscitó variadas hipótesis de como esta organización y sus componentes podrían dar lugar a tan importantes y complejas funciones. Sorprendentemente, Santiago Ramon y Cajal hace más de 100 años ya especulaba acerca de las neuronas; a través del análisis sistemático y detallado de preparaciones de cortes de cerebro postuló que las protuberancias dendríticas observadas, ahora conocidas como espinas dendríticas, correspondían a los puntos de contacto entre dos neuronas y que, al salir del eje dendrítico podrían facilitar las conexiones con axones de muy diversas fuentes (Sotelo, 2003; Mayford et al., 2012). Sin embargo, no fue hasta el advenimiento de las técnicas más avanzadas de microscopia y biología molecular que se han empezado a dilucidar los mecanismos básicos y moleculares que controlan estas estructuras y la actividad neuronal en su conjunto (Berry and Nedivi, 2017). En particular, el avance de las técnicas de microscopía de fluorescencia de superresolución permite hoy en día la observación directa y a escala nanométrica de estos procesos, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, ampliando y acelerando el desarrollo vertiginoso del estudio de la neurociencia moderna (Werner et al., 2021). Como ejemplo, en un trabajo reciente se logró realizar un análisis exhaustivo de botones sinápticos, ahondando no sólo en detalles de la abundancia relativa y distribución espacial de las principales proteínas sinápticas sino que además se logró por primera vez una modelación de la movilidad y de la dinámica de ellas en su conjunto (Reshetniak et al., 2020)

En términos generales, los procesos celulares y moleculares que participan en la construcción de esta capacidad de las neuronas para cambiar y adaptarse en base a nuevas experiencias adquiridas son conocidos como plasticidad sináptica. Ésta se inicia localmente en las sinapsis que unen a dos neuronas (junto a las células gliales que la modulan) y, en última instancia, modifica inclusive lo que clásicamente era considerado como esencia de lo inmutable, el ADN y sus mecanismos de expresión génica (West and Greenberg, 2011). Los mediadores básicos de estos procesos corresponden a una multitud de factores y enzimas que representan la divergencia evolutiva de zonas y vías de señalización molecular, específicamente adaptadas y en constante cambio de acuerdo a las necesidades cognitivas características del ser humano, pero íntimamente

compartidas con todos los mamíferos, y presente, de diferentes maneras, en todos los seres vivos (Kandel et al., 2014; Hardingham et al., 2018).

Desde las espinas dendríticas al núcleo: breve repaso de estudios de una comunicación fundamental para la actividad neuronal.

Las particularidades de la morfología neuronal exigen que las neuronas mantengan una sofisticada pero fluida comunicación entre sus diferentes compartimentos subcelulares (Terenzio et al., 2017). Esto es particularmente importante para mantener la adecuada comunicación entre la información codificada en las sinapsis y el núcleo neuronal, de tal manera de traducir esto en cambios efectivos a corto y largo plazo. Estos procesos pueden ser resumidos como el “diálogo entre sinapsis y genes” como fuera elegantemente expresado por Kandel en su discurso de recibimiento del premio nobel (Kandel, 2002). El papel fundamental de la adecuada señalización entre la sinapsis y el núcleo ha sido demostrado en distintos modelos y organismos y forma parte de procesos celulares esenciales, como la generación de ritmos circadianos, el control metabólico y energético, además de contribuir a la supervivencia neuronal y al desarrollo de la memoria a largo plazo (Bading, 2013a; Hagenston et al., 2019). Asimismo, su desregulación se asocia a el desarrollo de enfermedades del neurodesarrollo y patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (Marcello et al., 2018a).

Las espinas dendríticas de las neuronas corticales e hipocampales muestran una extraordinaria plasticidad estructural. Tal es así que los protocolos de estimulación que inducen potenciación a largo plazo (LTP) o depresión a largo plazo (LTD) *ex vivo*, así como el aprendizaje espacial y la exposición a ambientes enriquecidos *in vivo*, alteran tanto el número, la forma y la composición subcelular de las espinas, aumentando o disminuyendo la disponibilidad de receptores en la membrana para realizar los ajustes necesarios en la eficacia sináptica (Bourne and Harris, 2008). Hoy sabemos que las espinas dendríticas son lugares altamente especializados, cuya función es integrar y distinguir entre la variedad de estímulos que reciben las neuronas. Estos estímulos pueden provenir de sitios altamente localizados a través de sinapsis excitatorias glutamatérgicas que generan potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) locales, o de estímulos globales provenientes de potenciales de acción (APs) generados por la actividad neuronal, que invaden las espinas como potenciales de acción retro-propagados (bAPs) (Heinz and Bloodgood, 2020). Las

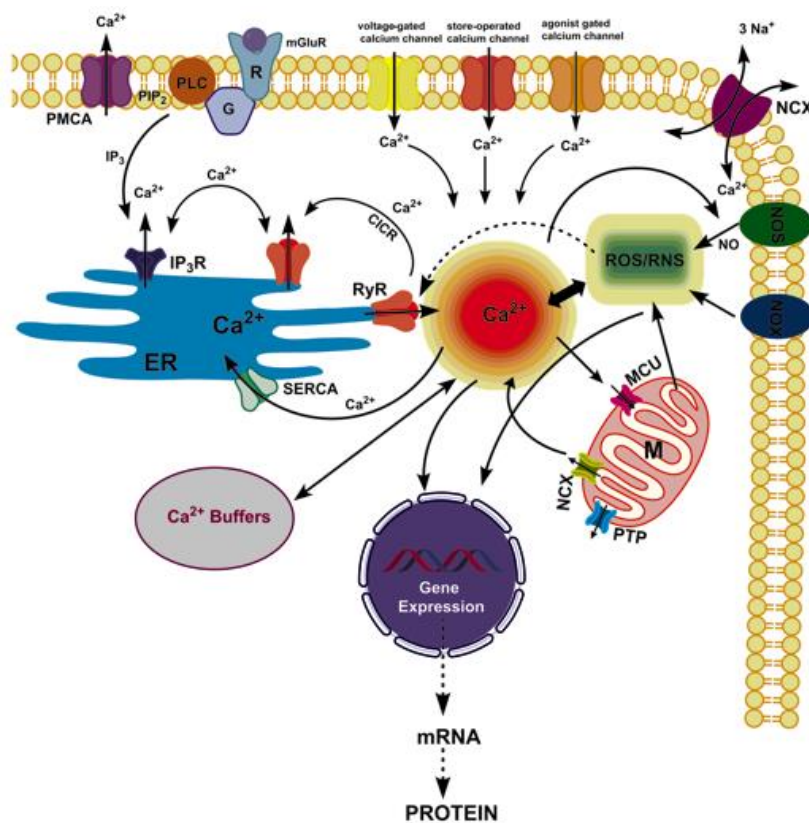
espinas dendríticas se comportan como un compartimento eléctrico aislado con propiedades biofísicas particulares que les permiten aislar e integrar de manera diferencial los EPSPs y los bAPs, lo que repercute en la respuesta funcional que estos generen (Kwon et al., 2017; Holler et al., 2021). Sin embargo, para que estos procesos se conserven a mediano y largo plazo la información contenida en las sinapsis debe comunicarse al núcleo neuronal.

El control y la conservación de la comunicación sinapsis-núcleo está a cargo de una red especializada de sensores y efectores cuya expresión y actividad se adapta constantemente de acuerdo a los estímulos neuroquímicos y eléctricos que recibe la neurona, organizándose en diversas pero universales vías de señalización celular ampliamente estudiadas (Greer and Greenberg, 2008; Jordan and Kreutz, 2009; Herbst and Martin, 2017). La transferencia de información al núcleo se transmite mediante la translocación física de mensajeros en varias etapas, que se ponen en marcha tras el estímulo inicial en la sinapsis. La naturaleza de los iniciadores, transductores y amplificadores de señales presentes en las espinas dendríticas, así como de sensores y efectores específicos en el núcleo se ha determinado en profundidad en las últimas décadas e involucra segundos mensajeros como Ca^{2+} y adenosina monofosfato cíclico (AMPC), además de una variedad de proteínas quinasas y fosfatasas, las cuales en ultimo termino modulan la maquinaria de expresión génica a través de la regulación de la actividad de factores de transcripción y de cambios epigenéticos (Deisseroth et al., 2003). Entre la multitud de mediadores que participan en este importante diálogo, las neuronas han desarrollado mecanismos sumamente sofisticados para controlar los cambios en la concentración de Ca^{2+} tanto a nivel local en las espinas dendríticas como en los compartimentos somáticos y nucleares, convirtiendo a este elemento en uno de los principales segundos mensajeros intracelulares (Hardingham et al., 1997).

El mensajero apropiado: La universalidad de las señales de Ca^{2+} .

La conversión efectiva de los estímulos sinápticos en respuestas transcripcionales en el núcleo requiere de la presencia de un mensajero intracelular versátil, que actúe con la adecuada rapidez, amplitud y especificidad espacial y temporal que impone esta comunicación. Las señales de Ca^{2+} parecen cumplir estos requisitos como ningún otro mensajero celular (Berridge et al., 2000). En reposo todas las células mantienen una diferencia de aproximadamente 15.000 veces entre la $[Ca^{2+}]$ extracelular e intracelular (1,5 mM y 0,1 μ M respectivamente) (Berridge, 2006). Para lograr esta exquisita versatilidad las células poseen un conjunto de herramientas especializadas en el

manejo y movilización del Ca^{2+} intracelular, que se pueden clasificar en sensores, canales y bombas de entrada y eflujo de Ca^{2+} presentes ampliamente en la membrana plasmática, y especialmente en organelos como el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias (Esquema 1). En conjunto, todos ellos regulan la intensidad, frecuencia, localización subcelular y duración de las señales de Ca^{2+} , definidas como aumentos transitorios de la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma. Estas señales son de trascendental importancia para la ejecución de funciones celulares, como la exocitosis de vesículas, el metabolismo, la dinámica mitocondrial, el control del ciclo celular, la expresión génica y distintos procesos relacionados a la plasticidad sináptica (Berridge et al., 2003; Berridge, 2012).



Esquema 1.-Esquema general que muestra las entidades moleculares responsables de la generación de señales de Ca^{2+} intracelular y especies reactivas de oxígeno / especies reactivas de nitrógeno (ROS / RNS) en células neuronales.

Las señales de Ca^{2+} citoplásmico surgen de la entrada de Ca^{2+} en las células siguiendo su gradiente electroquímico. El calcio ingresa a las células por de la apertura inducida por la actividad de Canales de Ca^{2+} activados por voltaje (CaV), o canales activados por agonistas que se expresan en la membrana plasmática. Dependiendo del gradiente electroquímico de Na^+ + y Ca^{2+} , el intercambiador de Na^+ / Ca^{2+} de la membrana plasmática (NCX) contribuye también a

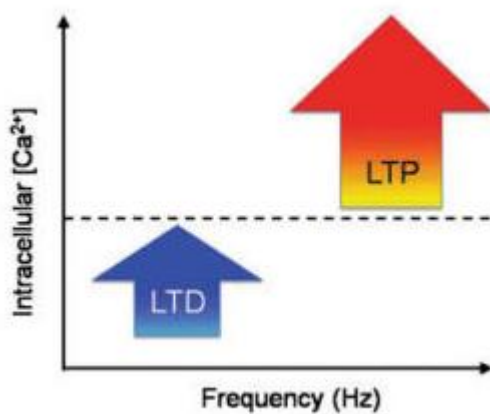
la entrada o eliminación de Ca^{2+} . La liberación de Ca^{2+} del RE a través del receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) (IP3R) y / o canales del receptor de ryanodina (RyR), así como la liberación de Ca^{2+} de las mitocondrias a través del NCX mitocondrial también contribuyen a las señales citoplásmicas de Ca^{2+} . La activación dependiente de agonistas de los receptores de glutamato metabotrópicos en la membrana plasmática (mGluR) promueve la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) por la fosfolipasa C (PLC), produciendo diacilglicerol (no mostrado) e IP3, que difunde y abre los canales IP3R residentes en el RE. Mediadas por RyR o IP3R, las señales de Ca^{2+} pueden estimular los canales vecinos a través del proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). Un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmático promueve la unión de Ca^{2+} a tampones citoplasmáticos de afinidades variables de Ca^{2+} , estimula la entrada de Ca^{2+} en el núcleo donde el Ca^{2+} promueve cambios en la expresión génica y, si es lo suficientemente alto, también induce la captación de Ca^{2+} en mitocondrias (M) a través del transportador mitocondrial (MCU). Las señales mitocondriales de Ca^{2+} estimulan la generación de ROS, mientras que la sobrecarga de Ca^{2+} puede estimular la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTP). Bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP, presente en la membrana plasmática (PMCA) y el RE (SERCA), eliminan activamente el Ca^{2+} al medio extracelular o al lumen del RE, respectivamente. Las señales citoplásmicas de Ca^{2+} también estimulan la NADPH oxidasa (NOX) de la membrana plasmática y la óxido nítrico sintasa (NOS), que generan ROS / RNS que pueden modificar distintos canales incluyendo los canales RyR, potenciando la CICR mediada por RyR.

Las neuronas, células especializadas en producción de señales de Ca^{2+} .

Las neuronas son células altamente especializadas, y por lo tanto, no es de extrañar que hayan desarrollado mecanismos distintivos para controlar la producción de las señales de Ca^{2+} . Estas señales contienen información codificada no sólo en la magnitud de la señal, sino en la variación espaciotemporal de la misma, provocando cambios rápidos o de larga duración, globales o en microdominios altamente especializados que comunican diferentes compartimentos subcelulares, como la membrana plasmática-con el RE (PM-ER, del inglés *plasma membrane-endoplasmic reticulum*), el RE con el Golgi, el RE con las Mitocondrias (MAMs, del inglés *mitochondrial associated membranes*), o el RE con la Envoltura nuclear. Cada uno de estos sitios de comunicación opera con su propio mecanismo, compuesto por microdominios especializados en controlar las señales de Ca^{2+} que allí se producen. Nuevas técnicas de microscopía de

fluorescencia permiten ahora estudiar y observar en detalle estos procesos a nivel molecular (Berridge, 2006; Carrasco and Hidalgo, 2006; Csordás et al., 2010).

Como hemos establecido, las dendritas son lugares que reciben e integran múltiples patrones de estimulación e inhibición desde las neuronas presinápticas; estos patrones se integran y se traducen en cambios en la dinámica espacio-temporal de las señales de Ca^{2+} , cuyo nivel de extensión puede ejercer efectos locales de remodelado sináptico o cambios globales que inducen la activación de vías específicas de transducción de señales dependientes de Ca^{2+} a nivel nuclear (Berridge, 1998; Bading, 2013b). La estimulación eléctrica de alta frecuencia genera patrones de señales de Ca^{2+} de limitada duración y relativamente alta amplitud que inducen la actividad de proteínas quinasas como Quinasas dependientes de Ca^{2+} /Calmodulina (CaMKII y CaMKIV y sus diferentes isoformas), Proteína quinasa A (PKA) o las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), que fortalecen la conectividad sináptica y participan en la inducción y mantención de la potenciación a largo plazo (LTP). En cambio, estímulos de baja frecuencia, que generan señales de Ca^{2+} de menor amplitud pero de mayor duración inducen la actividad de proteínas fosfatasas como la Calcineurina (CaN) o la Fosfatasa 1A (PP1A), que disminuyen la conectividad sináptica y participan en la inducción y mantención de la depresión de largo plazo (LTD) (Esquema 2). Ambas señales involucran diferentes respuestas en el núcleo que se expresan, respectivamente, como aumento o disminución en la activación de factores transcripcionales y, últimamente, en cambios en el contenido de proteínas sinápticas (Greer and Greenberg, 2008; Kandel et al., 2014).



Esquema 2.- **El nivel de los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]$ y la frecuencia de estimulación determinan el tipo de plasticidad sináptica (LTP / LTD).** La estimulación con frecuencias bajas, que además producen aumentos moderados, pero mas sostenidos en el tiempo en el $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplásmico, inducen la depresión a largo plazo (LTD); mientras que la estimulación de alta frecuencia genera aumentos más sustanciales, pero breves en la $[\text{Ca}^{2+}]$ que promueven la potenciación a largo plazo (LTP). Tanto LTD como LTP ocurren en respuesta a la activación dependiente de Ca^{2+} de cascadas de señalización celular específicas para cada proceso.

El mensajero llega al núcleo; producción de señales de Ca²⁺ en el núcleo.

Además de activar las cascadas de señalización en el citoplasma, el Ca²⁺ puede ingresar directamente al núcleo mediante difusión pasiva a través de los poros nucleares (Brini et al., 1993; Eder and Bading, 2007). Sin embargo, esta entrada requiere que el Ca²⁺ aumente en el entorno del núcleo, lo que no ocurre simplemente por difusión. Una vez en el núcleo, el Ca²⁺ puede contribuir a la transcripción dependiente de la actividad a través de su asociación con calmodulina (CaM), la fosforilación de la proteína de unión a CREB (CBP) que permite la formación del complejo CREB-CBP, pero también mediante la interacción directa con factores de transcripción sensibles a Ca²⁺, como el represor de la transcripción (Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator) DREAM (Mermelstein et al., 2001; Johenning and Holthoff, 2007). Las principales fuentes relacionadas con el aumento en el Ca²⁺ nuclear hasta ahora estudiadas, involucran la entrada de Ca²⁺ a través de canales de la membrana plasmática como el receptor de glutamato tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDAr) y canales de Ca²⁺ dependientes de Voltaje (VGCC o CaV) (Bengtson et al., 2010; Bading, 2013b). Al contrario, las fuentes intracelulares como el RE han sido menos consideradas en este proceso en neuronas, aunque exista bastante evidencia de su rol fundamental en procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje (Baker et al., 2013, Paula-Lima et al, 2014).

Las señales de Ca²⁺ nucleares inducidas por aumento de actividad sináptica regulan directa o indirectamente un gran pool de genes relacionados a la neuro-protección (Zhang et al., 2009) cuya regulación, con especificidades ligadas a cada especie, está conservada a lo largo de la evolución y se relaciona íntimamente con su capacidad cognitiva (Hardingham et al., 2018). Se ha demostrado, en distintos modelos, el rápido y eficiente acoplamiento existente entre un aumento de Ca²⁺ nuclear y la transcripción de genes esenciales rápidamente activados por la actividad neuronal (Yu et al., 2017). Los cambios en la expresión génica dependientes de Ca²⁺ nuclear se traducen en un remodelado de la estructura dendrítica y en cambios de la arborización neuronal, que son necesarios para los procesos de consolidación y extinción de la memoria (Hemstedt et al., 2017), así como su desregulación forma parte importante del inicio y desarrollo de patologías y procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (LaFerla, 2002).

Acerca de la necesidad de mecanismos activos de propagación de señales de Ca²⁺ al núcleo: El papel del retículo endoplásmico.

La particular morfología neuronal, con grandes distancias que separan las espinas dendríticas del soma y el núcleo en el contexto celular, exigen mecanismos especializados para lograr conectar funcionalmente ambos compartimentos, y **alcanzar [Ca²⁺] a nivel nuclear efectivas que permitan la activación de vías de transducción y regulación de la expresión génica.** Sin embargo, **las señales de Ca²⁺ son inherentemente locales; sin sistemas activos de amplificación y propagación su rango de acción en los cortos tiempos que requiere las señales celulares alcanza solo las décimas de micrones (0,1-0,5 μm),** antes de que el Ca²⁺ sea atrapado por proteínas de unión a Ca²⁺ o sea retirado del citoplasma por intercambiadores o bombas (Allbritton et al., 1992; Korkotian and Segal, 2006; Dickinson et al., 2016).

El RE, como fuente de Ca²⁺ intracelular y con su vasta presencia como red interconectada que invade todos los compartimentos neuronales, puede proveer amplificación y especificidad de las señales de Ca²⁺. Sin embargo, existen relativamente pocos trabajos que aborden la participación del RE en la dinámica de [Ca²⁺] en el contexto de la actividad sináptica. En un trabajo anterior (Okubo et al., 2015), utilizando células de Purkinje del cerebelo transfectadas con un indicador de Ca²⁺ codificado genéticamente con destinación al RE (G-CEPIA1er), se determinó que efectivamente la extensa red tubular del RE responde a estímulos de actividad sináptica, alterando las [Ca²⁺]_{RE} luminal con especificidad local y adaptándose de acuerdo a estímulos locales en espinas dendríticas. En otro trabajo se determinó que el contenido de Ca²⁺ en el RE a nivel axonal modula la liberación de neurotransmisores (de Juan-Sanz et al., 2017). También se ha demostrado la presencia, en distintos tipos celulares, de canales y bombas de Ca²⁺ en el propio núcleo, que son capaces de generar y modular señales de Ca²⁺ nucleares autónomas y/o en respuesta a señales citoplasmáticas (Oliveira et al., 2014). En otro trabajo (Reese and Kavalali, 2015) se demostró que los canales del RE participan activamente amplificando las señales de Ca²⁺ provenientes de la activación del receptor de NMDA y controlan las adaptaciones sinápticas homeostáticas ante protocolos de escalamiento sináptico.

El receptor de ryanodina (RyR) y la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺.

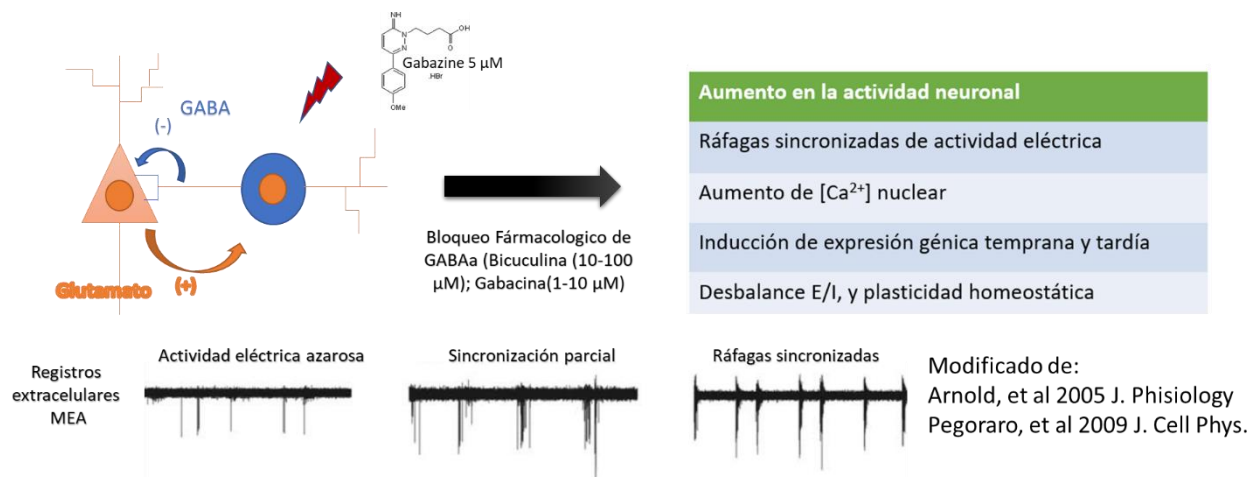
En mamíferos se expresan tres isoformas del canal RyR (RyR1, RyR2 y RyR3) y todas están presentes en el cerebro, siendo la isoforma 2 la más abundante en neuronas hipocampales (Adasme et al., 2011). El canal RyR media la liberación de Ca^{2+} desde el lumen del RE al citoplasma en respuesta a Ca^{2+} (su agonista fisiológico), de manera que permite amplificar y transmitir las señales de Ca^{2+} originadas desde otras fuentes intra o extracelulares (Zhao et al., 2000; Fill et al., 2002). Esto se realiza mediante la **liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR)**, que involucra la actividad cooperativa de las distintas isoformas del canal RyR y del canal Receptor de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3R), agrupados espacialmente en unidades de liberación (“clusters”), que provocan señales locales de gran amplitud (Baker et al., 2013).

