



Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Biología Celular y Molecular

**Papel de las fosfatasas STEP y PTEN en el balance entre la
señalización sináptica y extrasináptica de los receptores NMDA
en el hipocampo en un modelo murino de trauma cerebral
moderado: papel del daño oxidativo**

Francisco Javier Carvajal Cachaña

Tutor: Dr. Waldo Cerpa

Laboratorio de función y patología neuronal



Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Biología Celular y Molecular

**Papel de las fosfatasas STEP y PTEN en el balance entre la
señalización sináptica y extrasináptica de los receptores NMDA
en el hipocampo en un modelo murino de trauma cerebral
moderado: papel del daño oxidativo**

Tesis presentada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como
parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas con mención en Biología Celular y Molecular

Por

Francisco Javier Carvajal Cachaña

Director de Tesis: Dr. Waldo Cerpa

Comisión de Tesis:
Dra. Alejandra Álvarez
Dra. Verónica Eisner
Dr. Jorge Campusano
Dr. Andrés Chávez

2020

Esta tesis está dedicada a mi familia

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Waldo Cerpa por haberme aceptado en su laboratorio, su continua ayuda, confianza y amistad en este periodo de formación científica. También agradecer a todos los miembros de su laboratorio, en especial a Rodrigo Mira, Camila Arce (ambos miembros fundadores del laboratorio de función y patología neuronal), Matías Lira, Eugenio Medina, Matías Álvarez y don Jorge Abarca, que además de ser colegas y compañeros de laboratorio se convirtieron en una gran familia. Este paso no pudo ser posible sin el apoyo y la formación dada por el Dr. Nibaldo Inestrosa con quien trabajé previamente y a miembros de su laboratorio con los que aún conservo amistad, en especial al Dr. Juan Zolezzi, Dra. Sussy Bestias, Dr. Juan Godoy, Dr. Claudio Pinto, Dr. Juvenal Ríos, Eliseo campos, Felipe Serrano y Carol Jara.

A la Pontificia Universidad Católica de Chile, su vicerrectoría de investigación y a la facultad de Ciencias Biológicas por las becas que me permitieron dedicación exclusiva al desarrollo de esta tesis entre los años 2014 y 2018.

A mi Familia en especial a mis padres, Gladys y Javier, a mis hermanos Josheline (y a su retoño Sofia) y Eduardo por el apoyo incondicional, respaldo y confianza en este periodo, sin ellos este periodo hubiera sido difícil de sobrellevar. Además de agradecer a tíos, tías y primos por el apoyo. A mis abuelos que me apoyaron cuando los necesite. A todos y a cada uno de ellos les corresponde parte de este triunfo, del cual no puedo decir que fue fácil pero que disfrute de cada momento y no hubiera sido posible sin ustedes.

Financiamiento

Esta tesis y mi estadía en el programa de doctorado fueron financiados por:

- Vicerrectoría de Investigación (VRI)
- Facultad de Ciencias Biológicas
- Beca doctorado nacional CONICYT 21161392
- FONDECYT N° 11121206
- FONDECYT N° 21161392
- Grant Anillo de Ciencia y Tecnología ACT1411

Resumen

El daño neuronal provocado por lesiones cerebrales, envejecimiento o diversas enfermedades neurodegenerativas, tiene entre alguno de sus factores comunes la falla sináptica y el estrés oxidativo. El principal tipo de sinapsis afectada en este conjunto de patologías es la sinapsis glutamatérgica. Uno de los componentes principales de la transmisión glutamatérgica son los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDARs). De acuerdo a su localización en subdominios de la membrana neuronal se han descrito dos poblaciones de NMDARs; los NMDARs sinápticos y los NMDARs extrasinápticos. Los NMDARs sinápticos son los encargados de la transmisión sináptica en diversos circuitos neuronales activando vías de señalización asociadas a la plasticidad sináptica y la sobrevivencia neuronal. Por el contrario, los NMDARs extrasinápticos, al ser activados, son capaces de generar cascadas de señalización intracelulares pro-apoptóticas incluyendo la activación de proteasas como las calpaínas.

La localización de los NMDARs depende principalmente del estado de fosforilación de la subunidad GluN2B. Estudios previos han demostrado el papel de algunas fosforilaciones clave que ayudan a mantener al receptor en distintas zonas. Algunas fosforilaciones de interés son la fosforilación en la tirosina 1472 de la subunidad GluN2B que ha sido asociada a un enriquecimiento de los NMDARs en la zona sináptica y la fosforilación en la tirosina 1336, esta última ha sido relacionada a un enriquecimiento de los NMDARs en la zona extrasináptica. El balance entre estas dos fosforilaciones con funciones antagónicas depende del balance entre la actividad de kinasas y fosfatasas.