Los canales RyR surgen naturalmente como un actor clave ya que en neuronas pueden funcionar como detectores coincidentes del aumento de Ca^{2+} y de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Riquelme et al., 2011), debido a la presencia de cisteínas que son modificadas cuando están presentes en un ambiente oxidado, lo que aumenta la respuesta del canal a Ca^{2+} (Marengo et al., 1998). Además, la actividad del receptor es modulada por otras especies celulares como la concentración de Mg^{2+} y ATP, los que en conjunto le otorgan un rol clave en la señalización redox y en la señalización mediada por Ca^{2+} (Bull et al., 2007; Riquelme et al., 2011). Las especies reactivas de oxígeno son un grupo de compuestos producidos por la oxidación o reducción del anión superóxido (O_2^-) en el contexto del metabolismo celular, o como producto de enzimas celulares. Entre los principales ROS se incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^*), todos los cuales desempeñan importantes roles en la fisiología celular (Drôge, 2002). Las señales de Ca^{2+} pueden ser controladas por producción local de ROS en microdominios presentes en la interfase mitocondria-RE, en los cuales las ROS mitocondriales pueden sensibilizar canales de Ca^{2+} del RE como el canal RyR o el canal IP3R (Booth et al., 2016), así como las señales de Ca^{2+} generadas por el RE pueden ser captadas por la mitocondria que genera más ROS (SanMartín et al., 2017). La expresión y modificaciones que experimenta el canal RyR2 en el envejecimiento producen anomalías en la señalización dependiente de Ca^{2+} que contribuyen al daño que ocurre durante el envejecimiento en la memoria espacial y procesos como LTP (Paula-Lima et al., 2014; Arias-Cavieres et al., 2017).

Incremento de actividad neuronal e inducción de genes de respuesta temprana, rol de Npas4.

El aumento de la actividad neuronal puede ser inducido farmacológicamente en cultivos primarios neuronales, mediante bloqueo del tono inhibitorio basal mediado por inter-neuronas gabaérgicas utilizando antagonistas competitivos del receptor GABA_A como la Gabacina o Bicuculina, que inducen la aparición de ráfagas sincronizadas de actividad eléctrica que permanecen durante varias horas (Arnold et al., 2005; Pegoraro et al., 2010). Estas ráfagas desencadenan señales de Ca²⁺ nucleares donde participan los receptores NMDA y los VGCC, que permiten el ingreso de Ca²⁺ a través de la membrana desde el medio extracelular (Bengtson et al., 2013). Es importante destacar que el aumento de actividad desencadenado por estos compuestos activa canales y receptores presentes en las sinapsis además de sitios extra-sinápticos o inclusive en dendritas y somas producto de la producción de potenciales de acción. Además el tratamiento con gabacina puede inducir un aumento en la liberación de glutamato que ha sido detectado con sensores fluorescentes de glutamato (Hasel et al., 2017). Estos efectos varían a corto, mediano y largo plazo, y se reflejan en cambios globales en la expresión génica y en la síntesis de nuevas proteínas, que remodelan varias propiedades neuronales, incluyendo cambios en la estructura de las neuronas (Schanzenbächer et al., 2018). Por ejemplo, recientemente se describió (Mohan et al., 2019), que el aumento de actividad sináptica inducido por el tratamiento con Gabacina regula la eliminación selectiva de espinas dendríticas, a través de la secreción dependiente de actividad de la proteína semaforina 3B (Sem3B).

Modelo farmacológico de aumento de actividad neuronal



Los circuitos locales del Hipocampo (CA3 o CA1) compuestos por las neuronas piramidales excitatorias e interneuronas inhibitorias generan oscilaciones Theta (4-10 Hz) y Gamma (20-40 Hz), responsables de la metaplasticidad que participan en los procesos de Aprendizaje y Memoria Espacial.

Esquema 3 .Modelo farmacológico de aumento de actividad neuronal. El tono excitaotrio/inhibitorio (E/I) de los cultivos primarios de neuronas hipocampales esta regulado por la actividad de neuronas piramidales excitatorias e interneuronas inhibitorias gabaergicas, la adicción del antagonista del receptor GABA(a) gabacina 5 μ M induce un aumento indirecto de la actividad de las neuronas excitatorias por la perdida de la inhibición. Este aumento de actividad se refleja en la aparicion de potenciales medidos por los registros extracelulares de microelectrodos (de izquierda a derecha: actividad antes de la adición de gabacina; actividad tras la adición de gabacina; rafagas sincronizadas generadas minutos despues de la adición de gabacina, datos modificados de referencias que se indican). Además el aumento de actividad se refleja en aumentos de la $[Ca^{2+}]$ en el nucleo, la iducción de expresión genica rapida y persistente, y desbalance E/I que activa los mecanismos de plasticidad homeostatica para retomar el equilibrio.

Los genes de respuesta inmediata temprana (IEG) son los primeros en activarse por aumento en la actividad neuronal y corresponden a la primera ola de transcripción génica, que luego resulta en la inducción de genes necesarios para la síntesis de nuevas proteínas y producen las funciones celulares específicas que remodelan la sinapsis. La mayoría de los IEG fueron descubiertos y han sido extensamente estudiados desde hace más de 20 años, e incluyen factores transcripcionales como cFos y Arc (Greer and Greenberg, 2008). Nuevos trabajos resaltan la especificidad que puede alcanzar la activación de los IEGs en distintos modelos, descubriéndose una particular selectividad regional en la activación de distintos factores que se activan y expresan en subconjuntos especiales de agrupaciones de neuronas relacionadas a la formación de experiencias (Gonzales et al., 2019).

Más recientemente se ha identificado a Npas4 como un nuevo factor transcripcional de respuesta temprana, que participa en los procesos de memoria y aprendizaje contextual en la región CA3 del hipocampo, y que a diferencia de otros IEG, se expresa únicamente en neuronas y es activado específicamente por actividad neuronal y señales de Ca^{2+} nuclear y no por factores de crecimiento y neurotrofinas añadidos exógenamente (Sun and Lin, 2016; Weng et al., 2018). El factor Npas4 participa en el control de la homeostasis de la actividad neuronal, controlando específicamente las sinapsis inhibitorias, mediante la inducción de genes río abajo como BDNF, que reestablecen el balance excitatorio/inhibitorio frente a un aumento en la actividad neuronal (Lin et al., 2008). El *Knock-out* de Npas4 disminuye el rendimiento en ensayos de memoria contextual; además disminuye la expresión de BDNF, Arc y c-Fos e interrumpe el balance excitatorio/inhibitorio, aumentando la liberación excitatoria presináptica, (Ramamoorthi et al., 2011).

Así, hoy entendemos que la transcripción génica inducida por actividad neuronal es fundamental para la conservación de una variedad de funciones neuronales adaptativas que incluyen la plasticidad estructural de las neuritas y las sinapsis, la activación de programas de neuroprotección, el aprendizaje y la memoria, así como procesos patológicos asociados al dolor crónico, la adicción y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Bading, 2013a; Hagenston et al., 2019)

Bases celulares y moleculares involucradas en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer (EA).

La enfermedad de Alzheimer, la forma más común de demencia en el mundo es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y fatal, que se manifiesta principalmente por graves alteraciones en procesos cognitivos y de memoria. El envejecimiento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad: cerca del 15% de los individuos sobre los 65 años la sufren y la prevalencia alcanza al 37% de la población de individuos sobre los 85 años (Alzheimer's Association, 2018). Durante el desarrollo de la enfermedad se produce un progresivo e irreversible proceso neurodegenerativo que se inicia desde temprano en regiones específicas del cerebro (Haass and Selkoe, 2007). Ubicado en el lóbulo temporal, el hipocampo es esencial para los procesos de aprendizaje y memoria, y es particularmente vulnerable a efectos neurotóxicos

asociados a distintas enfermedades del envejecimiento, incluyendo factores genéticos (Hibar et al., 2017), la obesidad, la diabetes y la hipertensión (Fotuhi et al., 2012), así como también es vulnerable a condiciones ambientales como traumas, contaminación ambiental y estrés (Younan et al., 2020). La atrofia del hipocampo es un indicio temprano de la conversión desde un proceso de envejecimiento normal, al desarrollo de daño cognitivo leve, demencias y enfermedades neurodegenerativas, y representa, por lo tanto, un tejido importante en el estudio de estas enfermedades (Leal and Yassa, 2015; Adler et al., 2018).

Los marcadores histopatológicos distintivos de la enfermedad de Alzheimer corresponden a la presencia de placas seniles extracelulares compuestas por la acumulación del péptido β -amiloide ($A\beta$) (Masters et al., 1985) y los ovillos neurofibrilares intracelulares compuestos por proteínas asociadas a microtúbulos (Tau) hiperfosforiladas (Grundke-Iqbal et al., 1986). Estos marcadores están presentes ampliamente en el hipocampo y en zonas de la corteza de cerebros de pacientes afectados con la enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down. El estudio del origen y las causas de la acumulación de estas proteínas ha centrado los esfuerzos en la búsqueda de los mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad que puedan propiciar los blancos para la generación de nuevas terapias, algunos de los cuales se encuentran en etapas clínicas avanzadas, aunque hasta ahora ninguno ha logrado modificar o revertir el curso de la enfermedad (Iqbal et al., 2016; Graham et al., 2017).

De placas a sinaptotoxinas: Los oligómeros solubles del péptido β -amiloide ($A\beta$ Os).

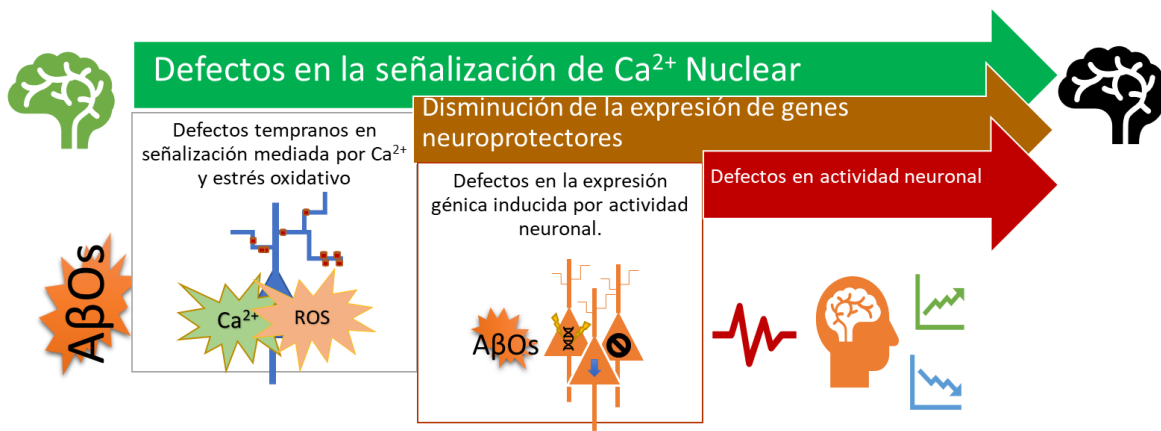
La hipótesis de la "cascada amiloide" establece que la acumulación y agregación del péptido $A\beta$ en las placas seniles conlleva a la muerte neuronal en las zonas del cerebro degeneradas en la enfermedad de Alzheimer (Selkoe, 1991). Sin embargo, en las últimas décadas varios análisis fallaron en mostrar una correlación directa entre la deposición de placas y la pérdida sináptica/neurítica en cerebros *postmortem* de pacientes con esta patología (Katzman et al., 1988). Para entender cuáles podrían ser los verdaderos causantes debemos profundizar brevemente acerca de los mecanismos de procesamiento y agregación del péptido $A\beta$ que preceden la aparición de las placas seniles.

El péptido A β es un péptido de 4 KDa que proviene de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP), realizado por el procesamiento anormal a cargo de la enzima β -secretasa y el complejo γ -secretasa. En medio acuoso los monómeros de A β rápidamente se unen entre sí, dando lugar a varios tipos de agregados, que incluyen los oligómeros de A β (A β O), protofibrillas y fibrillas amiloideas. Los A β O son los oligómeros solubles del péptido A β , y corresponden a agregados de bajo peso molecular que debido a su solubilidad pueden difundir en el cerebro y en el fluido cerebroespinal. Por otro lado, las fibrillas amiloides son de mayor tamaño e insolubles, y se agregan y depositan formando las placas seniles (Glabe, 2008; Ahmed et al., 2010). De esta manera los estudios de los últimos años han determinado que estos agregados, los A β O, por sobre las fibrillas, placas y agregados mayores son las principales neurotoxinas que desencadenan el daño sináptico y las fallas en los procesos cognitivos característicos de la enfermedad de Alzheimer (Haass and Selkoe, 2007), tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Forny-Germano et al., 2014; Jana et al., 2016). Además, recientemente se ha destacado la mayor neurotoxicidad de los agregados más pequeños de A β O (dímeros o trímeros, por ejemplo) en muestras *post-mortem* de cerebros humanos (Yang et al., 2017). La relación causal del péptido A β con la enfermedad de Alzheimer se ha corroborado recientemente en modelos quiméricos humano-ratón (neuronas humanas derivadas de células madre trasplantadas a ratones que sobreexpresan APP) que no presentaron cúmulos de la proteína Tau (Espuny-Camacho et al., 2017). Por lo tanto, la enfermedad de Alzheimer responde primeramente a una falla sináptica, desencadenada por los A β O, que conlleva al menoscabo progresivo de la memoria y la función cognitiva, debido al daño e interrupción de la actividad neuronal normal, que luego progresa hasta la muerte neuronal y la pérdida irreversible de las funciones cerebrales en las últimas etapas de la enfermedad (Ferreira et al., 2015; Strooper and Karran, 2016). Los A β O dañan la plasticidad sináptica inhibiendo la inducción de LTP y facilitando la inducción de LTD (Li et al., 2009). La interacción de los A β O con receptores de glutamato tipo NMDA puede generar excitotoxicidad, con la pérdida de la estructura y función sináptica (Paula-Lima et al., 2013).

Señalización mediada por Ca²⁺ y la enfermedad de Alzheimer. Papel de los canales RyR

En el inicio y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer se producen fallas en la homeostasis del Ca²⁺ y en las vías de señalización mediadas por Ca²⁺ (LaFerla, 2002). En muestras post-

mortem de pacientes con Alzheimer, la expresión de RyR2 se encuentra significativamente reducida temprano en el desarrollo de la enfermedad (Kelliher et al., 1999; Winding et al., 2016). Datos del laboratorio muestran que la incubación de cultivos de neuronas hipocampales con A β O s disminuye el contenido de proteína y la expresión del mRNA de RyR2, además los A β O s generan un aumento de los niveles de Ca $^{2+}$ citoplasmático neuronal, que es dependiente de la activación de los receptores NMDA y de la liberación intracelular de Ca $^{2+}$ a través de los canales RyR (Paula-Lima et al., 2011). La pre-incubación con el antioxidante N-acetilcisteína, NAC (precursor de glutatión) evita la emergencia de esta señal sostenida de Ca $^{2+}$, lo que pone en relieve la participación del estado oxidativo en el mantenimiento de la señal de Ca $^{2+}$ inducida por los A β O s (SanMartin et al., 2012). Inversamente, quelantes de Ca $^{2+}$ o inhibidores de canales de Ca $^{2+}$ intracelulares bloquean la generación de especies reactivas de oxígeno inducidas por los A β O s , poniendo de manifiesto la estrecha relación entre las ROS y las señales de Ca $^{2+}$ (De Felice et al., 2007; SanMartín et al., 2017). Existe entonces interdependencia cruzada entre estas vías de señalización, en donde los A β O s inducen señales de Ca $^{2+}$ dependientes de ROS, y también la generación de ROS depende de las señales de Ca $^{2+}$.



Esquema 4. Propuesta del rol de las señales aberrantes de Ca $^{2+}$ y producción de estrés oxidativo producidos por los A β O s en el inicio y Los A β O s producen señales aberrantes de Ca $^{2+}$ y especies reactivas del oxígeno (ROS) que son eventos tempranos en la cascada neurotóxica que altera la señalización de Ca $^{2+}$ nuclear y afecta la activación de la expresión de la respuesta neuroprotectora, potenciando los efectos tóxicos de los A β O s y altera la homeostasis de actividad neuronal, impidiendo su correcta expresión, lo que puede generar hiperactividad o depresión de la actividad en distintas zonas del cerebro (referencias en el texto).

Alternativas farmacológicas para tratar la enfermedad de Alzheimer y el daño cognitivo.

Al presente la terapéutica enfocada en mejorar el desempeño cognitivo en condiciones de daño por enfermedades o para mejorar el rendimiento, ha tenido un éxito prácticamente nulo con pocas alternativas y muy baja eficacia (Possin et al., 2016; Gyertyán, 2017). Actualmente existen pocas alternativas terapéuticas aprobadas por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, y estas sólo proveen tratamiento sintomático y un beneficio a corto plazo. Estas comprenden principalmente inhibidores de la acetilcolinesterasa de acción central, que tratan de reemplazar la pérdida de neuronas colinérgicas que sucede en esta patología. Desafortunadamente este tipo de terapia no detiene la pérdida de estas neuronas, por lo que los fármacos eventualmente pierden su efectividad (Cummings, 2004). Inclusive las inmunoterapias más nuevas enfocadas en la teoría de la cascada amiloide, que prevalece como la principal hipótesis que dirige las investigaciones dirigidas a tratar de entender el origen y desarrollo de esta enfermedad, si bien en principio logran disminuir muy significativamente los niveles de amiloide en el cerebro de pacientes y fueron recibidas con esperanza por investigadores y pacientes, la eficacia mostrada en los ensayos clínicos en parámetros de desempeño cognitivo decepcionaron y generan controversia acerca de su verdadera utilidad y costo-beneficio (Sevigny et al., 2016; Mahase, 2021)

Una nueva aproximación busca desarrollar agentes contra dianas o procesos más amplios que participan dentro del proceso de neurotoxicidad; entre estos destacan algunos ya aprobados para otras condiciones como antiinflamatorios, antioxidantes, inhibidores de la biosíntesis de colesterol (estatinas), sensibilizadores de insulina, entre los cuales al menos 126 agentes se encuentran en fases clínicas y 28 en estudios de Fase III el 2021 (Graham et al., 2017; Cummings et al., 2021). En particular y como hemos revisado, la señalización mediada por Ca^{2+} forma parte cada vez más importante de estos esfuerzos y ha abarcado la determinación de las vías de señalización mediadas por la activación de receptores NMDA extrasinápticos que inducen la neurodegeneración; ello puede permitir descubrir nuevos blancos para evitar estos procesos (Bading, 2017). Inclusive el receptor NMDA ha sido identificado como blanco para enfermedades fuera del SNC (Hogan-cann and Anderson, 2016).

Recientemente se ha discutido el importante papel de fallas en el mecanismo de control de la actividad neuronal en la enfermedad de Alzheimer, que desencadenan una pérdida de la homeostasis de redes neuronales e inician los procesos sinaptotóxicos (Frere and Slutsky, 2018). En particular, en pacientes se ha relacionado una disminución de la expresión de Npas4 con un aumento en la deposición de ovillos neurofibrilares de Tau, característico del progreso de la enfermedad de Alzheimer (Miyashita et al., 2014). Otro estudio, en neuronas corticales de rata, mostró que Npas4 facilita la eliminación de Tau mediado por autofagia (Fan et al., 2016). En este sentido se ha propuesto que las estrategias que permitan la recuperación del balance redox y de la señalización mediada por Ca^{2+} , previniendo los defectos en la activación de Npas4, podrían impedir el inicio de los procesos neurodegenerativos y recuperar la homeostasis sináptica (Burnside and Hardingham, 2017).

En este trabajo se estudió la contribución de la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR en la producción de señales nucleares de Ca^{2+} inducidas por actividad neuronal. Conjuntamente, se evaluó el efecto del tratamiento con los A β O en la generación de señales espontáneas de Ca^{2+} nuclear inducidas por el tratamiento con gabacina. Y se estudió además, la consecuencia funcional de estos efectos, determinando la expresión de Npas4 y BDNF, que participan en los procesos de memoria y neuroprotección mediados por actividad neuronal, y los cambios en la expresión de las enzimas de la respuesta antioxidante, NADPH-Quinona-Oxidoreductasa-1 (NQO1) y Glutamato-Cisteína-Ligasa (GCL).

2. HIPOTESIS

“Los Receptores de Ryanodina (RyR) contribuyen a la generación de señales nucleares de Ca^{2+} inducidas por aumento de actividad neuronal, mientras que los oligómeros del péptido β -amiloide ($\text{A}\beta\text{Os}$) las interrumpen, disminuyendo la expresión de Npas4, RyR2 y de genes que median la respuesta antioxidante.”

3. OBJETIVO GENERAL

"Determinar la contribución del Receptor de Ryanodina (RyR) y los efectos del tratamiento con oligómeros solubles del péptido β -amiloide ($\text{A}\beta\text{Os}$) en las vías de señalización dependientes de señales de Ca^{2+} nucleares inducidas por actividad y que participan en la expresión de Npas4 y genes de respuesta antioxidante".

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Objetivo específico I:

“Estudiar la participación de la liberación de Ca^{2+} mediada por los Receptores de Ryanodina (RyR) en el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ nuclear inducido por gabacina o por estímulo eléctrico de campo”.

Objetivo específico II:

“Determinar si el tratamiento con $\text{A}\beta\text{Os}$ modifica la generación de señales de Ca^{2+} nucleares inducidas por gabacina”.

Objetivo específico III:

“Determinar la participación de los Receptores de Ryanodina y el efecto de los $\text{A}\beta\text{Os}$ en la activación de Npas4 y la expresión de enzimas de respuesta antioxidante (NQO1 y GCL) inducidas por gabacina.”.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Principales materiales y reactivos:

El péptido (A β 1-42) fue de Bachem Inc. (Torrance, CA, USA), Gabacina SR9553 de Tocris Bioscience (Avonmouth, Bristol, UK); el plásmido GCaMP3-NLS fue gentilmente cedido por el Dr. H. Bading, University of Heidelberg, Germany; DMSO (Sigma) y, Hexafluoro-2-propanol (HFIP) fueron de Merck (Darmstadt, Germany). DAPI y Glutamax TM de Invitrogen (Carlsbad, CA). El medio de montaje DAKO® se obtuvo de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). El suplemento B27, el Medio Neuronal – Neurobasal® y Lipofectamine 2000® fueron obtenidos de Gibco (Carlsbad, CA, USA). El anticuerpo primario específico contra CREB fosforilado (P-CREB) fue adquirido de Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA) y MAP2 (Abcam) o β -tubulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Alexa Fluor 488 anti-rabbit y Alexa Fluor 635 anti-mouse de Invitrogen (Carlsbad, CA). Improm II TM reverse transcriptase (Promega). Plasmidios: RCaMP1.07 fue gentilmente donado por el Dr. Masamichi Okura del Brain Science Institute, Saitama University, Saitama, Japan. El sensor de Ca²⁺ GCaMP3-NLS fue gentilmente aportado por el Dr. Hilmar Bading del Department of Neurobiology, Interdisciplinary Center for Neurosciences, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. El sensor de Glutamato iGluSnFR fue donado por Dr. Loren Looger (Addgene plasmid # 41732; <http://n2t.net/addgene:41732>; RRID: Addgene 41732). Ambos plásmidos ShRyR2-RFP (TR30014) and ShScr-RFP (TR30015) fueron adquiridos de Origene® (Rockville, MD).

Cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata:

Los cultivos se prepararon a partir de embriones de 18 días de gestación (E18) de ratas Sprague-Dawley. Se diseccionaron los cerebros y se mantuvieron en solución salina HANKS balanceada (NaCl 135 mM; KCl 5,4 mM; NaH₂PO₄ 0,5 mM; Na₂HPO₄ 0,33 mM; y D-glucosa 5,5 mM) a pH 7,4 en hielo a 4°C. En zona estéril de campana de flujo laminar se retiraron las meninges, se disecaron y se reunieron ambos hipocampos de cada embrión. Luego estos se lavaron con solución HANKS y se incubaron en solución HANKS suplementada con 0,25% tripsina a 37°C en atmósfera húmeda durante 8 minutos. Después, se disociaron mecánicamente en medio de adhesión (DMEM, D-glucosa 19,4 mM; NaHCO₃ 26 mM; suplementado con 10% de suero fetal bovino; 10 U/mL de penicilina; 10 μ g/mL de estreptomycin) se separó el tejido de restos no

disgregados mediante sedimentación por centrifugación a 800 rpm durante 10 min, se recuperaron las células en suspensión y se sembraron a una densidad de 200.000 células por cubre-objeto de vidrio de 25 mm de diámetro, o a una densidad de 600.000 células por placa plástica de 60 mm de diámetro previamente tratada con poli-Lisina (50 µg/mL). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en el medio de adhesión y 40 minutos después de ser sembradas, el medio se cambió por medio Neurobasal® suplementado con B27, 20 U/mL de penicilina y 20 µg/mL de estreptomicina y 2 mM de Glutamax. Las células se mantuvieron en estas condiciones suplementándose con medio de cultivo periódicamente y se utilizaron después de 14 a 21 días (14-21 DIV) según se detalla en cada procedimiento.

Preparación de oligómeros solubles de Aβ1-42 (AβOs):

Para preparar los **oligómeros** solubles de Aβ1-42 (de aquí en adelante AβOs), se utilizó el péptido Aβ1-42 liofilizado (adquirido a la empresa Bachem Inc., Torrance, CA), el cual se disolvió en hexafluoro-2-propanol (HFIP), y se dividió en alícuotas en tubos de centrifugación de 1.7 ml. Luego, se evaporó el solvente formándose una película seca en el fondo del tubo, y las fracciones así obtenidas se almacenaron a -20° durante un máximo de 12 meses. Previo a cada experimento, en gabinete de seguridad se disolvió cuidadosamente la película del fondo del tubo en DMSO estéril suficiente para obtener una solución de 5 mM de péptido, esta luego se diluyó utilizando solución de PBS a 4°C para obtener una concentración final de 100 µM. Esta disolución final se dejó reposar a 4°C, condiciones que inician el proceso de formación de oligómeros del péptido. Luego de 24 hrs se centrifugaron las disoluciones a 14.000 x g durante 10 min a 4 °C para eliminar los agregados insolubles (principalmente protofibrillas y fibrillas), se recogió el sobrenadante que contiene los AβOs, que se transfirieron a tubos estériles, que se almacenaron a 4°C hasta su uso experimental. Todas las soluciones de AβOs se utilizaron sólo hasta 48 horas después de cada preparación para evitar la formación de fibrillas. Se determinó el rendimiento de cada preparación realizada mediante la determinación de la concentración de proteínas en esta fracción soluble a través del método del ácido bicinonínico (Pierce® BCA ProteinAssay Kit).

Lipotransfección de plásmidos:

Las neuronas fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes GCaMP3.NLS, shRyR2 o shScr entre 12-14 DIV utilizando Lipofectamine 2000®. En breve, se utilizó una mezcla de

ADN: Lipofectamine 2000® a una razón de 1: 2 y un total de 1 µg de ADN fueron transfectados a las células sembradas en cubreobjetos de 25 mm de diámetro (aproximadamente 350.000 células). Luego de 1 hora el medio de transfección fue retirado y reemplazado con medio de mantención, 24 a 48 horas después las células fueron visualizadas para los respectivos experimentos.

Determinación de Señales de Ca²⁺ intracelulares:

Se utilizaron neuronas hipocampales de 14 DIV, sembradas en cubreobjetos de vidrio de 25 mm previamente transfectadas con los respectivos sensores de acuerdo al experimento. Para determinar la contribución del Receptor de Ryanodina (RyR), las células previamente fueron incubadas durante 60 minutos con Ryanodina 50 µM a 37°C en medio extracelular Tyrode (NaCl 129 mM, KCl 5 mM, HEPES 25 mM pH 7.3, glucosa 30 mM CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM). En todos los casos, las células se visualizaron en el microscopio de epifluorescencia Zeiss Cell-Observer (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se utilizaron los objetivos Plan-Neofluor 20x/0.4 o Plan Aplanachromat, 40x /1.3 agua, con fuente de luz 470 nm LED Colibri 2 y una cámara digital EMCCD Evolve 512 delta (Teledyne Photometrics Tucson, AZ). Todos los parámetros se ajustaron para minimizar el foto-blanqueamiento y maximizar la frecuencia de adquisición. Al comienzo de cada experimento se registró una línea base de fluorescencia, sin ningún estímulo durante 2-5min para asegurar una línea base estable, luego se adicionó GBZ (10 µM) registrando continuamente las señales y tras 10-20min se adicionó glutamato (10 µM) y/o Ionomicina (3 µM) para determinar la señal máxima alcanzada.

Estimulación eléctrica de Campo (HFFS):

Las neuronas transfectadas con GCaMP3.NLS y/o shRyR2 o shScr fueron registradas en solución de Tyrode (NaCl 129 mM, KCl 5 mM, HEPES 25 mM pH 7.3, glucosa 30 mM CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM) 24-48 h después de la transfección. Se aplicó estimulación eléctrica de campo a las neuronas ubicadas en el campo de visión del microscopio a través de filamentos de platino, utilizando un voltaje (30 V) supra-umbral de 1 ms de duración de pulsos emitidos por estimuladores de alta capacidad de corriente. Las neuronas se estimularon con trenes de 50, 100, 200 o 400 pulsos a 10 o 20 Hz, en presencia o ausencia de 50 µM de Ryanodina añadida a la solución 60 minutos antes de aplicar el protocolo de estimulación de campo de alta frecuencia (HFFS).

Análisis de las señales de Ca²⁺:

Los registros obtenidos fueron segmentados a mano identificando los núcleos neuronales y otros compartimentos (soma y/o dendritas), generando las regiones de interés (ROIs) adecuadas para el análisis morfológico y funcional utilizando el software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutos de Salud, Bethesda, Maryland, EE. UU., [Http://imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/), 1997-2014). La intensidad de los diferentes ROIs obtenidos en el tiempo fueron procesados con la fórmula: $(F - F_{bkg}) / (F_0 - F_{bkg})$, donde F es la intensidad de fluorescencia, F₀ la intensidad en el momento inicial (intensidad media de 20 a 50 fotos antes del estímulo), y F_{bkg} la señal de fondo registrada en regiones libres de fluorescencia. Esta normalización se automatizó construyendo un script en R, ejecutados en RStudio, utilizando directamente el output de FIJI. En caso de ser necesario, se corrigió el *bleaching* sólo en registros que exhibían una caída lineal en la fluorescencia normalizada, para lo cual también se diseñó un script en R. La amplitud máxima de la señal se estimó identificando el valor máximo de intensidad inducido tras el estímulo.

Inmunofluorescencia:

Las neuronas hipocampales de 14-16 DIV se fijaron con paraformaldehído 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS 1x) durante 10 min a temperatura ambiente (RT). Las neuronas fijadas se permeabilizaron y bloquearon durante 1 h con solución de inmunofluorescencia compuesta por Triton X-100 al 0,25%, Suero de burro al 3% en PBS). Los anticuerpos primarios se diluyeron en esta misma solución y las neuronas se incubaron con estos durante la noche. Para la detección de p-CREB, los cultivos se incubaron a 4°C durante la noche con anticuerpos primarios para p-CREB (1: 300) y MAP2 (1: 500) o β-tubulina (1: 500). Después de esta incubación, las neuronas se lavaron cinco veces con PBS 1x y los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor® 488 anti-conejo, Alexa Fluor 635 anti-ratón) se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, y luego se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS 1x solución seguida de la incubación con DAPI (1: 1000) para tinción nuclear. Los cubreobjetos se montaron utilizando medio de montaje DAKO® y se sellaron con esmalte de uñas, manteniéndose a 4°C hasta su visualización. Se registraron una serie de planos focales de 500 nm de profundidad cada uno utilizando un microscopio de disco giratorio *Spinnig-Disk* (PerkinElmer, Waltham, MA / Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un objetivo de inmersión en aceite de 40x 1,3 N.A. y excitación con láser de diodo de 488 y 655 nm (Omicron), para obtener imágenes de neuronas fijadas. Las imágenes se

procesaron utilizando el software NIH WCIF Image J (National Institutes of Health, EE. UU.). Para cuantificar la intensidad de fluorescencia de p-CREB en el núcleo, se segmentaron los núcleos basado en la tinción DAPI, y solo se cuantificó en células positivas para MAP2.

Extracción de ARN y análisis por PCR en tiempo real:

En breve, se aisló el ARN total utilizando el reactivo e instrucciones adaptadas de TRIzol® de Invitrogen (Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante; para eliminar el ADN genómico contaminante, se incluyó un paso de digestión con DNAasa (kit Turbo DNA-free™, Ambion, Invitrogen (Carlsbad, CA)). La pureza del ARN se determinó mediante la relación de absorbancia 260/280 en un espectrofotómetro MestroNano Pro (MN-913, ciudad de Hsinchu, Taiwán). Se sintetizó el ADN complementario (cDNA) utilizando las instrucciones del kit de transcriptasa inversa Improm II™ de Promega (Madison, WI) a partir de 2 µg de ARN total. Los niveles de los respectivos mRNA se amplificaron a partir de 0.2 µg de cDNA en 20 µl (volumen final) usando el equipo Mx3000P QPCR de Stratagene (Bellingham, WA); utilizando la enzima adquirida de Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR de Agilent Technologies (Santa Clara, CA). Las secuencias de los partidores específicos utilizados se detallan en la tabla que se presenta a continuación y fueron diseñados durante la tesis. Se determinaron los niveles relativos de mRNA mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001) utilizando β -actina como normalizador. Todas las muestras se analizaron por triplicado técnico. Para verificar la pureza de los productos se analizaron las curvas de disociación.

Tabla 1: Secuencia de los partidores utilizados en esta tesis.

Gen	Forward 5'→3'	Reverse 3'→5'
RyR2	AATCAAAGTGGCGGAATTTCTTG	TCTCCCTCAGCCTTCTCCGGTTC
BDNF exon IV	CCGCCATGCAATTTCCACTA	CGGTCCCCAAGGTTCTAGACT
Npas4	CCCTATCAGTGACACGGAAGCC	CAGTGCTCCTGGGAGAAGACA
GCL	GGTGACGAGGTGGAGTACAT	ACATCGCCGCCATTCAGTAA
Nqo1	CTTTCAGAAATAAGAAGACCTTGC	TGCTGTACACCAGTTGAGGTT
β -actin	TCTACAATGAGCTGCGTGTG	TACATGGCTGGGGTGTGTGAA

Análisis Estadístico

Los datos se presentan como promedio \pm error estándar (SEM). La comparación entre datos fue realizada por la Prueba t de Student para dos grupos, y ANOVA de dos o tres vías seguido del test de Bonferroni para más de dos grupos. Los resultados de los análisis fueron considerados significativos si $p < 0,05$.

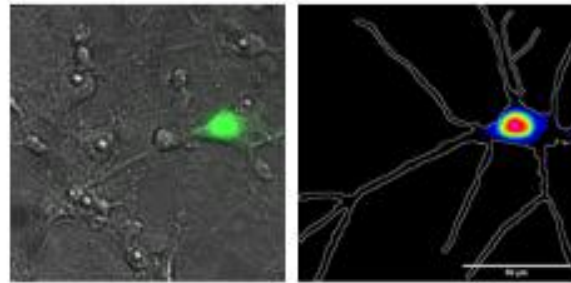
Todos los protocolos experimentales usados en este trabajo fueron aprobados por el comité de Bioética de investigación con animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y cumplieron con las “Guías y principios para la investigación que involucran Animales” de la American Physiological Society

6. RESULTADOS

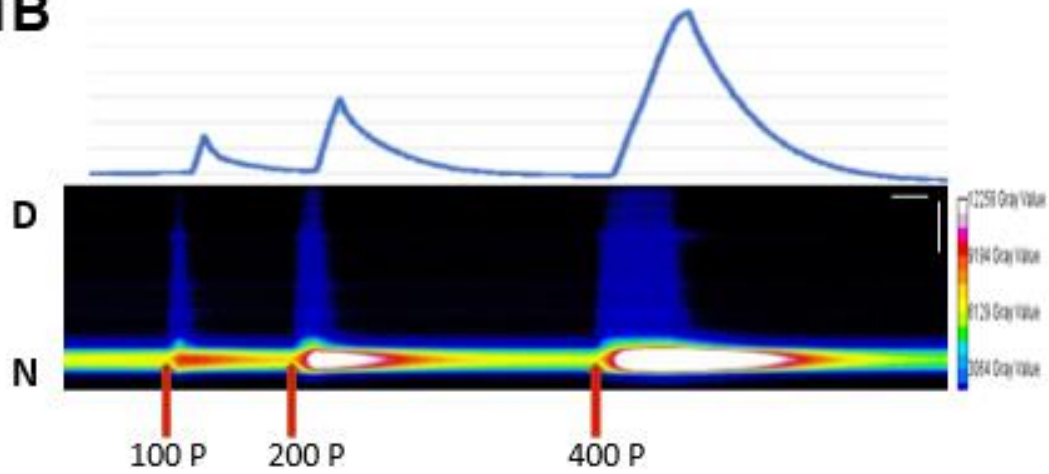
1.-Detección y caracterización de señales de Ca^{2+} nucleares inducidos por la estimulación eléctrica de campo en cultivo primario de neuronas hipocampales.

La estimulación eléctrica de campo (E.E.) permite controlar la actividad de células excitables, como las neuronas piramidales del hipocampo, mediante la estimulación con protocolos de estimulación compuestos de trenes de pulsos (50, 100, 200 o 400 pulsos según se indique) de intensidad (voltaje, 30 V para todos los experimentos), duración (1 ms para todos los experimentos) y frecuencia (10 o 20 Hz según se indique) ajustable, que inducen la producción de señales de Ca^{2+} intracelulares globales. Para determinar el cambio en los niveles de Ca^{2+} nuclear inducido por E.E., utilizamos neuronas hipocampales (14-16 DIV) transfectadas con el sensor fluorescente de Ca^{2+} con destinación nuclear GCaMP3-NLS, el que se acumula en el núcleo neuronal. Sin embargo, es posible también detectar señal (de al menos 50-100 veces menor intensidad) en los compartimentos somáticos y dendríticos (figura 1A). La E.E. con protocolos de 100, 200 y 400 pulsos causaron un aumento transitorio de la señal de Ca^{2+} a lo largo de la dendrita y en el núcleo, de amplitud creciente de acuerdo con la cantidad de pulsos aplicados (ilustrados en quimógrafo de línea figura 1B) Al aplicar un protocolo de E.E. con 200 pulsos a 20 Hz, se evidencia una sumatoria de los pulsos y un aumento global de la señal de Ca^{2+} , que invadió el núcleo y disminuyó retornando al valor inicial tras el término del protocolo, como se ilustra en la secuencia de imágenes de intensidad de fluorescencia (figura 1C) Estos resultados revelan que en neuronas hipocampales que expresan el sensor codificado genéticamente GCaMP3-NLS. el protocolo de E.E. produce señales transitorias de Ca^{2+} en el núcleo que son proporcionales a la intensidad del estímulo aplicado en el rango estudiado.

1A



1B



1C

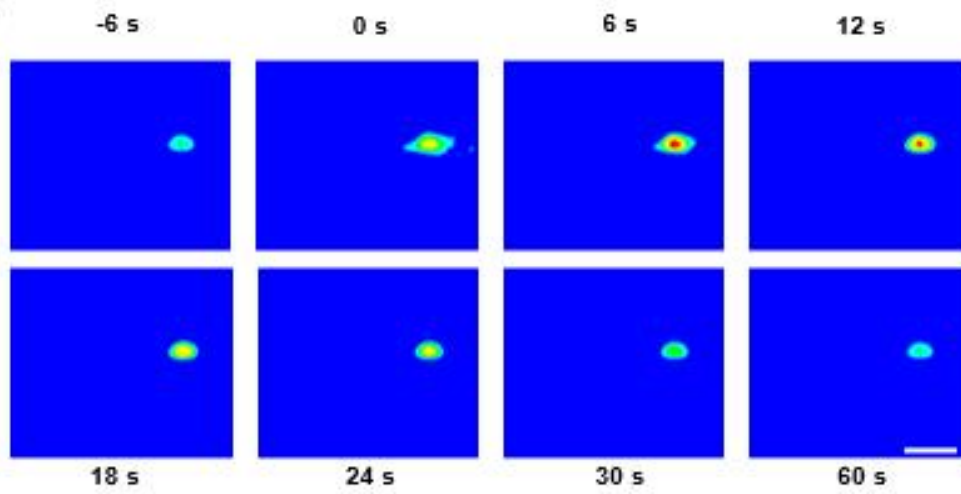


Fig. 1.- Determinación de señales de Ca^{2+} nucleares inducidos por la por la estimulación eléctrica de campo en cultivo primario de neuronas hipocampales.

- A) Imágenes representativas que muestran la localización nuclear del sensor GCaMP3.NLS en neuronas hipocampales. En la foto de la izquierda se muestra la imagen obtenida mediante contraste diferencial de interferencia (DIC en gris) y la fluorescencia asociada a GCaMP3.NLS en verde. En la foto de la derecha se muestra en escala de pseudo-colores la fluorescencia asociada a GCaMP3.NLS y el contorno de la neurona en líneas blancas, evidenciando su acumulación casi exclusiva nuclear. Objetivo 63X, barra de escala 50 μm .
- B) Trazo representativo y quimógrafo que muestra los cambios en la fluorescencia de GCaMP3.NLS de una neurona hipocampal control, en el tiempo. A la izquierda se indican las posiciones de la dendrita (D) y del núcleo (N) de referencia espacial. Las flechas rojas indican el inicio de los respectivos estímulos secuenciales de E.E. con 100, 200 y 400 pulsos a 20 Hz. A la derecha se muestra la barra de calibración de colores asociada a los cambios de intensidad de la fluorescencia (unidades arbitrarias). En blanco se muestra la barra de escala vertical: 30 μm y barra de escala horizontal: 10 s.
- C) Secuencia de imágenes en el tiempo registradas de un experimento representativo que muestra los cambios de fluorescencia de neurona hipocampal control que expresa GCaMP3.NLS registrada, antes, durante y después de la estimulación de campo con 200 pulsos a 20 Hz. Barra de escala: 30 μm .

2. La liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR contribuye a la señal de Ca^{2+} nuclear inducida por la estimulación eléctrica de campo.

En neuronas, el RE está presente en compartimentos dendríticos, somáticos y perinucleares y representa un importante organelo que participa en la regulación de Ca^{2+} intracelular, principalmente a través de la acción conjunta de los canales RyR e IP3R distribuidos extensamente en las neuronas (Baker et al., 2013). Para determinar la participación de la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR, en la señal de Ca^{2+} nuclear inducida por el EE, las neuronas transfectadas con GCaMP3-NLS fueron incubadas con Ryanodina 50 μM por 1 hora (Ryanodina Inhibitoria) antes de la EE, la que se mantuvo también durante la estimulación. Estas condiciones permiten inhibir selectivamente la activación y liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR en neuronas de hipocampo (Adasme et al., 2015). Las neuronas control generaron señales nucleares en respuesta a la EE (Figura 2A). En cambio, las neuronas tratadas con Ryanodina mostraron una disminución en la amplitud de la señal de Ca^{2+} nuclear detectada por el sensor GCaMP3-NLS, comparadas con las neuronas controles sin tratamiento. Esta disminución se apreció con los diferentes protocolos E.E. probados (50 a 200 pulsos a 10 o 20 Hz, según se indica en la figura 2B).

Este resultado revela la contribución de los canales RyR en la producción de las señales de Ca^{2+} nucleares inducidas por los distintos protocolos de pulsos de E.E.

Distintos trabajos del laboratorio y otros grupos independientes han resaltado el papel, en específico de la isoforma 2 del Receptor de Ryanodina (RyR2) en la generación de señales citoplasmáticas de Ca^{2+} y su participación en procesos de plasticidad sináptica y control de la actividad neuronal (Adasme et al., 2011; Ziviani et al., 2011; More et al., 2018b; Sahu et al., 2019). Para evaluar la participación de RyR2 en la señal de Ca^{2+} nuclear inducida por EE, se utilizaron neuronas de 14-16 DIV co-transfectadas con el sensor GCaMP3-NLS y otro plásmido que codifica para un “short-hairpin RNA “(shRNA) dirigido contra el mRNA de RyR2 (shRyR2) o una secuencia desordenada sin mRNA blanco (sh-Scr). Ambas fueron asociadas a la expresión de una proteína fluorescente Roja (RFP), para identificar las neuronas co-transfectadas con el respectivo par de plásmidos, en el microscopio de fluorescencia, como se muestra en las imágenes representativas de ambas condiciones en el panel de la figura 2C. En un trabajo previo del grupo (More et al., 2018b) se mostró que este shRyR2 disminuye el contenido total de la proteína RyR2 del cultivo en un 40% sin modificar el contenido de proteína RyR3. Además, el contenido basal de la proteína RyR1 era muy bajo o indetectable en este mismo modelo.

Los resultados del presente trabajo mostraron que las neuronas que co-expresaron el “Knock-Down” de RyR2 (shRyR2) presentaron una disminución en la amplitud de la señal de Ca^{2+} nuclear detectada por el sensor GCaMP3-NLS, comparadas con las neuronas que co-expresaron la secuencia desordenada sh-Scr. Esta disminución se apreció con los diferentes protocolos de E.E. probados (50 a 200 pulsos a 10 o 20 Hz, según se indica en la figura 2D). Este resultado refuerza la participación de los canales RyR y destaca la contribución de la isoforma RyR2 en la producción de señales de Ca^{2+} nucleares inducidas por EE en neuronas hipocampales.