En los últimos años se han descritos una serie de fosfatasas reguladoras de la actividad sináptica, muchas de ellas tienen como blanco a los NMDARs. En este trabajo las fosfatasas

a estudiar son PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten) y STEP (Striatal-enriched protein Tyrosine Phosphatase), ambas proteínas tienen implicancias en la disminución de la actividad de los NMDARs en condiciones patológicas, así como también han sido involucradas como reguladores de la plasticidad sináptica en paradigmas de inducción de la potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD respectivamente). Estos fenómenos han convertido a estas dos fosfatasa en un interesante blanco de estudio en eventos celulares relacionados a procesos neuropatológicos. En este trabajo hemos evaluado el papel del daño oxidativo en la regulación de la actividad de estas fosfatasa y de su efecto sobre el estado de fosforilación de los NMDARs bajo dos modelos diferentes. Daño oxidativo crónico y daño oxidativo agudo. En ambos casos se utilizó un animal transgénico con baja capacidad antioxidante como es el ratón heterocigoto para la enzima superóxido dismutasa 2 ($SOD2^{+/-}$). Para evaluar el papel de PTEN y STEP en la distribución de los NMDARs por el daño oxidativo crónico, se utilizaron animales $SOD2^{+/-}$ de distintas edades (2 y 6 meses de edad), esperando que el envejecimiento y la baja capacidad antioxidante generen el daño oxidativo crónico. Como modelo de daño oxidativo agudo se utilizó un modelo de trauma de impacto craneal frontal leve y repetitivo en ratones $SOD2^{+/-}$ y ratones control. En ambos modelos se midieron los siguientes parámetros: cambios cognitivos (laberinto acuático de Morris y reconocimiento de objeto nuevo), estudios electrofisiológicos (LTP, potenciales dependientes de NMDARs) y la actividad y expresión de PTEN y STEP. Además, se evaluó la localización de los NMDARs a través de las fosforilaciones de la subunidad GluN2B y mediante fraccionamiento subcelular del hipocampo de estos ratones.

Con el fin de corroborar la participación de las fosfatasa PTEN y STEP en la progresión del daño producido por el trauma cerebral y el posterior daño neuronal provocado

entre otras cosas por el aumento de los NMDARs extrasinápticos, se utilizaron herramientas farmacológicas. Para el caso de PTEN se utilizó el inhibidor VO-OHpic y para STEP se utilizó el inhibidor TC-2153, en ambos casos se administró el inhibidor vía intraperitoneal antes de cada sesión de golpes. Solo con el inhibidor de STEP se contrarrestaron algunos de los efectos producidos por el trauma cerebral. En resumen, se logró establecer bajo dos modelos de acumulación de daño oxidativo, crónico y agudo, el papel de las fosfatasas STEP y PTEN en el estado de fosforilación y en la localización de los NMDARs entre regiones sinápticas y extrasinápticas, los cuales contribuirían a los daños neurológicos y sinápticos observados.

Abstract

Neuronal damage caused by brain injuries, aging or various neurodegenerative diseases has synaptic failure and oxidative stress among some of its common factors. The main type of synapse affected in this set of pathologies is the glutamatergic synapse. One of the main components of the glutamatergic transmission is the N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs). According to its location in subdomains of the neuronal membrane, two populations of NMDARs have been described; the synaptic NMDARs and the extrasynaptic NMDARs. The synaptic NMDARs are responsible for synaptic transmission in various neuronal circuits activating signaling pathways associated with synaptic plasticity and neuronal survival. On the contrary, the extra-synaptic NMDARs, when activated, are capable of generating pro-apoptotic intracellular signaling cascades such as the activation of proteases such as calpains.

The location of the NMDARs depends mainly on the phosphorylation status of the GluN2B subunit. Previous studies have shown the function of some key phosphorylations that help keep the receptor in different areas. Some phosphorylations of interest are phosphorylation in tyrosine 1472 of the GluN2B subunit that has been associated with an enrichment of the NMDARs in the synaptic zone and phosphorylation in tyrosine 1336 that has been related to an enrichment of the NMDARs in the extrasynaptic zone. The balance between these two phosphorylations with antagonistic functions depends on the balance between the activity of kinases and phosphatases.