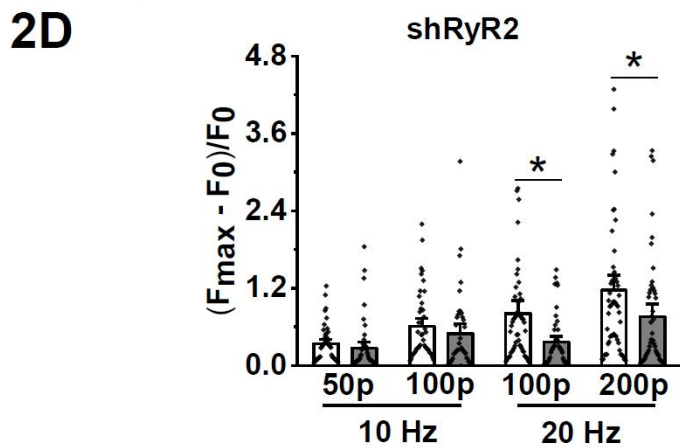
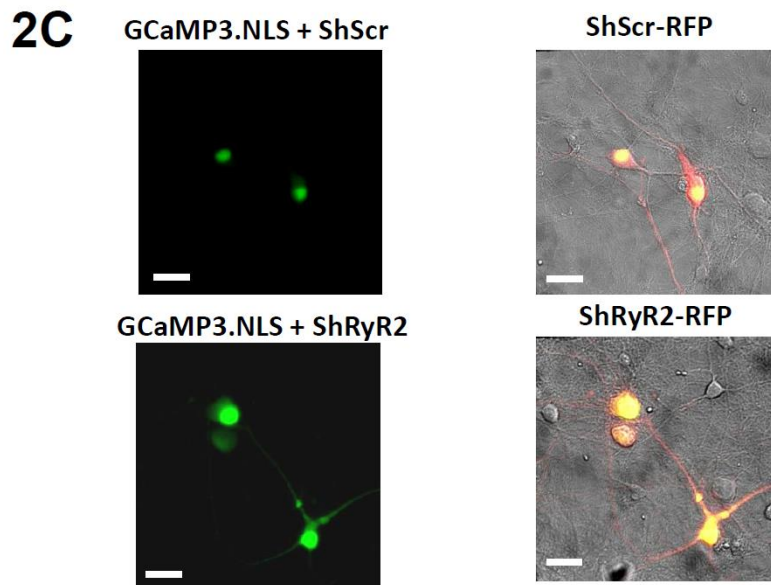
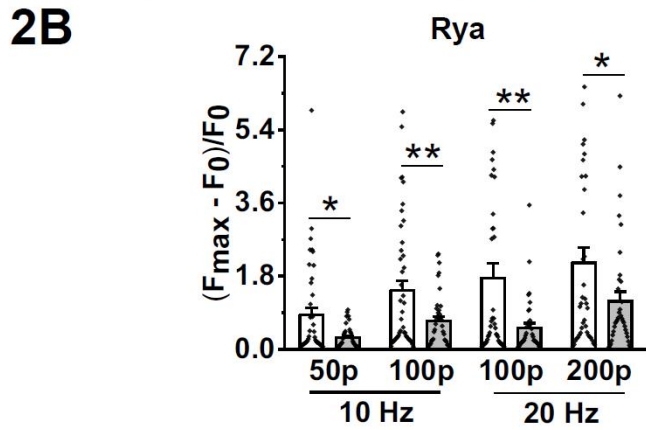
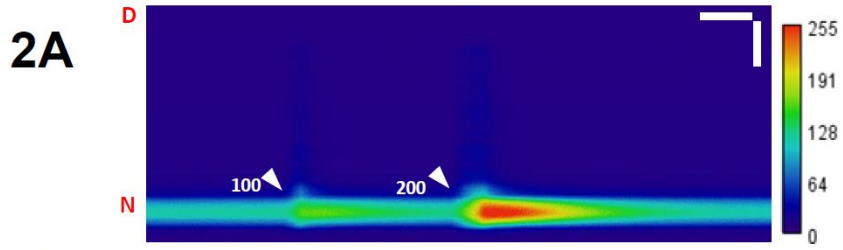


Fig. 2.- Los Receptores de Ryanodina (RyR) contribuyen a la generación de señales de Ca^{2+} en el núcleo generadas por la estimulación eléctrica de campo (HFFS) en neuronas hipocampales.

- A) Quimógrafo representativo que muestra los transitorios de Ca^{2+} nucleares registrados en una neurona control expresando GCaMP3.NLS después de HFFS secuencial con 100 y 200 pulsos en 20 Hz. Una barra de calibración no lineal codificada por colores de cambios de intensidad de fluorescencia se muestra a la derecha del gráfico. (Barra de escala vertical: 30 μ m; escala horizontal bar: 10 s.
- B) Las señales de Ca^{2+} nuclear se cuantificaron en neuronas que expresan GCaMP3.NLS después de HFFS secuencial con 50 y 100 pulsos a 10 Hz o 100 y 200 pulsos a 20 Hz. Se determinaron cambios de fluorescencia en neuronas de cultivos control (barras vacías) y en neuronas presentes en cultivos pre-incubados durante 1 h con 50 μ M ryanodina (barras grises); las barras representan la media +/- error estándar de la media (SEM).
- C) Los paneles a la izquierda muestran las imágenes representativas de la fluorescencia de neuronas co-transfectadas con GCaMP3.NLS (verde) y shScr o shRyR2 (rojo), en los paneles de la derecha también se muestra la superposición de las imágenes obtenidas por contraste diferencial de interferencia (DIC) además de la fluorescencia verde y roja antes descrita, que corresponden al mismo par de neuronas. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Cell Observer, magnificación 40x, Barra de escala: 30 μ m.
- D) La cuantificación, similar a las determinaciones descritas en B), se realizó en neuronas co-transfectadas con shScr (barras vacías) o shRyR2 (barras gris oscuro)+ GCaMP3.NLS por 48 horas, las barras representan la media +/- error estándar de la media (SEM) para cada condición indicada. n = 7 (36 a44 células por condición). Las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones representadas fueron evaluadas por ANOVA seguido de un post test de Bonferroni's para comparaciones múltiples ; *P < 0.05, **P < 0.01.

3.- Detección y caracterización de señales Ca^{2+} nucleares inducidas por antagonismo de GABA_A R en cultivo primario de neuronas hipocampales.

La E.E. induce actividad neuronal afectando de manera global la excitabilidad, pero carece de la especificidad sináptica propia de la activación neuronal fisiológica. Para incrementar la actividad sináptica, utilizamos un modelo farmacológico que consiste en el tratamiento agudo con Gabacina, un antagonista del receptor GABA_A que produce una disminución del tono inhibitorio gabaérgico, produciendo un desbalance excitatorio y un rápido aumento de la actividad neuronal. El tratamiento con Gabacina induce la aparición de incrementos transitorios de Ca^{2+} global, recurrentes y sincronizados, detectados por el incremento de la fluorescencia emitida en neuronas tratadas con la sonda de Ca^{2+} Fluo4-AM (Figura 3a-b). Estos transitorios de Ca^{2+} efectivamente producen un incremento de Ca^{2+} nuclear, detectado en las neuronas transfectadas con GCaMP3-NLS, la frecuencia, intensidad y duración de los transitorios de Ca^{2+} nucleares inducidos por el tratamiento con Gabacina, presentó una variabilidad en cada cultivo experimental ensayado.

Este resultado muestra el modelo de incremento de actividad sináptica inducido por Gabacina, que promueve la actividad neuronal e induce transitorios de Ca^{2+} nuclear que pueden ser detectados en neuronas hipocampales con el sensor codificado genéticamente GCaMP3-NLS.

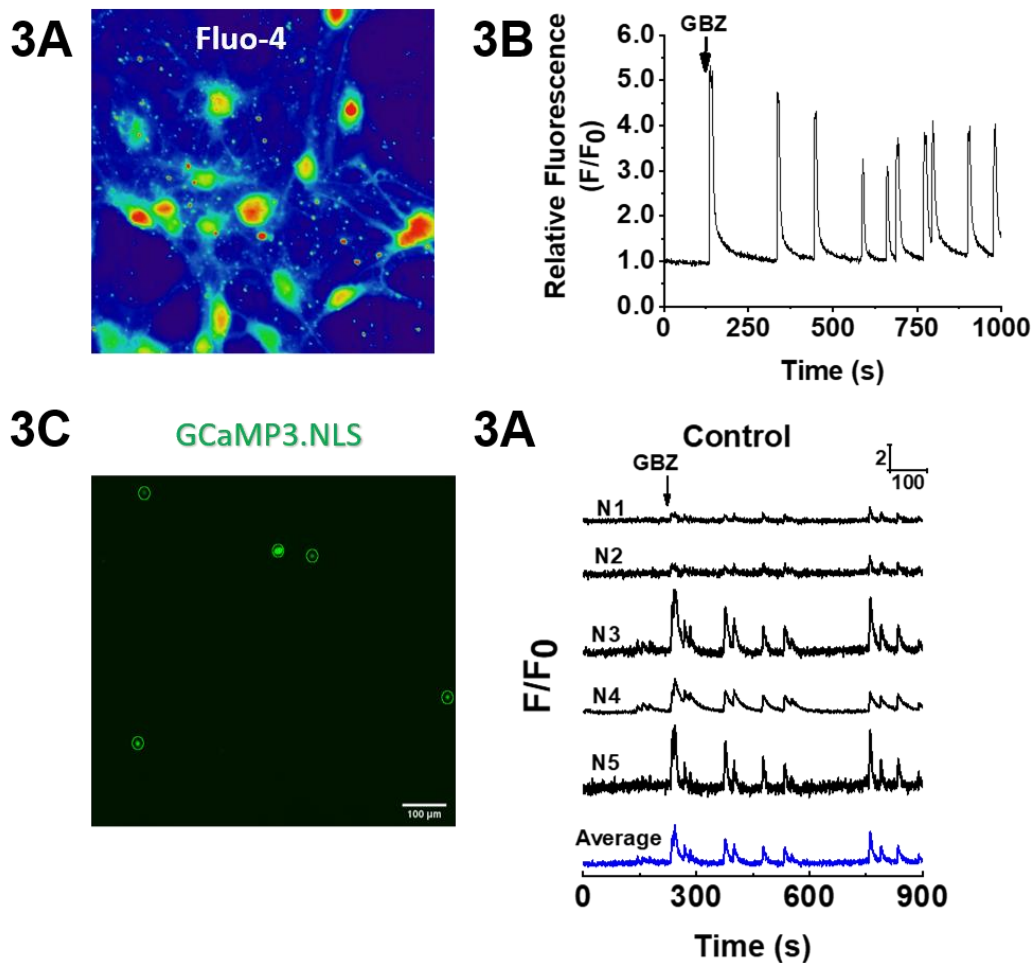


Fig. 3.- Determinación de señales de Ca^{2+} nucleares inducidos por la por la estimulación eléctrica de campo en cultivo primario de neuronas hipocampales.

- A) Imagen representativa que muestra las señales de fluorescencia emitidas por la sonda citoplasmática Fluo-4 registradas 30 s después de la adición de gabazina (GBZ) (10 μM) a cultivos primarios de hipocampo. Barra de escala: 30 μm . Una escala de arcoíris se utilizó para mostrar la intensidad de fluorescencia de la sonda Fluo-4 Ca^{2+} (azul: valores bajos; rojo: valores altos).
- B) Trazo representativo que muestra los cambios relativos de las señales de fluorescencia del sensor Fluo-4 registradas desde el soma de neuronas antes (línea de base) y después de la adición de 10 μM GBZ al cultivo, lo que provocó transitorios oscilatorios sincrónicos de Ca^{2+} .
- C) Imagen representativa que muestra las señales de fluorescencia emitidas por GCaMP3.NLS (verde) en condición basal; se observan 5 núcleos de neuronas hipocampales cuyos registros se ilustran en D.
- D) Trazos de registros de los cambios relativos de la intensidad de la señal de GCaMP3.NLS, antes (línea de base) y después de la adición de 10 μM de GBZ a un cultivo de control. La barra de escala en la esquina superior derecha representa un aumento de $2x\Delta F$ en la vertical y de 100 segundos en la horizontal

4.- La liberación de Ca^{2+} mediada por los Receptores de Ryanodina contribuye a la señal de Ca^{2+} nuclear inducida por Gabacina en neuronas hipocampales.

Para determinar la contribución de la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR, en la producción de transitorios de Ca^{2+} nucleares inducidos por incremento de actividad sináptica con Gabacina, las neuronas transfectadas con GCaMP3-NLS fueron incubadas con Ryanodina 50 μM por 1 hora (Rya. Inhibitoria) antes del tratamiento con Gabacina, la que se mantuvo también durante el tratamiento. Utilizamos un objetivo de menor incremento para determinar los transitorios de Ca^{2+} nuclear en el mayor número de núcleos neuronales por campo testado. Las neuronas tratadas con Ryanodina mostraron una disminución en la amplitud y la frecuencia de los transitorios de Ca^{2+} nucleares evocados por el incremento de actividad sináptica inducido por Gabacina (Figura 4 A-B y cuantificación en 4 C-D). Para comprobar que la respuesta de la entrada de Ca^{2+} no estaba afectada, al completar 20 minutos de tratamientos con Gabacina se agregó glutamato (10 μM) al baño, produciéndose en ambas condiciones un incremento notorio de la señal de Ca^{2+} nuclear y global. Por lo tanto, estos resultados muestran que la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR contribuye a la generación de señales transitorias de Ca^{2+} en el núcleo inducidas por el incremento de actividad neuronal.

Para evaluar la participación del canal RyR2 en las señales de Ca^{2+} nuclear inducidas por incremento de actividad neuronal con Gabacina, utilizamos neuronas co-transfectadas de 14-16 DIV con el sensor GCaMP3-NLS y sh-RyR2 o una secuencia desordenada (sh-Scr). Las neuronas que co-expresaron sh-RyR2 mostraron una disminución en la amplitud y frecuencia de los transitorios de Ca^{2+} nucleares, detectados por el sensor GCaMP3-NLS, comparadas con las neuronas que co-expresaron la secuencia desordenada sh-Scr. (Figura 4 E-F y cuantificación en 4 G-H).

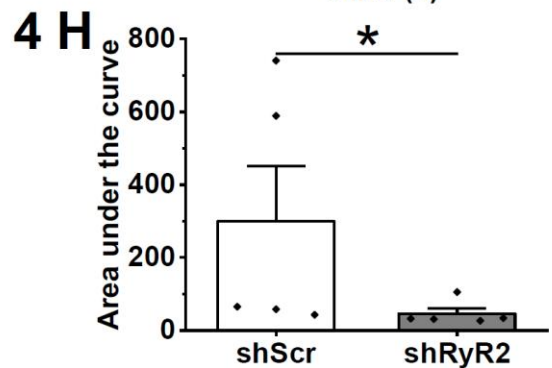
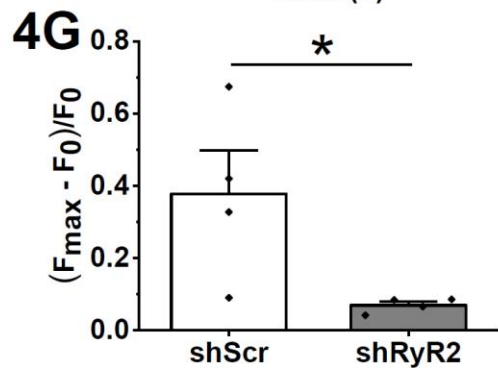
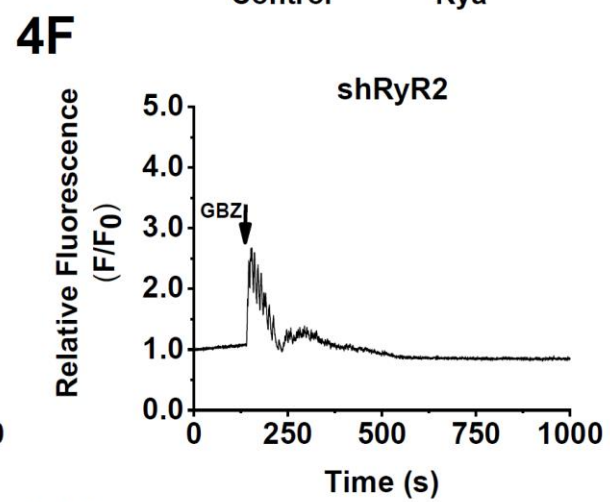
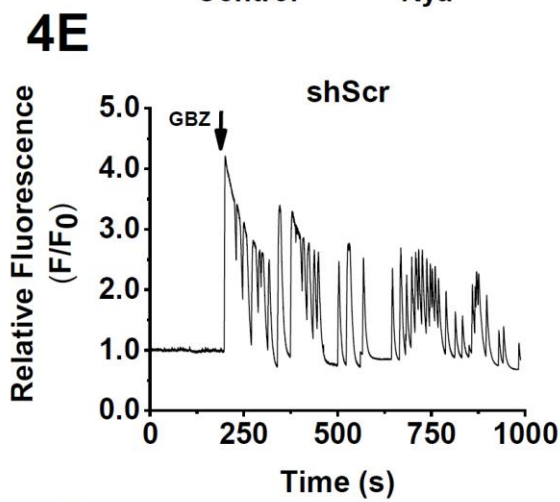
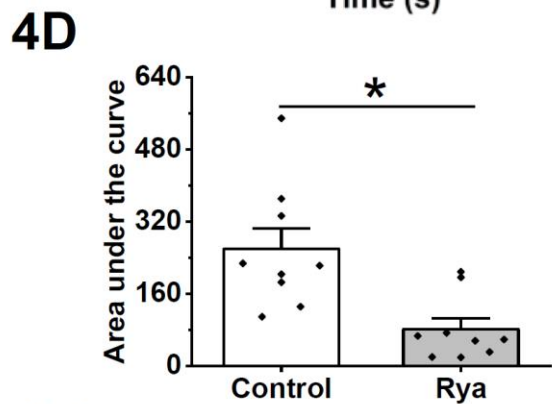
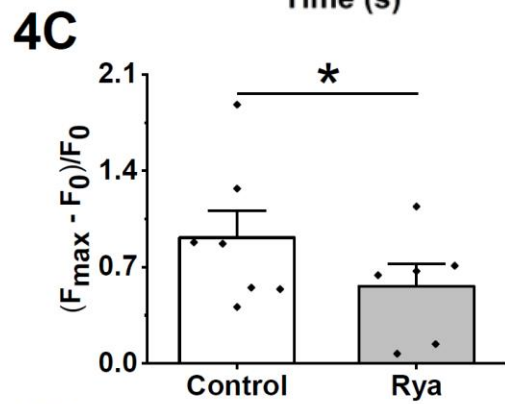
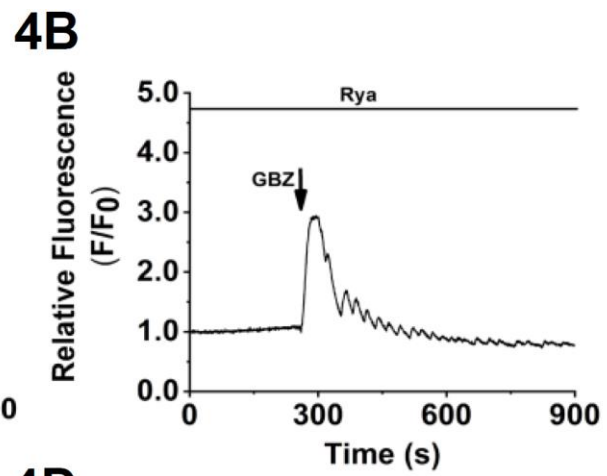
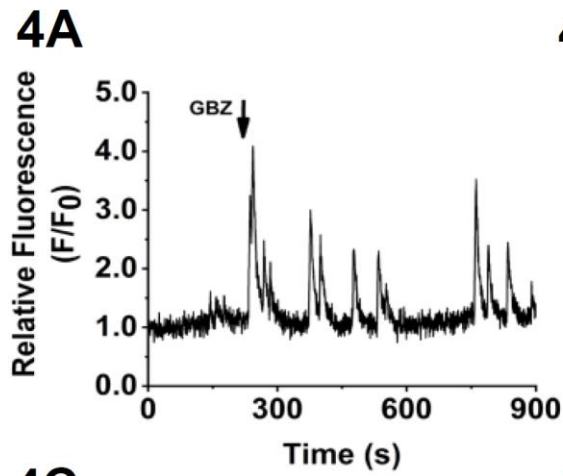


Fig. 4.- La liberación de Ca^{2+} mediada por el canal RyR contribuye a la generación de Señales de Ca^{2+} inducidas por Gabacina

- A) Trazo representativo del promedio de las señales de Ca^{2+} nucleares registradas en neuronas transfectadas con GCaMP3.NLS antes (línea de base) y después de la adición de Gabacina (GBZ) 10 μM a cultivos primarios de hipocampo. Los transitorios oscilatorios de Ca^{2+} sincrónicos ocurren en el núcleo neuronas que expresan GCaMP3.NLS después de la adición de GBZ.
- B) Similar a A), trazo representativo del promedio de las señales de Ca^{2+} nucleares, que muestran los efectos de la adición de 10 μM de GBZ en las señales nucleares de Ca^{2+} exhibido por neuronas que expresan GCaMP3.NLS y pre-incubadas durante 1 h con 50 μM ryanodina (Rya) para suprimir la actividad de los canales RyR.
- C) Cuantificación que indica los valores promedios de fluorescencia máxima alcanzada, expresados como $(F_{\text{max}} - F_0) / F_0$, registrados en el núcleo después de la adición de GBZ a cultivos de control o cultivos tratados durante 1 h con 50 μM de Rya.
- D) Valores promedios del Área Bajo la Curva (AUC) , cuantificados en el núcleo tras la adición de GBZ, en cultivos controles (barra blanca) o para cultivos tratados durante 1 h con 50 μM de Rya (barras grises).
- E) Trazo representativo del promedio de las señales de Ca^{2+} nuclear que muestran los efectos de la adición de GBZ de 10 μM en neuronas transfectadas con GCaMP3.NLS y co-transfectadas con el shScr.
- F) Similar a E) trazo representativo del promedio de las señales de Ca^{2+} nuclear, que muestran los efectos de la adición de 10 μM de GBZ en las neuronas transfectadas con GCaMP3.NLS y co-transfectadas con shRyR2.
- G) Cuantificación similar a C) de los valores promedio de la fluorescencia máxima, F_{max} , expresados como $(F_{\text{max}} - F_0) / F_0$, cuantificados tras la adición de GBZ en el núcleo de neuronas hipocámpales que expresan shScr (barra blancas) o el shRyR2 (barra gris).
- H) Valores promedios del Área Bajo la Curva (AUC) , cuantificados en el núcleo tras la adición de GBZ, en neuronas expresando el shScr (barra blanca) o el shRyR2 (barra gris).

Un período de 10 minutos después de la adición de GBZ se tomó como ventana de tiempo para calcular los valores AUC. Todos los trazos representan experimentos individuales que corresponden a condiciones pareadas dentro del mismo cultivo. Se analizaron cinco cultivos independientes y todos los datos se expresan como el valor de la media \pm SEM; n = 5. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de *Student* para datos no apareados. * P <0,05.

Conclusiones de resultados objetivo específico I:

Los resultados mostrados en las figuras 1 a 4 utilizando tanto el modelo de actividad neuronal inducida por HFFS y de aumento de la actividad espontánea del cultivo por tratamiento con Gabacina muestran que la liberación de Ca^{2+} mediada por los Receptores de Ryanodina (RyR) y en particular por la isoforma RyR2, contribuye al aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ nuclear.

5.-Los A β O_s alteran los transitorios de Ca²⁺ en el núcleo inducidos por aumento de actividad sináptica.

Los A β O_s son consideradas las principales sinaptotoxinas responsables del desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer. Trabajos anteriores del laboratorio mostraron que el tratamiento con 500 nM A β O_s genera un aumento sostenido, pero de baja amplitud, de los niveles de Ca²⁺ citoplasmático neuronal, que es dependiente de la activación de los receptores NMDA y de la liberación de Ca²⁺ a través de los canales RyR, (Paula-lima et al., 2011). A diferencia de las señales de Ca²⁺ revisadas previamente, este tipo de señales de baja amplitud y frecuencia se caracterizan por inducir la actividad de proteínas fosfatasa y promover los procesos de LTD (Paula-Lima et al., 2014; Hidalgo and Arias-Cavieres, 2016). En este trabajo, primero determinamos el efecto agudo del tratamiento con A β O_s, sobre los niveles de Ca²⁺ en el núcleo neuronal, utilizando el sensor GCaMP3-NLS. La incubación con 500 nM A β O_s produjo un aumento lento, sostenido y de baja intensidad en los niveles de [Ca²⁺] nuclear (Figura 5A), mostrando un claro contraste con los transitorios de Ca²⁺ nucleares inducidos por el aumento de actividad neuronal inducida por GBZ (Figura 5B).

Luego, determinamos el efecto del tratamiento con A β O_s por 6 horas antes de adicionar Gabacina (Figura 5C). Las neuronas que fueron incubadas por 6 horas con los A β O_s mostraron una disminución en las señales de Ca²⁺ nucleares inducidas por Gabacina (Figuras 5D-E). Estos resultados muestran que los A β O_s alteran las señales de Ca²⁺ nucleares inducidas por aumento de actividad neuronal.

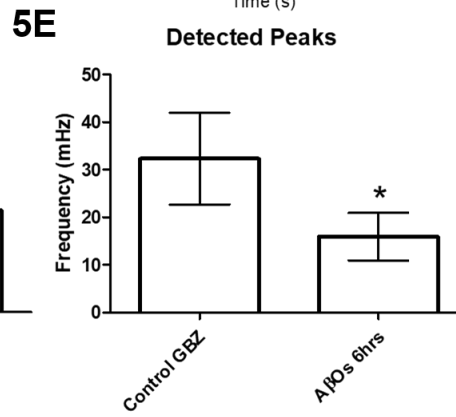
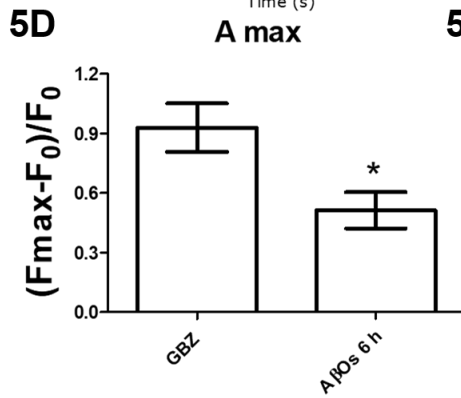
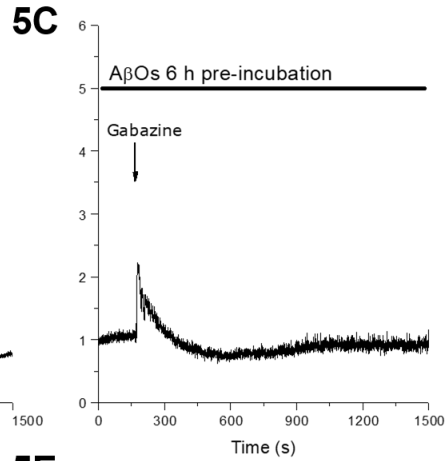
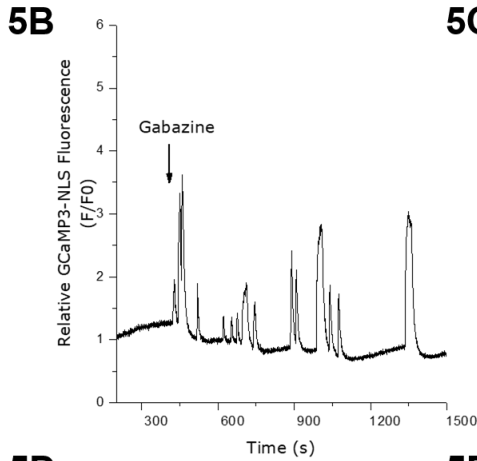
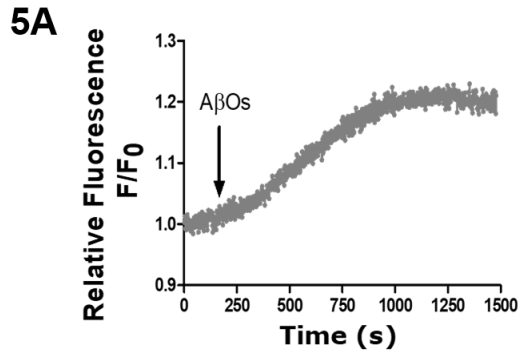


Fig. 5.- El tratamiento con A β Os disminuye los transitorios de Ca $^{2+}$ en el núcleo inducidos por GBZ.

- A) Trazo representativo de los cambios en el tiempo de los niveles de Ca $^{2+}$ nuclear registrados en una neurona transfectada con GCaMP3.NLS antes (línea de base) y después de la adición de 500 nM A β Os en el momento indicado (flecha).
- B) Trazos representativos del promedio de las señales de Ca $^{2+}$ nuclear registradas en neuronas transfectadas con GCaMP3.NLS antes (línea de base) y después de la adición de 10 μ M GBZ (flecha) a cultivos primarios de hipocampo controles.
- C) Trazos representativos del promedio de las señales de Ca $^{2+}$ nuclear registradas en neuronas transfectadas con GCaMP3.NLS antes (línea de base) y después de la adición de 10 μ M GBZ (flecha) a cultivos primarios de hipocampo previamente incubados por 6 horas con 500 nM A β Os.
- D) Cuantificación que indica los valores promedios de fluorescencia máxima alcanzada, expresados como $(F_{max} - F_0) / F_0$, registrados en el núcleo después de la adición de GBZ a cultivos de control o cultivos previamente incubados por 6 horas con A β Os 500 nM.
- E) Valores promedios de la frecuencia (mHz) de aparición de espontáneos de transitorios de Ca $^{2+}$ nuclear en el núcleo de neuronas transfectadas con GCaMP3.NLS, detectados tras la adición de GBZ en cultivos control o cultivos previamente incubados por 6 horas con A β Os 500 nM.

Un período de 10 minutos después de la adición de GBZ se tomó como ventana de tiempo para calcular la frecuencia de las señales detectadas. Todos los trazos representan experimentos individuales que corresponden a condiciones pareadas dentro del mismo cultivo; Se analizaron seis cultivos independientes y todos los datos se expresan como el valor de la media \pm SEM; n = 5. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de *Student* para datos no apareados. * P <0,05.

6.-El tratamiento con Gabacina induce un aumento en la actividad neuronal que desencadena la activación e inducción de genes de respuesta temprana y de enzimas antioxidantes.

El incremento de actividad sináptica desencadena una respuesta funcional expresada en la inducción temprana de cambios en la expresión génica, comandados en un principio y entre otros factores, por el factor transcripcional CREB, que se activa por aumentos de Ca^{2+} /CaM en el núcleo induciendo su fosforilación nuclear por distintas quinasas. La activación de CREB es fundamental para la inducción y conservación de distintos procesos involucrados en la plasticidad sináptica (Deisseroth et al., 1998; Benito and Barco, 2010). Para determinar si el aumento de actividad sináptica inducido por GBZ induce la activación de CREB en nuestro modelo, las neuronas fueron tratadas con GBZ por 30 minutos, 1 o 2 horas, luego se fijaron y se detectó la activación de CREB por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra la forma fosforilada de CREB (ser-133 p-CREB, verde en imagen) y otro anticuerpo contra la proteína asociada microtúbulo MAP2A para localizar su presencia en neuronas (rojo en imagen), además de teñidas con DAPI para detectar todos los núcleos celulares (azul en imagen). Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con GBZ produjo un aumento significativo y progresivamente mayor en amplitud en la fosforilación de CREB en las neuronas tratadas con GBZ por 30 min, 1 y 2 horas (panel en figura 6A y cuantificación en 6B).

El aumento de la actividad neuronal inducido por GBZ, en conjunto con generar la activación de CREB, propicia una rápida activación de la maquinaria encargada del acoplamiento excitación-transcripción, comandada por un rápido aumento de la expresión de genes de respuesta temprana IGEs (Yap and Greenberg, 2018). En concordancia, el tratamiento de los cultivos hipocámpales con GBZ por 2 y 6 horas indujo un aumento significativo en los niveles de expresión del mRNA de Npas4, además de la expresión del propio Ryr2 (figura 6C). Además, el aumento de actividad neuronal desencadena una respuesta neuroprotectora, expresada en parte por la activación y aumento de los genes de la respuesta antioxidante junto a factores neurotróficos. En nuestro modelo tras el tratamiento con GBZ por 2 horas observamos un aumento significativo en el nivel del mRNA del factor neurotrófico BDNF y de las enzimas antioxidantes, Nqo1 y GCL (figura 6D).

Estos resultados muestran que el protocolo de incremento de actividad sináptica por tratamiento con Gabacina, induce la activación e inducción de programas relacionados a la plasticidad sináptica y respuesta neuro-protectora

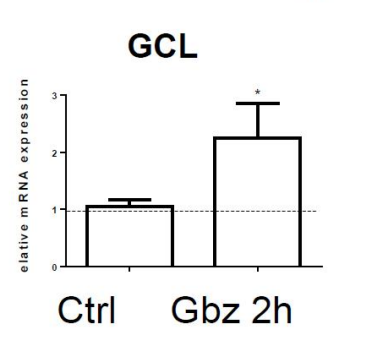
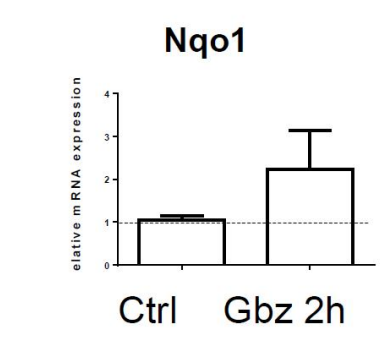
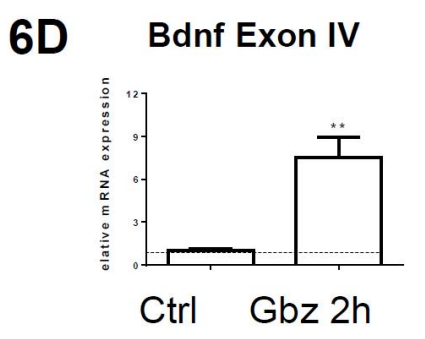
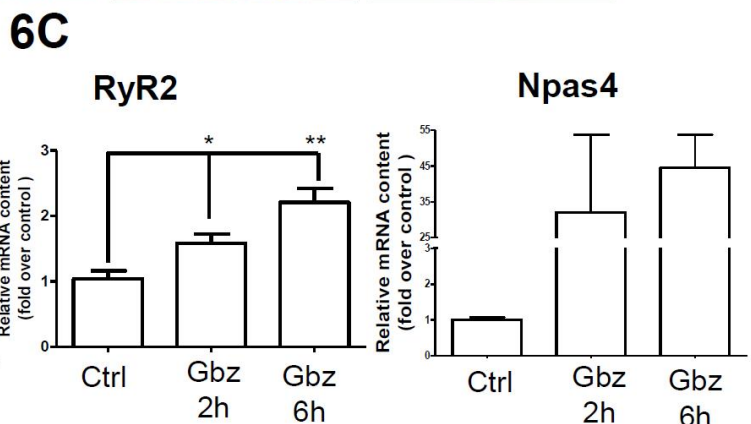
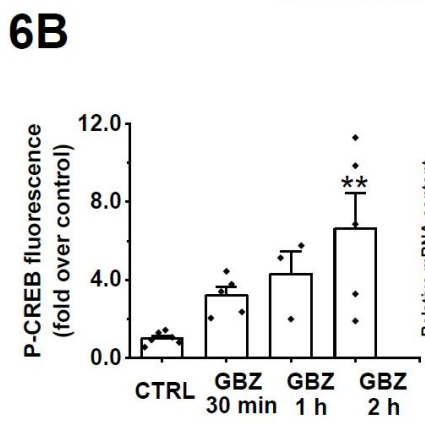
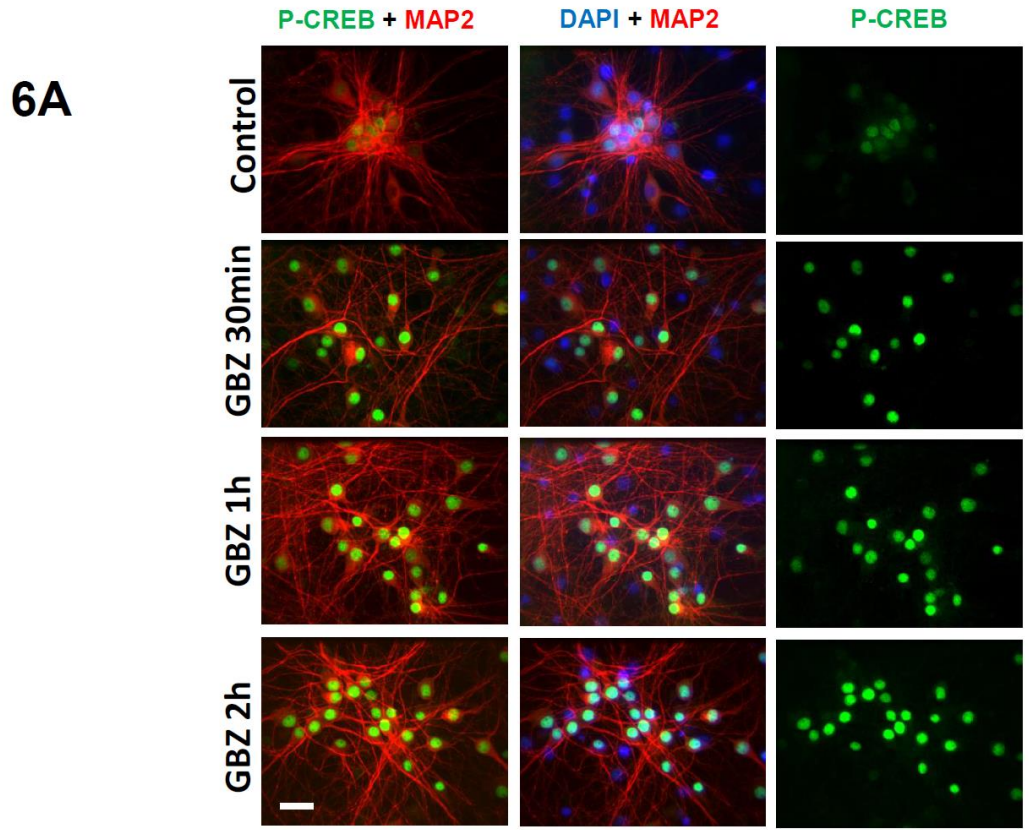


Fig. 6.- El tratamiento con GBZ induce un incremento en la fosforilación de CREB y un aumento en los niveles de mRNA de Npas4, RyR2, Bdnf y los genes de enzimas antioxidantes Nqo1 y GCL.

- A) Panel de imágenes representativas del cultivo de neuronas hipocampales inmuno-teñidas con anticuerpos contra p-CREB (verde) y el marcador neuronal MAP2 (rojo); además se muestran los núcleos celulares marcados con DAPI (azul). Cada fila muestra los cultivos controles o aquellos que se trataron con GBZ 5 μ M durante 0,5, 1, o 2 h respectivamente. Todas las imágenes muestran la composición de 2 o más colores superpuestos según se indica en la parte superior (p-CREB+MAP2; MAP2+DAPI; P-CREB+MAP2+DAPI) respectivamente, todas las imágenes ilustran la suma de la fluorescencia en Z de todos planos confocales adquiridos en un microscopio *Spinning-Disk*, objetivo 40x en la esquina inferior izquierda se muestra la barra de escala: 30 μ m.
- B) Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia de P-CREB (ser-133), las barras representan los valores de la media \pm SEM, n = 3 (se cuantificaron entre 133 a 394 núcleos por condición). Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron mediante ANOVA seguido por el post-test para comparaciones múltiples Bonferroni. **: p <0,01.
- C) Niveles relativos de mRNA de RyR2 y Npas4 en cultivo de neuronas tratadas con GBZ por 2 y 6 horas determinados por qPCR y normalizados por los niveles de mRNA de β -actina y expresados como veces sobre el nivel de cultivos control.
- D) Niveles relativos de mRNA de Bdnf exón IV; NADPH-Quinona-oxido-reductasa-1 (Nqo1) y Glutamato-Cisteína-Ligasa (GCL) en cultivo de neuronas tratadas con GBZ por 2 y 6 horas determinados por qPCR y normalizados por los niveles de mRNA de β -actina y expresados como veces sobre el nivel de cultivos control.

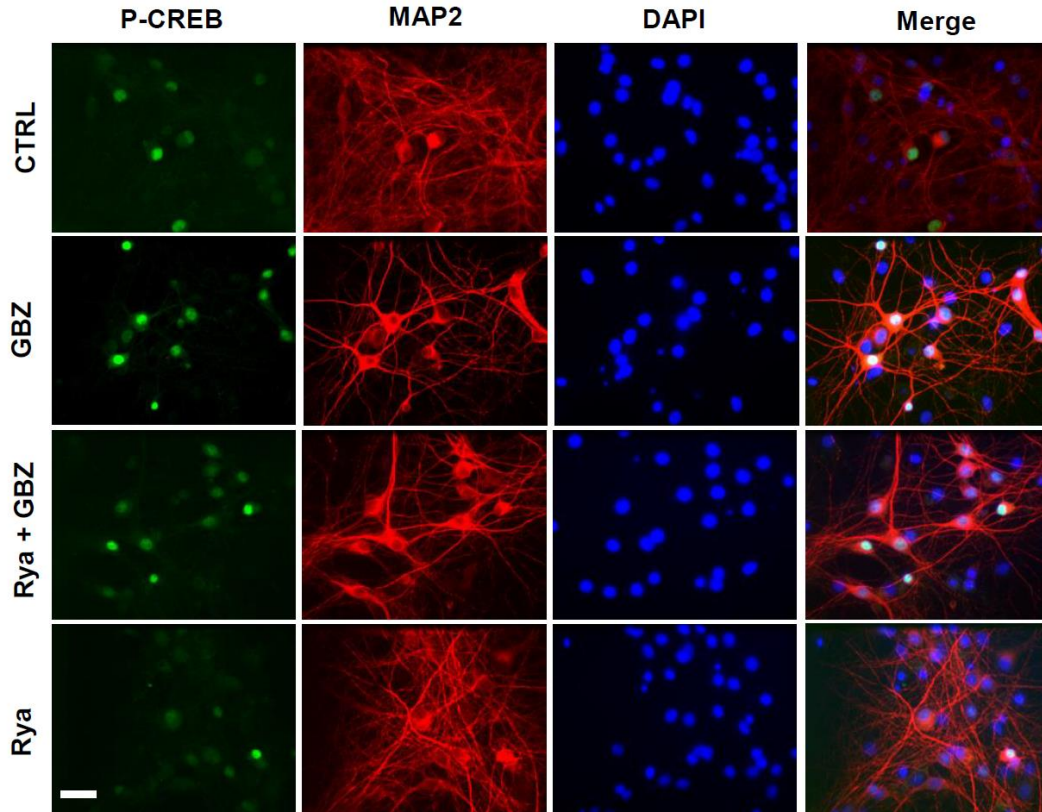
Los valores de las barras representan la media \pm SE; n = 3 a 5. Las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. * P <0,05; ** P <0,01, *** P <0,001.

7.-La liberación de Ca²⁺ mediada por los canales RyR contribuyen a la activación de CREB y al aumento del mRNA de Npas4 y RyR2 inducido por aumento de la actividad neuronal.

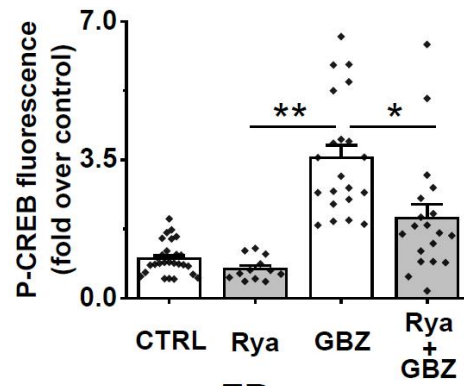
Si bien en los resultados anteriores se determinó la participación de la liberación de Ca²⁺ mediada por los canales RyR en la producción de señales de Ca²⁺ nucleares inducidas por E.E. o por incremento de actividad neuronal, primariamente de actividad sináptica, no estaba claro si la magnitud de este efecto implicaba necesariamente la modulación funcional de la inducción de cambios en la expresión de genes por actividad sináptica. Para determinar la participación de la actividad de los canales RyR en la activación de la respuesta transcripcional, las neuronas se trataron con Ryanodina inhibitoria (1 hora a 50 μ M) y se determinó la activación de CREB en neuronas (P-CREB) por inmunofluorescencia o los niveles del mRNA de Npas4, Bdnf y RyR2 mediante RT-qPCR en neuronas tratadas con GBZ por 2 horas. Los resultados del panel de la figura 7A, muestran que las neuronas tratadas con Ryanodina inhibitoria presentaron una reducción en los niveles de p-CREB comparados con las neuronas tratadas sólo con Gabbacina por 2 horas (cuantificación en figura 7B). La disminución en la activación de CREB, también se vio corroborada con una disminución del aumento de mRNA de Npas4 y de RyR2 inducidos por el tratamiento con Gabacina por 2 horas, en las neuronas tratadas con Ryanodina inhibitoria (figuras 7C y 7D).

En conjunto estos resultados destacan la participación de la liberación de Ca²⁺ mediada por los canales RyR en la inducción de la respuesta transcripcional inducida por el aumento de la actividad neuronal, primariamente sináptica, por el tratamiento con GBZ por 2 horas. En particular cabe destacar que la reducción en los niveles de fosforilación de CREB y los mRNA detectados están en proporción similar a la reducción encontrada de las señales de Ca²⁺ nuclear, sugiriendo que efectivamente los niveles de señalización de Ca²⁺ nuclear corresponde a un biomarcador que se traduce en respuestas fisiológicas funcionales.

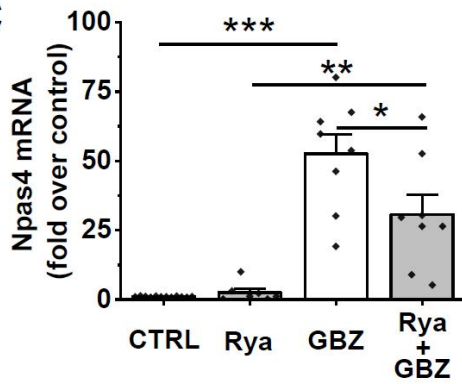
7A



7B



7C



7D

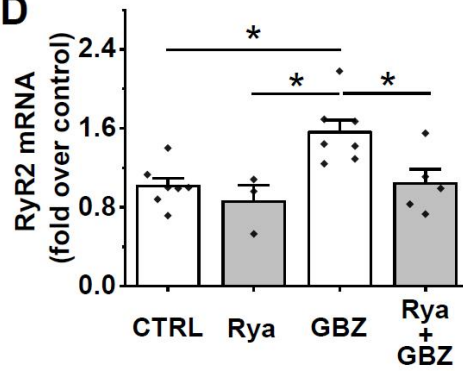


Fig. 7.- La liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR contribuyen al aumento de la fosforilación de CREB y al incremento de mRNA de Npas4 y RyR2 inducido por GBZ.

- A) Panel de imágenes representativas de cultivos de hipocampo controles y de cultivos pre-incubados durante 1 h con 50 μ M ryanodina antes de la adición de GBZ; se muestra la marca correspondiente a anticuerpos contra P-CREB (verde) y el marcador neuronal MAP2 (rojo), además de los núcleos celulares marcados con DAPI (azul). Cada fila muestra los cultivos controles o aquellos que se trataron con GBZ 5 μ M durante 2 horas y/o Ryanodina inhibitoria respectivamente. Todas las imágenes muestran la composición de 2 o más colores superpuestos según se indica en la parte superior (P-CREB; MAP2; DAPI; o la superposición de los canales *Merge*: PCREB+MAP2+DAPI) respectivamente, todas las imágenes ilustran la suma de la fluorescencia en Z de todos planos confocales adquiridos mediante microscopia *Spinning-Disk*, objetivo 40x, en la esquina inferior izquierda se muestra la barra de escala correspondiente a 30 μ m.
- B) Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia de P-CREB (ser-133), las barras representan los valores de la media \pm SEM, n = 3 . Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron mediante ANOVA seguido por el post-test para comparaciones múltiples Bonferroni. **: p <0,01.
- C) Niveles relativos de Npas4 mRNA de determinados por qPCR en cultivos de neuronas tratadas con GBZ por 2 horas y/o pre-incubados durante 1 h con 50 μ M ryanodina y normalizados por los niveles de mRNA de β -actina; los valores se expresan como veces sobre el nivel de los cultivos control.
- D) Niveles relativos de RyR2 mRNA determinados por qPCR en cultivos de neuronas tratadas con GBZ por 2 horas y/o pre-incubados durante 1 h con 50 μ M ryanodina y normalizados por los niveles de mRNA de β -actina; los valores se expresan como veces sobre el nivel de los cultivos control.