In recent years, a series of regulatory phosphatases of synaptic activity have been described, many of which target NMDARs. In this work the phosphatases to be studied are PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) and STEP (striatal-

enriched protein tyrosine phosphatase), both proteins have implications in the decrease of the activity of the NMDARs in pathological conditions, as well as have been involved as regulators of synaptic plasticity in induction paradigms of long-term potentiation and depression (LTP and LTD respectively). These phenomena have turned these two phosphatases into an interesting target of study in cellular events related to neuropathological processes. In this work, we have evaluated the role of oxidative damage in the regulation of the activity of these phosphatases and their effect on the state of phosphorylation of NMDARs under two different models. Chronic oxidative damage and acute oxidative damage. In both cases, a transgenic animal with low antioxidant capacity was used, such as the mouse heterozygous for the enzyme superoxide dismutase 2 (SOD2^{-/+}). To evaluate the role of PTEN and STEP in the distribution of NMDARs by chronic oxidative damage, SOD2^{-/+} animals of different ages (2 and 6 months of age) were used, expecting that aging and low antioxidant capacity generate the damage chronic oxidative. As a model of acute oxidative damage, a mild and repetitive frontal cranial impact trauma model was used in SOD2^{-/+} mice and control mice. In both models, the following parameters were measured: cognitive changes (Morris's water maze and new object recognition), electrophysiological studies (LTP, NMDARs-dependent potentials) and the activity and expression of PTEN and STEP. In addition, the localization of the NMDARs through the phosphorylations of the GluN2B subunit and by subcellular fractionation of the hippocampus of these mice was evaluated.

In order to corroborate the participation of the PTEN and STEP phosphatases in the progression of the damage produced by the brain trauma and the subsequent neuronal damage caused, among other things, by the increase of the extrasynaptic NMDARs, pharmacological tools were used. In the case of PTEN, the inhibitor VO-OHpic was used and for STEP the

inhibitor TC-2153 was used, in both cases, the inhibitor was administered intraperitoneally before each shock session. Only with the STEP inhibitor were some of the effects produced by the brain trauma reversed. In summary, it was possible to establish, under two models of accumulation of oxidative damage, chronic and acute, the role of the STEP and PTEN phosphatases in the phosphorylation state and in the location of the NMDARs between synaptic and extrasynaptic regions, which would contribute to the Neurological and synaptic damages observed.

Índice

1.-	Introducción.....	1
1.1.-	Trauma cerebral: implicancias y modelos.....	1
1.2.-	Estrés oxidativo.....	2
1.3.-	Receptores NMDA: tráfico, distribución y excitotoxicidad.....	5
1.4.-	Contribución de fosfatasa en la sinapsis glutamatérgica.....	9
2.-	Hipótesis y objetivos.....	17
2.1.-	Hipótesis.....	17
2.2.-	Objetivo general.....	17
2.3.-	Objetivos específicos.....	17
3.-	Metodología/materiales y métodos	19
3.1.-	Animales utilizados.....	19
3.2.-	Modelo de generación de trauma cerebral.....	19
3.3.-	Ensayos conductuales.....	21
3.3.1.-	Memoria espacial.....	21
3.3.2.-	Flexibilidad de memoria.....	22
3.3.4.-	Prueba de reconocimiento de objeto nuevo.....	23
3.4.-	Análisis histológicos y de inmunofluorescencia.....	23
3.5.-	Ensayos bioquímicos.....	25
3.5.1.-	Inmunoblot.....	25
3.5.2.-	Fraccionamiento subcelular.....	26
3.6.-	Registros electrofisiológicos.....	26
3.7.-	Análisis estadístico.....	29
4.-	Resultados.....	30
4.1.-	4.1-Evaluación del efecto crónico de la acumulación de daño oxidativo, caracterización de los ratones SOD2^{+/-} a distintas edades.....	30
4.1.1.-	Aumento de marcadores de daño oxidativo en rebanadas de hipocampo extraídos de ratones SOD2^{+/-}	30
4.1.2.-	Los ratones SOD2^{+/-} presentan falla en la memoria espacial en edades avanzadas.....	36

4.1.3.- Los ratones SOD2 ^{+/-} presentan alteraciones en la estructura hipocampal y falla sináptica dependiente de la edad.....	39
4.1.4.- La señalización asociada a los NMDARs esta alterada en los ratones SOD2 ^{+/-} a distintas edades.....	45
4.2.- Modelo de trauma cerebral moderado en ratones.....	49
4.2.1.- Evaluación de parámetros neuroanatómicos tras la inducción de trauma cerebral.....	50
4.2.2.- Evaluación conductual de ratones WT y SOD2 ^{+/-} sometidos a trauma cerebral.....	56
4.2.3.- Evaluación de la plasticidad y de respuesta sináptica de ratones WT y SOD2 ^{+/-} sometidos a trauma cerebral.....	58
4.2.4.- La señalización asociada a los NMDARs esta alterada en los ratones WT y SOD2 ^{+/-} sometidos a trauma cerebral.....	65
4.2.5.- La inhibición farmacológica de PTEN y STEP restauran parcialmente los daños producidos tras el trauma cerebral.....	69
5.- Discusión.....	78
6.- Conclusiones.....	89
7.- Referencias.....	90