Los valores de las barras representan la media \pm SE; n = 3 a 5. Las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. * P <0,05; ** P <0,01, *** P <0,001. Los valores de P exactos fueron 0.01478 para B; $1,43 \times 10^{-8}$, 0,00232 y 0,01478 para C; y 0.01308, 0.01293 y 0.03654 para D.

8.- El tratamiento con A β O_s disminuye la fosforilación de CREB y previene el incremento en los niveles de mRNA de Npas4, Bdnf, GCL y Nqo1 inducidos por el incremento de la actividad sináptica causado por GBZ.

Los protocolos de aumento de actividad sináptica inducen la respuesta de un programa de neuroprotección incluyendo la activación e incremento de la expresión de factores neurotróficos y enzimas de la respuesta antioxidante mediados por vías de señalización que involucran los receptores de NMDA y la producción de señales de Ca²⁺ nucleares (Papadia et al., 2008; Zhang et al., 2009). Además varios trabajos han mostrado que los A β O_s provocan estrés oxidativo y una disminución de la expresión de factores neurotróficos como un evento temprano en el desarrollo de la sinaptotoxicidad y neurodegeneración (Sebollela et al., 2012; Ferreira et al., 2015) y en particular el desarrollo temprano de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una desregulación de los mecanismos de control de la actividad neuronal (Frere and Slutsky, 2018). Para determinar que efectivamente, el tratamiento con A β O_s interrumpe funcionalmente la inducción de la actividad sináptica y los cambios en la expresión génica inducidos por GBZ, determinamos los niveles de p-CREB (ser-133), mediante inmunofluorescencia de manera análoga a los resultados anteriores.

Las neuronas tratadas con 500 nM A β O_s por 6 horas y luego incubadas con 5 μ M GBZ por 30 minutos mostraron niveles significativamente menores de CREB fosforilado, comparados con las incubadas sólo con GBZ por 30 minutos (figura 8A y cuantificación en figura 8B). Por último, también evaluamos los niveles de expresión de los mRNA de Npas4 y Bdnf exón IV (figura 8 C) y los niveles de las enzimas antioxidantes GCL y Nqo1 (figura 8D) en neuronas tratadas con 500 nM A β O_s por 6 horas y luego incubados con 5 μ M GBZ por 2 horas, encontrando una reducción de la inducción del incremento de estos marcadores en las neuronas pre-incubadas con los A β O_s.

En conjunto estos resultados muestran que la incubación con los A β O_s, en concordancia con la disminución de las señales de Ca²⁺ nucleares, también interrumpen tanto el incremento de los marcadores de la actividad neuronal (CREB, Npas4 y Bdnf) como la activación de la respuesta neuroprotectora antioxidante por Nqo1 inducida por el aumento de la actividad sináptica causado por Gabacina.

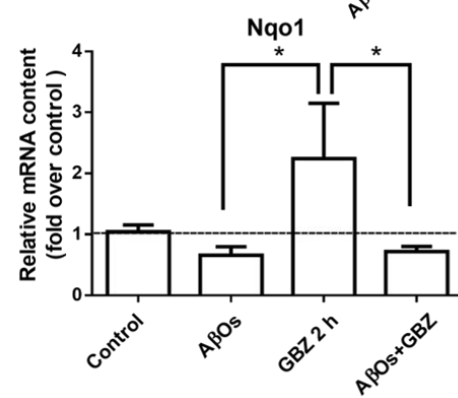
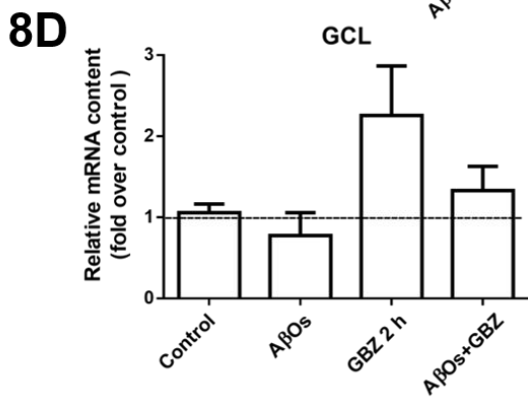
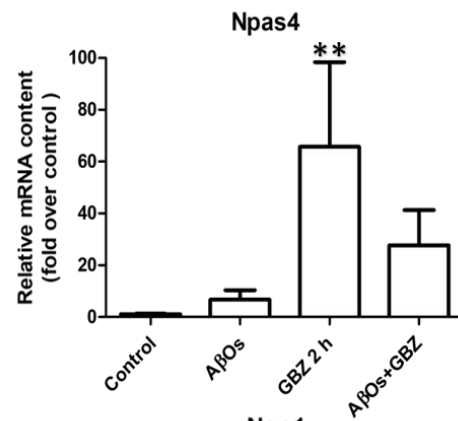
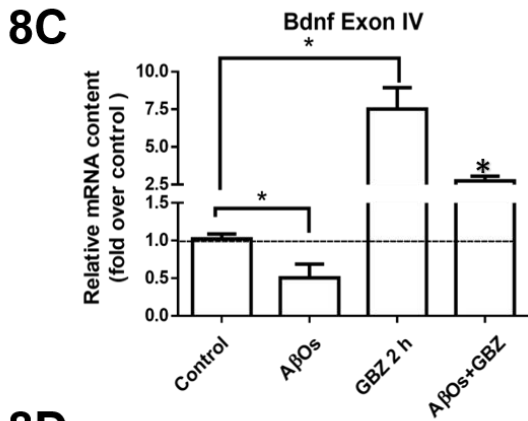
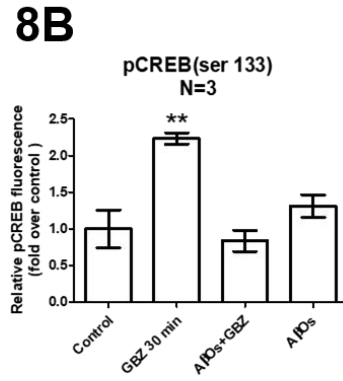
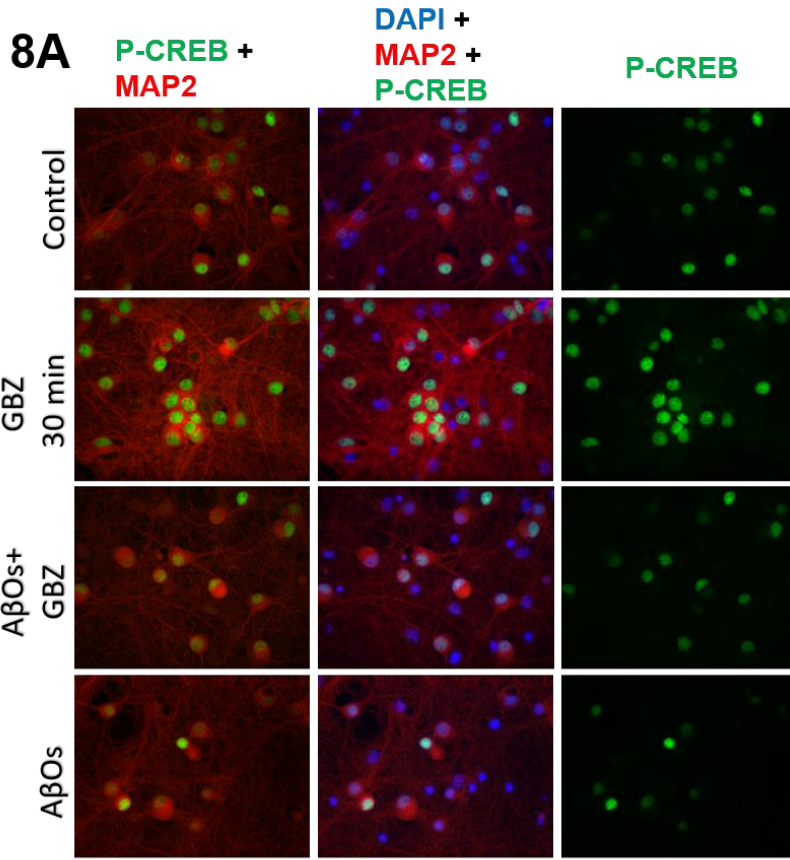


Fig. 8.- Los A β O_s disminuyen la fosforilación de CREB y reducen el incremento en los niveles de mRNA de Npas4, Bdnf, GCL y Nqo1 inducidos por GBZ.

- A) Panel de imágenes representativas de cultivos de hipocampo controles y/o de cultivos pre-incubados durante 6 horas con 500 nM A β O_s antes de la adición de GBZ; se muestra la marca correspondiente a anticuerpos contra P-CREB (verde) y el marcador neuronal MAP2 (rojo), además de los núcleos celulares marcados con DAPI (azul). Cada fila muestra los cultivos controles o aquellos que se trataron con GBZ 5 μ M durante 30 minutos y/o durante 6 horas con 500 nM A β O_s, respectivamente. Todas las imágenes muestran la composición de 2 o más colores superpuestos según se indica en la parte superior (P-CREB+MAP2; P-CREB+MAP2+DAPI; P-CREB), todas las imágenes ilustran la suma de la fluorescencia en Z de todos planos confocales adquiridos mediante microscopia Spinning-Disk, objetivo 40x.
- B) Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia de P-CREB (ser-133); las barras representan los valores de la media \pm SEM, n = 3. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron mediante ANOVA seguido por el post-test para comparaciones múltiples Bonferroni. **: p < 0,01.
- C) Niveles relativos de mRNA de Npas4 y Bdnf exón IV determinados por qPCR en cultivos de neuronas tratadas con GBZ por 2 horas y/o pre-incubados durante 6 horas con 500 nM A β O_s y normalizados por los niveles de mRNA de β -actina; los valores se expresan como veces sobre el nivel de los cultivos control.
- D) Niveles relativos de mRNA de Nqo1 y GCL determinados por qPCR en cultivos de neuronas tratadas con GBZ por 2 horas y/o pre-incubados durante 6 horas con 500 nM A β O_s y normalizados por los niveles de mRNA de β -actina; los valores se expresan como veces sobre el nivel de los cultivos control.

7. Conclusiones.

Respecto al Objetivo específico I:

“Estudiar la participación de la liberación de Ca^{2+} mediada por los Receptores de Ryanodina (RyR) en el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ nuclear inducido por Gabacina y estímulo eléctrico de campo”.

“Los resultados (Figuras 1, 2, 3 y 4) revelan la contribución de la liberación de Ca^{2+} mediada por los Receptores de Ryanodina (RyR) en el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ nuclear inducido por aumento de actividad neuronal (protocolo de HFFS y protocolo de tratamiento con GBZ).”

Objetivo específico II:

“Determinar si el tratamiento con A β O_s modifica la generación de señales de Ca^{2+} nucleares inducidas por Gabacina”.

Los resultados de la Figura 5 muestran que las neuronas que fueron incubadas por 6 horas con los A β O_s presentaron una disminución en las señales de Ca^{2+} nucleares inducidas por aumento de actividad sináptica con GBZ.

Objetivo específico III:

“Determinar la participación de los Receptores de Ryanodina y el efecto de los A β O_s en la activación de Npas4 y la expresión de enzimas de respuesta antioxidante (Nqo1 y Gcl) inducidas por gabacina.”.

Los resultados (Figuras 6, 7 y 8) revelan que la incubación con los A β O_s, en concordancia con la disminución de las señales de Ca^{2+} nucleares (objetivo II), también interrumpen tanto el incremento de los marcadores de la actividad neuronal (CREB, Npas4 y Bdnf) como la activación de la respuesta neuroprotectora antioxidante (GCL y Nqo1) inducida por aumento de actividad sináptica mediante GBZ.

8. Discusión.

Acostumbramos a pensar en nuestro cerebro como un potente ordenador que recibe e integra las percepciones de nuestro ambiente, respondiendo ágilmente ante ellas mediante la activación de una cascada de eventos conservada y finamente organizada que culminan por imponer una respuesta directa y eficaz ante el estímulo inicial. Hoy en día entendemos que las células de nuestro cerebro conforman una compleja red de interacciones dinámicas entre sus distintos actores, siempre en constante cambio y adaptación, integrando tanto los estímulos del ambiente como los estados de su medio interno. Así hemos aprendido que cada nueva experiencia reconfigura constantemente la estructura misma que sostienen estas funciones. Mantener este delicado balance es quizás una de las características más sorprendentes del cerebro (Maturana and Varela, 2004). Las señales de Ca^{2+} producidas en las espinas dendríticas por distintos estímulos de actividad neuronal, así como sus mecanismos de propagación y amplificación para alcanzar el soma y núcleo neuronal corresponden a un ejemplo clásico de mecanismo altamente especializado de transmisión de la información desde las sinapsis al núcleo, su estudio nos otorga las pistas clave para acercarnos a entender los procesos que dan a lugar a la aparición de fenómenos cognitivos más complejos, como el aprendizaje y la memoria, y también poder diseñar herramientas eficaces que logren recuperar y/o prevenir procesos patológicos como la adicción, depresión y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Cohen and Greenberg, 2008).

Contribución de la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR en la comunicación entre sinapsis y la producción de señales de Ca^{2+} en el núcleo.

Las señales de Ca^{2+} mejor caracterizadas son consecuencia de la apertura de canales de calcio presentes en la membrana plasmática como NMDAr y VGCC y por tanto corresponden al ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Estas señales generalmente son rápidas y de amplitud moderada y por las restricciones de difusión del Ca^{2+} necesariamente requieren de mecanismos que permitan su propagación al núcleo para controlar la transcripción dependiente del Ca^{2+} nuclear (Bading, 2013). En la actualidad se han propuesto varios mecanismos que pueden contribuir a la producción de estas señales. Las señales de Ca^{2+} nuclear pueden producirse por

la difusión o translocación nuclear de proteínas reguladas por Ca^{2+} como quinasas o fosfatasa activadas por Ca^{2+} , sin embargo estos mecanismos requieren de al menos varios segundos o minutos (Jordan and Kreutz, 2009). Otro mecanismo extremadamente rápido de comunicación postulado corresponde a la propagación de actividad electroquímica hasta el soma, donde la activación local de los canales iónicos en espinas dendríticas desencadena potenciales de acción que llegan al soma en milisegundos, lo que conduce a la apertura de los canales de VGCC somáticos que producen señales de Ca^{2+} somáticas que activan directamente mediadores sensibles a señales de Ca^{2+} que translocan al núcleo (Ch'ng and Martin, 2011). Un tercer mecanismo propuesto corresponde a la producción de ondas regenerativas de liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico, para esto la entrada de Ca^{2+} por canales en la membrana plasmática induce la activación de RyR y liberación de Ca^{2+} mediada por Ca^{2+} (CICR) que en conjunto con la activación de IP3R vecinos amplifican y propagan la señal a lo largo de la dendrita hasta alcanzar el compartimento somato-nuclear.

Los resultados de este trabajo apuntan a una contribución de la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR y en particular la isoforma RyR2 en la producción de señales de Ca^{2+} en el núcleo inducidos por protocolo de estimulación local y global, como el tratamiento con gabacina (GBZ), estimulación de campo de alta frecuencia y liberación de glutamato en las dendritas (Lobos et al., 2021). La contribución adicional de otros mecanismos complementarios como la participación de los IP3R, la isoforma RyR3 o la intervención de canales de la membrana plasmática como los L-VGCC, NMDAr o los mGluR que probablemente también forman parte de las cascadas activadas por los protocolos utilizados deberán ser parte de futuras investigaciones.

Contribución conjunta de los canales de la membrana plasmática mGluR, NMDAr y VGCC en la propagación de la señales de Ca^{2+} al núcleo.

Existe diversa evidencia respecto a la contribución de los canales NMDAr, AMPA y VGCC en la señales de Ca^{2+} inducidas por distintos modelos de actividad, (Bengtson et al., 2010; Bading, 2013), sin embargo la actividad excitatoria glutamatérgica además de los receptores ionotrópicos (iGluR) también involucra la receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), quienes en conjunto con los iGluR complementan y permiten la adecuada función de las sinapsis y circuitos

excitatorios en una amplia gama de escalas espaciales y temporales (Reiner and Levitz, 2018). En particular los mGluR se encuentran en la base de las espinas y en otros sitios extrasinápticos donde permiten la producción de IP₃ y la posterior liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico vía IP₃R contribuyendo a la propagación de señales de Ca²⁺ al soma y núcleo en conjunto con los RyR mediante la liberación de Ca²⁺ mediada por Ca²⁺ (Ross, 2012).

La visualización de las sinapsis excitatorias a escala de moléculas únicas ha permitido comprender mejor el rol de los diferentes canales en la producción de señales de Ca²⁺ en espinas dendríticas, en particular utilizando técnicas de microscopia de superresolución en cultivo de neuronas hipocámpales se ha determinado la existencia de nanodominios formados por la coorganización y distribución específica de los AMPAR, NMDAR y mGluR en las sinapsis excitatorias (Goncalves et al., 2020). En concordancia otros trabajos previos han mostrado estrecha cooperación entre mGluR y NMDAR (O'Neill et al., 2018) o entre los mGluR y los L-VGCC (Kato et al., 2012) sin embargo la evidencia de la contribución de los mGluR a la producción de señales de Ca²⁺ es diversa. Desde hace varios años se conoce que la utilización de agonistas específicos de los mGluR en conjunto con el ingreso de Ca²⁺ por actividad eléctrica induce la producción de ondas de Ca²⁺ dendríticas y somáticas mediadas por la activación de IP₃Rs poniendo en relevancia este mecanismo de propagación (Nakamura et al., 2000), los mismos autores (Nakamura et al., 2002) luego determinaron una contribución sinérgica de distintos mecanismos de producción de señales de Ca²⁺, incluyendo la activación de NMDAR y VGCC que en conjunto con los mGluR contribuyen a la generación y potenciación de ondas de Ca²⁺ en distintos sitios de dendritas en neuronas piramidales de CA1. Por su parte en el trabajo de (Watanabe et al., 2006) determinaron que para lograr la propagación efectiva de estas señales de Ca²⁺ de las dendritas al soma neuronal, se requiere de la activación de receptores en el soma para alcanzar niveles de IP₃ suficientes para producir señales de Ca²⁺ somáticas efectivas que puedan aportar a la activación de la expresión génica nuclear.

Aún más otros trabajos más recientes (Lee et al., 2016) mostraron que la activación de los mGluRs no contribuyen en la propagación de la señal de Ca²⁺ inducida por desenjaulamiento de glutamato en espinas dendríticas, mientras que la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ mediada por los RyR si contribuye en este modelo. Además en el trabajo de (Reese and Kavalali, 2015) determinaron que la producción de espontáneos de Ca²⁺ en espinas dendríticas dependen de la

actividad de los NMDAr y son sensibles a Ryanodina inhibitoria corroborando la participación de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} mediada por RyR en estos procesos, sin embargo en este mismo estudio determinaron que los mGluRs no contribuyen a la producción de estas señales de Ca^{2+} . Por lo tanto, aun falta esclarecer el rol específico que tiene la activación de los mGluR para la propagación de señales de Ca^{2+} globales que efectivamente contribuyan a la activación de la expresión génica producto de señales de Ca^{2+} nucleares.

No obstante estos resultados, otros trabajos han mostrado que la activación de los mGluR también se relaciona con consecuencias funcionales; en el trabajo de (Welsby et al., 2006) la activación de los mGluRs en conjunto con los NMDAr y los canales RyR contribuyen a la potenciación de la LTP mediada por agonistas nicotínicos. Además, otros trabajos también han corroborado la existencia de formas particulares de LTP mediadas por la activación de mGluRs (Wang et al., 2016), inclusive y más recientemente (Ghosh Dastidar et al., 2020) se ha determinado la regulación diferencial de la síntesis proteica y bioenergética neuronal mediante la activación específica de mGluR que inhiben la AMPK y activan la traducción proteica o de NMDAr que activan la AMPK e inhiben la traducción proteica. En resumen, no podemos descartar la participación de los mGluR en la producción de las señales de Ca^{2+} inducidas por la estimulación eléctrica, farmacológica o la producción de señales de espontaneas producto del incremento de actividad neuronal. Probablemente, su verdadera contribución y la discrepancia de resultados entre distintos trabajos se deba a diferencias entre los modelos y protocolos de estimulación utilizados. Por lo tanto, los mGluR efectivamente cumplen un papel importante en la regulación de las funciones neuronales producto de la actividad sináptica, y cada día avanza más el conocimiento de los diversos modos de activación y señalización mediadas por los mGluR que pueden proporcionar una regulación sofisticada de la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica siendo un blanco activo para el desarrollo de estrategias farmacológicas (Stansley and Conn, 2019).

Contribución de la isoforma RyR2 a la propagación de la señal de Ca^{2+} al núcleo y control de la actividad neuronal.

Durante el transcurso de esta tesis, publicaciones recientes, en conjunto con estudios publicados por el laboratorio (More et al., 2018b; Lobos et al., 2021; Ramírez et al., 2021) han revelado el papel central del RE y en particular de los canales RyR, en los procesos de plasticidad sináptica. A nivel

de sinapsis y de espinas dendríticas, un estudio reciente (Basnayake et al., 2019), que combina trabajos experimentales *in vitro* y *ex vivo* con modelos matemáticos, muestra la contribución de la extensión del RE en las espinas, en el llamado aparato espinoso, para la amplificación de la señal, y en particular el efecto de los niveles y la distribución de los canales RyR, en conjunto con las SERCA-ATPasas, en el control de la cinética de las señales de Ca^{2+} locales que se producen en las espinas dendríticas por desenjaulamiento de glutamato local y potenciales de acción retropropagados. Por otro lado, otro trabajo reciente (Bertan et al., 2020), utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* de Knock-Out de RyR2, destaca el papel de esta isoforma en particular, en la mantención y el remodelamiento de espinas dendríticas y funcionalmente en el aumento en la excitabilidad e hiperactividad neuronal como consecuencias compensatorias de la disminución de RyR2. Este trabajo complementa un estudio anterior de nuestro grupo, que demostró la necesidad de tener canales RyR funcionales para inducir el remodelamiento de espinas dendríticas que causa BDNF (Adasme et al., 2011). En este contexto también se ha determinado que la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR, y por la isoforma RyR3 en particular, participa en regular la amplitud y potenciación de la hiperpolarización lenta tardía sAHP en neuronas piramidales del hipocampo, destacando de esta manera su involucramiento en el control de la excitabilidad neuronal (Tedoldi et al., 2020)

A nivel de compartimentos neuronales somato-dendríticos y regiones perinucleares, se ha determinado la localización y funcionalidad de los canales RyR junto al canal de K^+ activado por voltaje Kv2.1 en un complejo que controla la cercanía espacial y funcional de microdominios de la membrana plasmática y el RE (PM-RE) (Vierra et al., 2019).. También en la misma línea se estableció la existencia de un complejo tripartito entre los canales en la membrana plasmática CaV1-KCa3.1 y el RyR2 determinados mediante microscopía de superresolución dSTORM combinada con adquisición tipo TIRF y el uso de FRET para estudios dinámicos (Sahu et al., 2019). Específicamente, se mostró en este último trabajo que la formación y cercanía de este complejo estaría regulada por las proteínas Junctophilin (JPH) que participa en la regulación de la excitabilidad neuronal afectando la sAHP. En un trabajo aún más reciente (Perni and Beam, 2021), se corroboran y amplían estos resultados estableciendo la posible formación de complejos entre todas las isoformas de los canales RyR (RyR1, RyR2 y RyR3) con las JPH3 y JPH4 junto a diferentes isoformas de los CaV.2.1 y CaV.2.2. Por último, otro trabajo ha determinado el papel de los canales RyR, esta vez presentes en axones de neuronas de corteza de ratón, donde

descubrieron el acoplamiento funcional de los canales RyR con el canal CaV3 para producir “*hot spots*” en nanodominios altamente especializados en el segmento inicial del axón (AIs), un compartimento neuronal especializado que controla la transformación del input sináptico en la producción de potenciales de acción (Lipkin et al., 2021).

En conclusión, la acumulación de evidencias publicadas por el laboratorio y otros grupos independientes, junto a los resultados de esta tesis, concuerdan en la importancia de la contribución de la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR, y en particular de la isoforma RyR2, para el establecimiento de microdominios especializados de señalización de Ca^{2+} que regularían la estructura y funcionalidad de complejos proteicos en los contactos ER-PM situados en espinas, compartimentos somato-dendríticos y perinucleares, los cuales contribuyen a la comunicación sinapsis-núcleo y su funcionalidad en distintos procesos de plasticidad sináptica.

Dada la estrecha relación entre los canales IP3R y RyR, no es posible descartar la participación de los canales IP3R en la propagación de la señal al núcleo. De hecho, en un trabajo reciente (Chen-Engerer et al., 2019) se muestra que los canales RyR e IP3R funcionan independientemente, con fuentes diferentes de Ca^{2+} reticular separadas. Sin embargo, en un trabajo reciente de nuestro grupo mostramos que la estimulación de la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR contribuye a las señales de Ca^{2+} generadas por estimulación de los canales IP3R (Ramirez et al, 2021), mostrando que ambos tipos de canales interactúan funcionalmente entre ellos. Futuros trabajos deben corroborar la contribución de los canales IP3R y de las otras isoformas de los canales RyR, para lograr entender de mejor manera la contribución de la liberación de Ca^{2+} desde el RE a la comunicación sinapsis-núcleo y el control del proceso de excitación transcripción.

Contribución de los canales RyR a la expresión génica dependiente de actividad sináptica. Papel de la activación de CREB, Npas4 y Bdnf.

La señalización mediada por Ca^{2+} nuclear conecta la actividad neuronal con una respuesta transcripcional, que termina por afectar globalmente distintas funciones neuronales, que involucran cambios metabólicos, energéticos y morfológicos, adaptándolos a las nuevas condiciones (Hagenston et al., 2019). Los IEGs, representan la primera línea de factores transcripcionales que inician y amplifican el proceso de respuesta transcripcional que induce

estos cambios, y figuran como marcadores diferenciales de la respuesta funcional frente a diferentes tipos de estimulación que desencadenen la actividad sináptica (Tyssowski and Gray, 2019). Los resultados de esta tesis aportan nueva evidencia sobre la contribución de la liberación de Ca^{2+} medida por los canales RyR a la activación de factores transcripcionales como CREB y Npas4 y de efectores como Bdnf.

La inducción de Npas4 ha sido destacada como uno de los eventos tempranos más importantes que suceden tras diferentes estímulos de la actividad neuronal (Sun and Lin, 2016). Más aún, trabajos recientes (Sun et al., 2020) (Sharma et al., 2019) han destacado su activación y transcripción altamente específica y controlada, asociada a grupos neuronales y contextos específicos que controlan la actividad neuronal y distinguen funcionalmente aspectos particulares de la representación de la memoria en el hipocampo. Esta selectividad se expresa incluso a nivel subcelular, donde en un trabajo reciente (Brigidi et al., 2019) se determinó dos tipos diferentes de inducción de Npas4, uno local a nivel dendrítico asociado a la activación de NMDAR y producción de EPSPs, y otro somático asociado a la activación de VGCC y producción de APs. Dado que los canales RyR también se han relacionado con estos canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y se han detectado en ambos compartimentos, resulta probable que también contribuyan a uno o ambos mecanismos de inducción de Npas4. Por último, otro trabajo reciente (Funahashi et al., 2019) determinó que la interacción de Npas4 con CBP es incrementada por la fosforilación de Npas4 por las MAPKs, potenciando tanto su actividad transcripcional como la inducción de Bdnf. Los canales RyR, al controlar la activación de las MAPKs (Kemmerling et al., 2007) podrían afectar los niveles de esta modificación post-traducciona l y controlar la expresión de Bdnf dependiente de Npas4.

Los resultados de esta tesis revelan una contribución de los canales RyR en la activación de la expresión génica inducida por actividad neuronal. Sin embargo, existen también otros mecanismos de señalización descritos extensamente en la literatura que no pudieron ser abordados en el presente trabajo (Greer and Greenberg, 2008; Herbst and Martin, 2017; Lim et al., 2017). Una novedosa vía de señalización, determinada en el trabajo de (Perfit et al., 2020) demostró que la asociación de la proteína Shank3 a los VGCC y CaMKII aumenta la fosforilación de CREB y la inducción de c-Fos por estímulos despolarizantes en neuronas hipocampales; la pérdida de Shank3 se ha asociado a modelos de enfermedad del espectro autista ASD e hiperactividad en

zonas de la corteza somatosensorial (Chen et al., 2020). Estas vías de señalización, en conjunto con el aumento del Ca^{2+} nuclear, dan una idea de la magnitud y complejidad de las señalizaciones que controlan la activación e inducción de cambios de la expresión génica inducida por actividad sináptica.

Relevancia de las señales de Ca^{2+} nucleares en la sinaptotoxicidad asociada al péptido β -amiloide y a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

Cada vez más evidencia muestra la relevancia de las alteraciones de la comunicación sinapsis-núcleo, en la sinaptotoxicidad asociada a diferentes desordenes del sistema nervioso central y en particular para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Marcello et al., 2018b). Los resultados del presente trabajo de tesis muestran que el tratamiento con A β Os por 6 horas, disminuye la producción de señales de Ca^{2+} nucleares y reduce la fosforilación del factor transcripcional CREB y la inducción de la expresión de los mRNA de Npas4, Bdnf. y Nqo1.

Si bien el presente trabajo solo fue realizado utilizando un modelo in vitro de sinaptotoxicidad asociada a los A β Os, la evidencia sugiere que estos modelos pueden representar adecuadamente los cambios deletéreos en la homeostasis y la señalización por Ca^{2+} que suceden durante el envejecimiento y la toxicidad del péptido A β (Calvo-Rodriguez et al., 2020). En concordancia, un estudio reciente (Schrank et al., 2020) utilizando iPSC diferenciadas a neuronas de pacientes con mutación en la PS1, determinó en estas células un aumento en la producción de β -amiloide, p-Tau, y fallas en la homeostasis del Ca^{2+} , características que fueron normalizadas utilizando moduladores alostéricos negativos de los canales RyR. Otro estudio (Aloni et al., 2019), determinó la importancia de los canales RyR asociados a sinaptopodina (SP) en espinas dendríticas, en un modelo triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer. Un KO de SP mostró disminución de la actividad de los canales RyR y mejor fenotipo de la enfermedad. En otro trabajo reciente mostraron que la liberación de Ca^{2+} mediada por los canales RyR puede regular la fosforilación de Tau y se asocia con una reducción de la activación neuronal y deterioro cognitivo en macacos Rhesus de edad avanzada (Datta et al., 2021). Por último, otro trabajo reciente (Yao et al., 2020) indica que la sobre activación de la isoforma RyR2 induce hiperactividad neuronal y acumulación de β -amiloide en un ciclo retroalimentativo que desencadena la pérdida de espinas dendríticas, disminución de la memoria y muerte neuronal. Estos procesos fueron prevenidos utilizando el

modulador negativo de RyR2 R-Carvedilol y mediante mutaciones de RyR2 dirigidas a disminuir su actividad. Seguramente, el desarrollo de estrategias farmacológicas que modulen la actividad de los canales RyR seguirá atrayendo el interés para el desarrollo de nuevos fármacos que regulen los procesos neurodegenerativos (Stutzmann, 2021)

Respecto a la disminución de la fosforilación/activación de CREB producida por los A β O y de la inducción de Npas4 y Bdnf desencadenada por incremento de actividad sináptica, la participación central de Npas4 en particular puede resultar novedosa y prometedora en el contexto de la enfermedad de Alzheimer. Recientemente han aparecido estudios que muestran una estrecha relación entre procesos patológicos de la enfermedad de Alzheimer y la activación de vías relacionadas a actividad neuronal. Un trabajo reciente (Opsomer et al., 2020), mostró que el procesamiento de la APP a través del dominio AICD, controla la expresión de Npas4, ayudando a mantener el balance del tono excitatorio/inhibitorio (E/I). La neuroinflamación, estrechamente relacionada a los procesos neurodegenerativos, también parece tener un papel importante. Recientemente un trabajo (Unger et al., 2020) determinó que la infiltración de linfocitos T CD8+ en el hipocampo de un modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer (APP-PS1), altera la expresión de Npas4 y Arc junto a otros genes relacionados a plasticidad sináptica y señalización por Ca²⁺. Por último, en otro estudio (Louis Sam Titus et al., 2019), se determinó que HDAC3 mantiene una represión epigenética basal de la transcripción de Npas4 y Bdnf, destacando el rol de las modificaciones epigenéticas en el control de la actividad neuronal e inducción de IEGs (Herre and Korb, 2019) y posicionándolas como destacados blancos terapéuticos contra la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas (Hwang et al., 2017; Janczura et al., 2018).

Contribución de los canales RyR al control de la actividad y regulación homeostática de las redes neuronales; implicancias en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Las neuronas hipocampales, incluso en sistemas in vitro, forman redes que se mantienen bajo control de una red integrada homeostática, que controla variables como: sincronía, frecuencia de disparos, balance del tono E/I y fuerza sináptica, ajustándolas de acuerdo con los cambios en la actividad de las neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas. Algunas teorías recientes sugieren que las fallas en el control de este sistema representan un evento temprano en la transición desde

un daño a la memoria incipiente y el desarrollo de procesos neurodegenerativos (Frere and Slutsky, 2018). En particular, la exposición a los A β O s y a otros péptidos relacionados con la enfermedad de Alzheimer induce distintos efectos en la excitabilidad neuronal y altera la dinámica de las redes neuronales. Entender este proceso puede tener profundas implicaciones para comprender la complejidad y, heterogeneidad de esta patología y para el desarrollo de terapias y diagnósticos personalizados para su tratamiento (Harris et al., 2020).

El tiempo de incubación utilizado (tratamiento con A β O s por 6 horas) implica que probablemente existen mecanismos indirectos y de largo plazo implicados en la disminución de las señales de Ca $^{2+}$ nucleares. Al respecto en este trabajo mostramos que los A β O s inducen un aumento lento y de baja intensidad en la [Ca $^{2+}$] nuclear, y que luego de 6 horas de incubación, disminuyen los transitorios de Ca $^{2+}$ nucleares inducidos por incremento de la actividad sináptica. Datos del laboratorio muestran que la incubación de cultivos de neuronas hipocampales con A β O s disminuye el contenido de proteína y la expresión del mRNA de RyR2; además los A β O s generan un aumento de los niveles de Ca $^{2+}$ citoplasmático neuronal, que es dependiente de la activación de los receptores NMDA y de la liberación intracelular de Ca $^{2+}$ a través de los canales RyR (Paula-lima et al., 2011). No es posible sin embargo descartar otros mecanismos asociados a la neurotoxicidad de los A β O s que también pueden contribuir a los efectos descritos en este trabajo como la producción de estrés oxidativo que disminuya la entrada de Ca $^{2+}$ por los receptores de NMDA, además de mecanismos neuroinflamatorios inducidos por la exposición a los A β O s , en conjunto con otros blancos que actualmente están siendo ensayados en numerosos ensayos preclínicos y clínicos contra el progreso de la enfermedad de Alzheimer (Cummings et al., 2021).

Al comparar resultados de distintos estudios, aunque ocupen la misma secuencia del péptido A β , es importante considerar las condiciones en que estos se realizan. Los oligómeros presentan diferentes estados de agregación formando dimeros, trímeros hasta dodecameros que han mostrado diferente grado de neurotoxicidad en modelos in vivo e in vitro (Jana et al., 2016; Yang et al., 2017). También la concentración utilizada es un factor importante, una vez que concentraciones fisiológicas de A β O s en el rango picomolar inducen la activación de CREB, BDNF y de la señalización relacionada a plasticidad sináptica (Gulisano et al., 2019). Cabe destacar además que las concentraciones de A β O s utilizadas en este trabajo no inducen una disminución

de la viabilidad celular corroborado por otros estudios publicados del laboratorio (Paula-lima et al., 2011; SanMartín et al., 2012).

Distintos trabajos muestran que el tratamiento crónico con los A β O s u otras formas del péptido A β en distintos modelos de la enfermedad de Alzheimer, producen hiperexcitabilidad neuronal (Harris et al., 2020). Diversos mecanismos pueden explicar este efecto. Un estudio reciente (Gall and Dupont, 2020), reporta que la actividad tónica de los NMDAr extrasinápticos reduce la excitabilidad a través de la activación de canales de K $^{+}$ activados por Ca $^{2+}$. Otro estudio (Sinnen et al., 2016) determinó que los A β O s interrumpen la entrada de Ca $^{2+}$ mediada por los NMDAr en espinas dendríticas. Además, la nitración de residuos de tirosina de los A β O s potencia su oligomerización y sinaptotoxicidad dependiente de NMDAr (Guivernau et al., 2016).

Interrupción de la activación neuroprotectora antioxidante por la sinaptotoxicidad asociado al péptido β -amiloide.

El aumento en la actividad neuronal induce la expresión de un programa de neuro-protección mediada por actividad sináptica, que protege frente a estímulos excitotóxicos, mediante la expresión de genes como Atf3, Npas4 y Sinaptogamina 10 (Algren et al., 2014; Woitecki et al., 2016; Depp et al., 2017). Esto involucra además un aumento de enzimas antioxidantes que es necesario para contrarrestar el aumento en el metabolismo oxidativo y la producción aumentada de ROS, que es un resultado inevitable del aumento de la actividad neuronal (Baxter et al., 2015). Recientemente esto se ha relacionado con un aumento en la expresión de genes ligados al control del metabolismo neuronal, que disminuyen la expresión de varios genes mitocondriales, y aumentan la glicolisis, lo que tiende a atenuar el metabolismo oxidativo y la producción de ROS (Bas-Orth et al., 2017). Este efecto no se restringe a las neuronas, ya que la actividad neuronal también regula la expresión génica en astrocitos, regulando su desarrollo y metabolismo (Hasel et al., 2017).

En este trabajo de tesis se muestra que los A β O s disminuyen la expresión del mRNA de la enzima antioxidante Nqo1 inducidas por el aumento de la actividad sináptica causado por Gabacina. Otros trabajos del laboratorio (Lobos et al., 2016; More et al., 2018a) han mostrado la potencial relevancia de las estrategias antioxidantes exógenas como tratamiento para disminuir

la sinapto-toxicidad de los A β Os en modelos *in vitro* e *in vivo*. La regulación de la respuesta antioxidante endógena puede también representar una estrategia al menos igualmente relevante.

9.-Bibliografía.

- Adasme T, Haeger P, Paula-Lima AC, Espinoza I, Casas-Alarcón MM, Carrasco MA, Hidalgo C (2011) Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:3029–3034.
- Adasme T, Paula-Lima A, Hidalgo C (2015) Inhibitory ryanodine prevents ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release without affecting endoplasmic reticulum Ca²⁺ content in primary hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458:57–62.
- Aloni E, Oni-Biton E, Tsoory M, Moallem DH, Segal M (2019) Synaptopodin Deficiency Ameliorates Symptoms in the 3xTg Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *The Journal of Neuroscience* 39:3983–3992.
- Bading H (2013a) Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nature Reviews Neuroscience* 14:593–608.
- Baker KD, Edwards TM, Rickard NS (2013) The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 37:1211–1239.
- Basnayake K, Mazaud, David, Bemelmans, Alexis, Rouach N, Korkotian E, Holcman D (2019) Fast calcium transients in neuronal spines driven by extreme statistics. *PLoS biology* 17.
- Bengtson CP, Freitag HE, Weislogel JM, Bading H (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.
- Benito E, Barco A (2010) CREB’s control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends in Neurosciences* 33:230–240.
- Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13–26.
- Berridge MJ (2006) Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium* 40:405–412.
- Berridge MJ (2012) *Cell Signalling Biology: Module 2 - Cell signalling pathways*. *Biochemical Journal*:1–138.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 4:517–529.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nature reviews Molecular Cell Biology* 1:11–21.
- Berry KP, Nedivi E (2017) Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron* 96:43–55.
- Bertan F, Wischhof L, Sosulina L, Mittag M, Dalügge D, Fornarelli A, Gardoni F, Marcello E, Di Luca M, Fuhrmann M, Remy S, Bano D, Nicotera P (2020) Loss of Ryanodine Receptor 2 impairs neuronal activity-dependent remodeling of dendritic spines and triggers compensatory neuronal hyperexcitability. *Cell Death and Differentiation*.
- Bourne JN, Harris KM (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience* 31:47–67.
- Brigidi GS, Hayes MGB, Delos Santos NP, Hartzell AL, Texari L, Lin PA, Bartlett A, Ecker JR, Benner C, Heinz S, Bloodgood BL (2019) Genomic Decoding of Neuronal Depolarization by Stimulus-Specific NPAS4 Heterodimers. *Cell* 179:373-391.e27.
- Brini M, Murgia M, Pasti L, Picard D, Pozzan T, Rizzuto R (1993) Nuclear Ca²⁺ concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *Embo J* 12:4813–4819.

- Calvo-Rodriguez M, Hernando-Pérez E, López-Vázquez S, Núñez J, Villalobos C, Núñez L (2020) Remodeling of intracellular Ca²⁺ homeostasis in rat hippocampal neurons aged in vitro. *International Journal of Molecular Sciences* 21:1–12.
- Carrasco MA, Hidalgo C (2006) Calcium microdomains and gene expression in neurons and skeletal muscle cells. *Cell calcium* 40:575–583.
- Chen Q, Deister CA, Gao X, Guo B, Lynn-Jones T, Chen N, Wells MF, Liu R, Goard MJ, Dimidschstein J, Feng S, Shi Y, Liao W, Lu Z, Fishell G, Moore CI, Feng G (2020) Dysfunction of cortical GABAergic neurons leads to sensory hyper-reactivity in a Shank3 mouse model of ASD. *Nature Neuroscience* 23:520–532.
- Chen-Engerer HJ, Hartmann J, Karl RM, Yang J, Feske S, Konnerth A (2019) Two types of functionally distinct Ca²⁺ stores in hippocampal neurons. *Nature Communications* 10:1–8.
- Ch'ng TH, Martin KC (2011) Synapse-to-nucleus signaling. *Curr Opin Neurobiol* 21:345–352.
- Cohen S, Greenberg M (2008) Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 24:183–209.
- Csordás G, Várnai P, Golenár T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T, Hajnóczky G (2010) Imaging Interorganellar Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Molecular Cell* 39:121–132.
- Cummings J, Lee G, Zhong K, Fonseca J, Taghva K (2021) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 7:1–24.
- Datta D, Leslie SN, Wang M, Morozov YM, Yang S, Mentone SA, Zeiss C, Duque A, Rakic P, Horvath TL, van Dyck CH, Nairn AC, Arnsten AFT (2021) Age-related calcium dysregulation linked with tau pathology and impaired cognition in non-human primates. *Alzheimer's and Dementia* 17:920–932.
- Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW (1998) Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392:198–202.
- Deisseroth K, Mermelstein PG, Xia H, Tsien RW (2003) Signaling from synapse to nucleus: The logic behind the mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology* 13:354–365.
- Eder A, Bading H (2007) Calcium signals can freely cross the nuclear envelope in hippocampal neurons: somatic calcium increases generate nuclear calcium transients. *BMC neuroscience* 8:57.
- Ferreira ST, Lourenco M V., Oliveira MM, De Felice FG (2015) Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9:1–17.
- Fotuhi M, Do D, Jack C (2012) Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nature reviews Neurology* 8:189–202.
- Frere S, Slutsky I (2018) Alzheimer's Disease: From Firing Instability to Homeostasis Network Collapse. *Neuron* 97:32–58.
- Funahashi Y, Ariza A, Emi R, Xu Y, Shan W, Suzuki K, Kozawa S, Ahammad RU, Wu M, Takano T, Yura Y, Kuroda K, Nagai T, Amano M, Yamada K, Kaibuchi K (2019) Phosphorylation of Npas4 by MAPK Regulates Reward-Related Gene Expression and Behaviors. *Cell Reports* 29:3235–3252.e9.
- Gall D, Dupont G (2020) Tonic activation of extrasynaptic NMDA receptors decreases intrinsic excitability and promotes bistability in a model of neuronal activity. *International Journal of Molecular Sciences* 21.

- Gonzales BJ, Mukherjee D, Ashwal-Fluss R, Loewenstein Y, Citri A (2019) Subregion-specific rules govern the distribution of neuronal immediate-early gene induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*:201913658.
- Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP (2017) Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annual Review of Medicine* 68:413–430.
- Greer PL, Greenberg ME (2008) From Synapse to Nucleus: Calcium-Dependent Gene Transcription in the Control of Synapse Development and Function. *Neuron* 59:846–860.
- Ghosh Dastidar S, Das Sharma S, Chakraborty S, Chattarji S, Bhattacharya A, Muddashetty RS (2020) Distinct regulation of bioenergetics and translation by group I mGluR and NMDAR. *EMBO Rep* 21:1–20.
- Goncalves J, Bartol TM, Camus C, Levet F, Menegolla AP, Sejnowski TJ, Sibarita J-B, Vivaudou M, Choquet D, Hosy E (2020) Nanoscale co-organization and coactivation of AMPAR, NMDAR, and mGluR at excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci* 117:201922563.
- Guivernau B, Bonet J, Valls-Comamala V, Bosch-Morato M, Godoy JA, Inestrosa NC, Peralvarez-Marin A, Fernandez-Busquets X, Andreu D, Oliva B, Munoz FJ (2016) Amyloid- β Peptide Nitrotyrosination Stabilizes Oligomers and Enhances NMDAR-Mediated Toxicity. *Journal of Neuroscience* 36:11693–11703.
- Gulisano W, Melone M, Ripoli C, Rosaria Tropea M, Li Puma DD, Giunta S, Cocco S, Marcotulli D, Origlia N, Palmeri A, Arancio O, Conti F, Grassi C, Puzzo D (2019) Neuromodulatory action of picomolar extracellular A β 42 oligomers on pre- and postsynaptic mechanisms underlying synaptic function and memory. *The Journal of Neuroscience* 39:0163–19.
- Hagenston AM, Bading H, Bas-Orth C (2019) Functional Consequences of Calcium-Dependent Synapse-to-Nucleus Communication: Focus on Transcription-Dependent Metabolic Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*: a035287.
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H (1997) Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in I the control of gene. *Nature* 385:260–265.
- Hardingham GE, Pruunsild P, Greenberg ME, Bading H (2018) Lineage divergence of activity-driven transcription and evolution of cognitive ability. *Nature Reviews Neuroscience* 19:9–15.
- Harris SS, Wolf F, De Strooper B, Busche MA (2020) Tipping the Scales: Peptide-Dependent Dysregulation of Neural Circuit Dynamics in Alzheimer's Disease. *Neuron* 107:417–435.
- Hasel P et al. (2017) Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. *Nat Commun* 8:1–17
- Heinz DA, Bloodgood BL (2020) Mechanisms that communicate features of neuronal activity to the genome. *Current Opinion in Neurobiology* 63:131–136.
- Herbst WA, Martin KC (2017) Regulated transport of signaling proteins from synapse to nucleus. *Current Opinion in Neurobiology* 45:78–84.
- Herre M, Korb E (2019) The chromatin landscape of neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 59:79–86.
- Hibar DP et al. (2017) Novel genetic loci associated with hippocampal volume. *Nature Communications* 8.
- Hidalgo C, Arias-Cavieres A (2016) Calcium, Reactive Oxygen Species, and Synaptic Plasticity. *Physiology* 31:201–215.
- Holler S, Köstinger G, Martin KAC, Schuhknecht GFP, Stratford KJ (2021) Structure and function of a neocortical synapse. *Nature*.

- Hwang J-Y, Aromolaran KA, Zukin RS (2017) The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. *Nature Reviews Neuroscience* 18:347–361.
- Jana MK, Cappai R, Pham CLL, Ciccotosto GD (2016) Membrane bound tetramer and trimer A β oligomeric species correlate with toxicity towards cultured neurons. *J Neurochem* 136:594–608.
- Janczura KJ, Volmar C-H, Sartor GC, Rao SJ, Ricciardi NR, Lambert G, Brothers SP, Wahlestedt C (2018) Inhibition of HDAC3 reverses Alzheimer’s disease-related pathologies in vitro and in the 3xTg-AD mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: E11148–E11157.
- Johanning FW, Holthoff K (2007) Nuclear calcium signals during L-LTP induction do not predict the degree of synaptic potentiation. *Cell Calcium* 41:271–283.
- Jordan B a, Kreutz MR (2009) Nucleocytoplasmic protein shuttling: the direct route in synapse-to-nucleus signaling. *Trends in neurosciences* 32:392–401.
- Kandel E, Dudai Y, Mayford M (2014) *The Molecular and Systems Biology of Memory*. *Cell* 157:163–186.
- Kandel ER (2002) The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Bioscience reports* 24:475–522.
- Kato HK, Kassai H, Watabe AM, Aiba A, Manabe T (2012) Functional coupling of the metabotropic glutamate receptor, InsP 3 receptor and L-type Ca²⁺ channel in mouse CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 590:3019–3034.
- Kemmerling U, Muñoz P, Müller M, Sánchez G, Aylwin MLML, Klann E, Carrasco MA, Hidalgo C (2007) Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons. *Cell Calcium* 41:491–502.
- Kwon T, Sakamoto M, Peterka DS, Yuste R (2017) Attenuation of Synaptic Potentials in Dendritic Spines. *Cell Reports* 20:1100–1110.
- LaFerla FM (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer’s disease. *Nature reviews Neuroscience* 3:862–872.
- Lee KFHH, Soares C, Thivierge JP, Béique JC, Beique J-C (2016) Correlated Synaptic Inputs Drive Dendritic Calcium Amplification and Cooperative Plasticity during Clustered Synapse Development. *Neuron* 89:784–799
- Lim AFY, Lim WL, Ch’ng TH (2017) Activity-dependent synapse to nucleus signaling. *Neurobiology of Learning and Memory* 138:78–84.
- Lipkin AM, Cunniff MM, Spratt PWE, Lemke SM, Bender KJ (2021) Functional microstructure of CaV-mediated calcium signaling in the axon initial segment. *Journal of Neuroscience* 41:3764–3776.
- Lobos P, Bruna B, Cordova A, Barattini P, Galáz JL, Adasme T, Hidalgo C, Muñoz P, Paula-Lima A (2016) Astaxanthin protects primary hippocampal neurons against noxious effects of A β -oligomers. *Neural Plasticity* 2016:1–13.
- Lobos P, Córdoba A, Vega-Vásquez I, Ramírez OA, Adasme T, Toledo J, Cerda M, Härtel S, Paula-Lima A, Hidalgo C (2021) RyR-mediated Ca²⁺ release elicited by neuronal activity induces nuclear Ca²⁺ signals, CREB phosphorylation, and Npas4/RyR2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118.
- Louis Sam Titus ASC, Sharma D, Kim MS, D’Mello SR (2019) The Bdnf and Npas4 genes are targets of HDAC3-mediated transcriptional repression. *BMC Neuroscience* 20:1–13.
- Mahase E (2021) FDA considers Alzheimer’s drug previously abandoned for lack of effectiveness. *BMJ* 367: l6164.

- Marcello E, Di Luca M, Gardoni F (2018a) Synapse-to-nucleus communication: from developmental disorders to Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology* 48:160–166.
- Marcello E, Di Luca M, Gardoni F (2018b) Synapse-to-nucleus communication: from developmental disorders to Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology* 48:160–166.
- Maturana H, Varela F (2004) *De máquinas y seres vivos: autopoiesis: la organización de lo vivo*, 6^o.
- Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER (2012) Synapses and memory storage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4:1–18.
- Mermelstein PG, Deisseroth K, Dasgupta N, Isaksen AL, Tsien RW (2001) Calmodulin priming: Nuclear translocation of a calmodulin complex and the memory of prior neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:15342–15347.
- Miyashita A, Hatsuta H, Kikuchi M, Nakaya A, Saito Y, Tsukie T, Hara N, Ogishima S, Kitamura N, Akazawa K, Kakita A, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Ikeuchi T, Kuwano R (2014) Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 4:1–8.
- Mohan V, Wade SD, Sullivan CS, Kasten MR, Sweetman C, Stewart R, Truong Y, Schachner M, Manis PB, Maness PF (2019) Close Homolog of L1 Regulates Dendritic Spine Density in the Mouse Cerebral Cortex through Semaphorin 3B. *The Journal of Neuroscience* 39:2984–18.
- More J, Galusso N, Veloso P, Montecinos L, Finkelstein JP, Sanchez G, Bull R, Valdés JL, Hidalgo C, Paula-Lima A (2018a) N-Acetylcysteine Prevents the Spatial Memory Deficits and the Redox-Dependent RyR2 Decrease Displayed by an Alzheimer's Disease Rat Model. *Frontiers in Aging Neuroscience* 10:1–19.
- More JY, Bruna BA, Lobos PE, Galaz JL, Figueroa PL, Namias S, Sánchez GL, Barrientos GC, Valdés JL, Paula-Lima AC, Hidalgo C, Adasme T (2018b) Calcium Release Mediated by Redox-Sensitive RyR2 Channels Has a Central Role in Hippocampal Structural Plasticity and Spatial Memory. *Antioxidants and Redox Signaling* 29:1125–1146.
- Nakamura T, Nakamura K, Lasser-Ross N, Barbara JG, Sandler VM, Ross WN (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)-mediated Ca²⁺ release evoked by metabotropic agonists and backpropagating action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 20:8365–8376.
- Okubo Y, Suzuki J, Kanemaru K, Nakamura N, Shibata T, Iino M (2015) Visualization of Ca²⁺ filling mechanisms upon synaptic inputs in the endoplasmic reticulum of cerebellar purkinje cells. *Journal of Neuroscience* 35:15837–15846.
- O'Neill N, McLaughlin C, Komiyama N, Sylantyev S (2018) Biphasic Modulation of NMDA Receptor Function by Metabotropic Glutamate Receptors. *J Neurosci* 38:9840–9855.
- Opsomer R, Contino S, Perrin F, Gualdani R, Tasiaux B, Doyen P, Vergouts M, Vranx C, Doshina A, Pierrot N, Octave JN, Gailly P, Stanga S, Kienlen-Campard P (2020) Amyloid precursor protein (APP) controls the expression of the transcriptional activator neuronal PAS domain protein 4 (NPAS4) and synaptic GABA release. *eNeuro* 7.
- Papadia S, Soriano FX, Léveillé F, Martel M, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Sifringer M, Fowler J, Stefovská V, McKenzie G, Craigon M, Corriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DJA, Ikonomidou C, Hardingham GE (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nature neuroscience* 11:476–487.
- Paula-lima AC et al. (2011) Amyloid β -Peptide Oligomers Stimulate RyR-Mediated Ca²⁺ Release Inducing Mitochondrial Fragmentation in Hippocampal Neurons and Prevent

- RyR-Mediated Dendritic Spine Remodeling Produced by BDNF. *Antioxidants & Redox signaling* 14:1209–1223.
- Paula-Lima AC, Adasme T, Hidalgo C (2014) Contribution of Ca²⁺ Release Channels to Hippocampal Synaptic Plasticity and Spatial Memory: Potential Redox Modulation. *Antioxid Redox Signal* 21:892–914 Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2013.5796>
- Perfitt TL, Wang X, Dickerson MT, Stephenson JR, Nakagawa T, Jacobson DA, Colbran RJ (2020) Neuronal L-type calcium channel signaling to the nucleus requires a novel CaMKII α -SHANK3 interaction. *Journal of Neuroscience* 40:2000–2014.
- Perni S, Beam KG (2021) Neuronal junctophilins recruit specific Cav and RyR isoforms to ER-PM junctions and functionally alter Cav2.1 and Cav2.2. *eLife* 10:1–31.
- Ramamoorthi K, Fropf R, Belfort GM, Fitzmaurice HL, McKinney RM, Neve RL, Otto O, Lin Y (2011) Npas4 Regulates a Transcriptional Program in CA3 Required for Contextual Memory Formation. *Science* 334:1669–1675.
- Ramírez OA, Córdova A, Cerda M, Lobos P, Härtel S, Couve A, Hidalgo C (2021) (In Revision) Ryanodine Receptor-mediated Ca²⁺ Release and Atlastin2 GTPase Activity Contribute to IP₃-induced Dendritic Ca²⁺ Signals in Primary Hippocampal Neurons. *Cell Calcium In Revisio*.
- Reese AL, Kavalali ET (2015) Spontaneous neurotransmission signals through store-driven Ca²⁺ transients to maintain synaptic homeostasis. *eLife* 4:1–15.
- Reiner A, Levitz J (2018) Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron* 98:1080–1098 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.018>
- Reshetniak S, Ußling J-E, Perego E, Rammner B, Schikorski T, Fornasiero EF, Truckenbrodt S, Köster S, Rizzoli SO (2020) A comparative analysis of the mobility of 45 proteins in the synaptic bouton. *The EMBO journal*:e104596.
- Ross WN (2012) Understanding calcium waves and sparks in central neurons. *Nat Rev Neurosci* 13:157–168 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22314443>.
- Sahu G, Wazen RM, Colarusso P, Chen SRW, Zamponi GW, Turner RW (2019) Junctophilin Proteins Tether a Cav1-RyR2-KCa3.1 Tripartite Complex to Regulate Neuronal Excitability. *Cell Reports* 28:2427-2442.e6.
- SanMartín CD, Paula-Lima AC, Hidalgo C, Núñez MT (2012) Sub-lethal levels of amyloid β -peptide oligomers decrease non-transferrin-bound iron uptake and do not potentiate iron toxicity in primary hippocampal neurons. *Biometals* 25:805–813
- Schrank S, McDaid J, Briggs CA, Mustaly-Kalimi S, Brinks D, Houcek A, Singer O, Bottero V, Marr RA, Stutzmann GE (2020) Human-induced neurons from presenilin 1 mutant patients model aspects of Alzheimer’s disease pathology. *International Journal of Molecular Sciences* 21:1–13.
- Sebollela A, Freitas-Correa L, Oliveira FF, Paula-Lima AC, Saraiva LM, Martins SM, Mota LD, Torres C, Alves-Leon S, de Souza JM, Carraro DM, Brentani H, De Felice FG, Ferreira ST (2012) Amyloid- β oligomers induce differential gene expression in adult human brain slices. *The Journal of biological chemistry* 287:7436–7445.
- Sevigny J et al. (2016) The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer’s disease. *Nature* 537:50–56.
- Sharma N, Pollina EA, Nagy MA, Yap E-L, DiBiase FA, Hrvatin S, Hu L, Lin C, Greenberg ME (2019) ARNT2 Tunes Activity-Dependent Gene Expression through NCoR2-Mediated Repression and NPAS4-Mediated Activation. *Neuron* 102:390-406.e9.

- Sinnen BL, Bowen AB, Gibson ES, Kennedy MJ (2016) Local and Use-Dependent Effects of β -Amyloid Oligomers on NMDA Receptor Function Revealed by Optical Quantal Analysis. *Journal of Neuroscience* 36:11532–11543.
- Sotelo C (2003) Viewing the brain through the master hand of Ramon y Cajal. *Nature Reviews Neuroscience* 4:71–77.
- Stansley BJ, Conn PJ (2019) Neuropharmacological Insight from Allosteric Modulation of mGlu Receptors. *Trends Pharmacol Sci* 40:240–252 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2019.02.006>
- Stutzmann GE (2021) RyR2 calcium channels in the spotlight—I'm ready for my close up, Dr. Alzheimer! *Cell Calcium* 94:102342.
- Sun X, Bernstein MJ, Meng M, Rao S, Sørensen AT, Yao L, Zhang X, Anikeeva PO, Lin Y (2020) Functionally Distinct Neuronal Ensembles within the Memory Engram. *Cell* 181:410–423.e17.
- Sun X, Lin Y (2016) Npas4: Linking Neuronal Activity to Memory. *Trends in Neurosciences* 39:264–275.
- Tedoldi A, Ludwig P, Fulgenzi G, Takeshima H, Pedarzani P, Stocker M (2020) Calcium-induced calcium release and type 3 ryanodine receptors modulate the slow afterhyperpolarising current, sIAHP, and its potentiation in hippocampal pyramidal neurons. *PLoS ONE* 15:1–24.
- Terenzio M, Schiavo G, Fainzilber M (2017) Compartmentalized Signaling in Neurons: From Cell Biology to Neuroscience. *Neuron* 96:667–679.
- Tyssowski KM, Gray JM (2019) The neuronal stimulation–transcription coupling map. *Current Opinion in Neurobiology* 59:87–94.
- Unger MS, Li E, Scharnagl L, Poupardin R, Altendorfer B, Mrowetz H, Hutter-Paier B, Weiger TM, Heneka MT, Attems J, Aigner L (2020) CD8+ T-cells infiltrate Alzheimer's disease brains and regulate neuronal- and synapse-related gene expression in APP-PS1 transgenic mice. *Brain, Behavior, and Immunity*.
- Wang H, Ardiles a. O, Yang S, Tran T, Posada-Duque R, Valdivia G, Baek M, Chuang Y -a., Palacios a. G, Gallagher M, Worley P, Kirkwood A (2016) Metabotropic Glutamate Receptors Induce a Form of LTP Controlled by Translation and Arc Signaling in the Hippocampus. *J Neurosci* 36:1723–1729
- Watanabe S, Hong M, Lasser-Ross N, Ross WN (2006) Modulation of calcium wave propagation in the dendrites and to the soma of rat hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* 575:455–468.
- Vierra NC, Kirmiz M, van der List D, Santana LF, Trimmer JS (2019) KV2.1 mediates spatial and functional coupling of l-type calcium channels and ryanodine receptors in mammalian neurons. *eLife* 8:1–42.
- Welsby P, Rowan M, Anwyl R (2006) Nicotinic receptor-mediated enhancement of long-term potentiation involves activation of metabotropic glutamate receptors and ryanodine-sensitive calcium stores in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 24:3109–3118.
- Werner C, Sauer M, Geis C (2021) Super-resolving Microscopy in Neuroscience. *Chemical Reviews*.
- West AE, Greenberg ME (2011) Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3:1–21.
- Yang T, Li S, Xu H, Walsh DM, Selkoe DJ (2017) Large Soluble Oligomers of Amyloid β -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. *J Neurosci* 37:152–163

- Yao J, Sun B, Institoris A, Zhan X, Guo W, Song Z, Liu Y, Hiess F, Boyce AKJ, Ni M, Wang R, ter Keurs H, Back TG, Fill M, Thompson RJ, Turner RW, Gordon GR, Chen SRW (2020) Limiting RyR2 Open Time Prevents Alzheimer's Disease-Related Neuronal Hyperactivity and Memory Loss but Not β -Amyloid Accumulation. *Cell Reports* 32.
- Yap EL, Greenberg ME (2018) Activity-Regulated Transcription: Bridging the Gap between Neural Activity and Behavior. *Neuron* 100:330–348.
- Younan D et al. (2020) Particulate matter and episodic memory decline mediated by early neuroanatomic biomarkers of Alzheimer's disease. *Brain* 143:289–302.
- Zhang SJ, Zou M, Lu L, Lau D, Ditzel DAW, Delucinge-Vivier C, Aso Y, Descombes P, Bading H (2009) Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: Identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genetics* 5.
- Ziviani E, Lippi G, Bano D, Munarriz E, Guiducci S, Zoli M, Young KW, Nicotera P (2011) Ryanodine receptor-2 upregulation and nicotine-mediated plasticity. *EMBO Journal* 30:194–204.

10.-Anexo

Publicaciones derivadas del trabajo de tesis

- **Lobos P***, Córdova A*, Vega-Vásquez I, Ramírez OA, Adasme T, Toledo J, Cerda M, Härtel S, Paula-Lima AC*, Hidalgo C*. RyR-mediated Ca²⁺ Release Elicited by Neuronal Activity Induces Nuclear Ca²⁺ Signals, CREB Phosphorylation and Npas4/RyR2 Expression. PNAS August 17, 2021 118 (33) e2102265118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2102265118>

Otras publicaciones realizadas durante el periodo de tesis:

- **Pedro Lobos**, Bárbara Bruna, Alex Cordova , Pablo Barattini, Jose Galaz, Tatiana Adasme, Cecilia Hidalgo, Pablo Muñoz, Andréa Paula-Lima. “Astaxanthin Protects Primary Hippocampal Neurons against Noxious Effects of A β -Oligomers,” Neural Plasticity, vol. 2016, Article ID 3456783, 13 pages, 2016.
doi:10.1155/2016/3456783.
- SanMartín Carol D, Veloso Pablo, Adasme Tatiana, **Lobos Pedro**, Bruna Barbara, Galaz Jose, García Alejandra, Hartel Steffen, Hidalgo Cecilia, Paula-Lima Andrea RyR2-Mediated Ca²⁺ Release and Mitochondrial ROS Generation Partake in the Synaptic Dysfunction Caused by Amyloid β Peptide Oligomers. Frontiers in Molecular Neuroscience 2017 10, April, 1-17.
- *Jamileth Y More, *Barbara A Bruna, **Pedro E. Lobos**, José L. Galaz, Paula L Figueroa, Silvia Namias, Gina L Sánchez, Genaro C. Barrientos, José L. Valdés, Andrea C. Paula-Lima, Cecilia Hidalgo, Tatiana Adasme. Calcium release mediated by redox-sensitive RyR2 channels has a central role in hippocampal structural plasticity and spatial memory. Antioxidant and Redox Signaling (March 2018).
- Díaz-Zúñiga J, Muñoz Y, Melgar-Rodríguez S, More J, Bruna B, **Lobos P**, Monasterio G, Vernal R, Paula-Lima A. Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* triggers pro-inflammatory responses and amyloid beta secretion in hippocampal cells: a novel link between periodontitis and Alzheimer’s disease? Journal of Oral Microbiology. 2019 April 15;11(1):1586423.
<https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1586423> eCollection 2019.
- García, F.; **Lobos, P.**; Ponce, A.; Cataldo, K.; Meza, D.; Farías, P.; Estay, C.; Oyarzun-Ampuero, F.; Herrera-Molina, R.; Paula-Lima, A.; Ardiles, Á.O.; Hidalgo, C.; Adasme, T.; Muñoz, P. Astaxanthin Counteracts Excitotoxicity and Reduces the Ensuing Increases in Calcium Levels and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation. Mar. Drugs 2020, 18, 335. <https://doi.org/10.3390/md18060335>

- Omar A. Ramírez, Alex Córdova, Mauricio Cerda, **Pedro Lobos**, Steffen Härtel, Andrés Couve, Cecilia Hidalgo. Ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release and atlastin-2 GTPase activity contribute to IP₃-induced dendritic Ca²⁺ signals in primary hippocampal neurons. *Cell Calcium*, Volume 96, 2021, 102399, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102399>

Presentaciones en Congresos

- Presentacion Oral :**Lobos, P.** ; Cordova, A.; Vega, I. ; Toledo, J.; Bruna, B.; Adasme, T.; Hartel, S.; Paula-Lima, A.; Hidalgo, C. “Contribution of Ryanodine Receptor-mediated calcium release to nuclear calcium signal generation and gene expression induced by neuronal activity” I Congreso de Estudiantes de Posgrado; 10-11 diciembre 2020 Campus Dra. Eloísa Díaz, Universidad de Chile
- **Pedro Lobos**; Barbara Bruna; Ignacio Vega; Jamileth More; Rodrigo Herrera-Molina; Pablo Muñoz; Tatiana Adasme; Cecilia Hidalgo; Andrea Paula-Lima REDOX SENSITIVE RyR2-MEDIATED Ca²⁺ RELEASE HAS A KEY ROLE IN BDNF-INDUCED Nrf2 ACTIVATION AND STRUCTURAL PLASTICITY AND IS DISRUPTED BY AMYLOID BETA OLIGOMERS. The Gordon Research Conference on Muscle: Excitation-Contraction Coupling, May 19, 2019 - May 24, 2019, Renaissance Tuscany Il Ciocco in Lucca (Barga), Italy.
- **Pedro Lobos**, Ignacio Vega, Barbara Bruna, Nicole Henriquez, Cecilia Hidalgo, Andrea Paula-Lima. “AMYLOID BETA OLIGOMERS INTERRUPT NUCLEAR Ca²⁺ TRANSIENTS AND GENE EXPRESSION INDUCED BY GABAZINE IN HIPPOCAMPAL NEURONS”. XLI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile (SOFARCHI), Universidad de Concepción 4 a 8 de Noviembre 2019, VII Región, Concepción, Chile.
- **Lobos, P.** ,Bruna, B. , Galaz, JI., Figueroa, P., Namias, S., Sanchez-Robledo, V Arias, A., Barrientos, G., Paula-Lima, A.C., Hidalgo, C. & Adasme, T. BDNF-Induced Hippocampal Structural Plasticity Requires ROS-Stimulated RyR2-Mediated Ca²⁺ Release. 38th World Congress of the International Union of Physiological Sciences. Río de Janeiro, Brasil, Agosto 1-5 2017.
- **Lobos, P.** ; Cordova, A.; Vega, I. ; Toledo, J.; Bruna, B.; Adasme, T.; Hartel, S.; Paula-Lima, A.; Hidalgo, C. Exploring activity-generated nuclear calcium signals in hippocampal neurons: from Ryanodine Receptor contribution to amyloid-beta oligomers interruption. Junior European Calcium Society 2021 (Online) 22-23 November.

Actividades de Docencia Académica

- Docente Encargado, Farmacología- Carrera de Medicina, Escuela de Salud- Universidad de OHiggins- 2020 y 2021, Rancagua, VI Región.
- Docente Encargado, Farmacología- Carrera de Enfermería, Escuela de Salud- Universidad de OHiggins- 2021, Rancagua, VI Región.
- Docente Curso de Formación General: Diálogos de Ciencia, Política y Sociedad: El Desafío de la Ciencia en Chile. Plataforma, Campus Norte Eloísa Diaz, Universidad de Chile. Santiago, 3 Realizaciones Semestres Otoño 2021, 2020, 2019, 2018 y 2017
- Ayudante Docente, Curso Fisiopatología Molecular 2018, Curso Farmacología de Sistemas I y II- Carrera de Química y Farmacia- Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile 2019 y 2020