Índice de figuras

Figura 1.- Mecanismos de daños a causa de trauma cerebral.....	2
Figura 2: Esquema de la estructura general de los NMDARs.....	8
Figura 3.- Esquema del antagonismo de la señalización de los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos.....	10
Figura 4.- Esquema del mecanismo de acción de la fosfatasa STEP ₆₁	13
Figura 5.- Esquema del mecanismo de acción de la fosfatasa PTEN.....	16
Figura 6.- Protocolo experimental y diseño del modelo de trauma cerebral leve y repetitivo.....	20
Figura 7.- Diagrama del método utilizado para el fraccionamiento celular en hipocampo de ratón.....	28
Figura 8.- El marcador de estrés oxidativo n-Tyr se encuentra aumentado en los animales SOD2 ^{+/-} comparado con animales control de la misma edad.....	31
Figura 9.- El marcador de estrés oxidativo 4-HNE se encuentra aumentado en los animales SOD2 ^{+/-} comparado con animales control de la misma edad.....	33
Figura 10.- El marcador de estrés oxidativo 8-OHG se encuentra aumentado en los animales SOD2 ^{+/-} comparado con animales control de la misma edad.....	35
Figura 11.- Los ratones SOD2 ^{+/-} presentan daños en la memoria espacial dependiente de la edad comparado con animales control.....	38
Figura 12.- Los ratones SOD2 ^{+/-} presentan alteraciones en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo dependiente de la edad comparado con animales control.....	40
Figura 13.- Los ratones SOD2 ^{+/-} presentan alteraciones en curvas intensidad/respuesta y en la plasticidad sináptica dependiente de la edad comparado con animales control.....	43
Figura 14.- Los ratones SOD2 ^{+/-} presentan alteraciones en el estado de fosforilación de los NMDARs dependiente de la edad comparado con animales control.....	44

Figura 15. – p-CREB y STEP, dos señalizaciones río debajo de los NMDARs se encuentran alterados en ratones SOD2 ^{+/-} comparado con animales control.....	47
Figura 16.- PTEN y STEP, fosfatasas asociadas la señalización de los NMDARs se encuentra alterada en los ratones SOD2 ^{+/-} comparado con animales control.....	48
Figura 17.- Evaluación psicomotriz y estructural del cerebro de los ratones sometidos al modelo de trauma cerebral moderado.....	51
Figura 18.- El modelo de trauma cerebral moderado y repetitivo produce neuroinflamación en el hipocampo.....	54
Figura 19.- El modelo de trauma cerebral moderado y repetitivo produce acumulación de marcadores de estrés oxidativo en el hipocampo de animales WT.....	55
Figura 20.- El trauma cerebral moderado genera alteraciones en la flexibilidad de memoria y en la memoria asociativa en ratones WT y ratones SOD2 ^{+/-}	57
Figura 21.- El trauma cerebral induce alteraciones en la curvas intensidad/respuesta y en plasticidad sináptica en el hipocampo de ratones WT y SOD2 ^{+/-}	59
Figura 22.- El trauma cerebral altera la funcionalidad y el estado de fosforilación de los NMDARs en el hipocampo en el hipocampo de ratones WT y SOD2 ^{+/-}	62
Figura 23.- El trauma cerebral altera la distribución sináptica/extrasináptica de los NMDARs en el hipocampo de ratones WT y SOD2 ^{+/-}	64
Figura 24.- La señalización asociada a los receptores NMDA se encuentra alterada en los ratones WT y SOD2 ^{+/-} sometidos a trauma cerebral.....	68
Figura 25.- La inhibición farmacológica de PTEN no altera los cambios conductuales producidos por el trauma cerebral.....	71
Figura 26.- La inhibición farmacológica de PTEN no altera los cambios producidos en las curvas intensidad/respuesta en el hipocampo de los ratones tras el trauma cerebral.....	72
Figura 27.- La inhibición farmacológica de STEP restaura los cambios en la flexibilidad de memoria y en la memoria asociativa tras el trauma cerebral.....	75
Figura 28.- La inhibición farmacológica de STEP restaura las alteraciones en las curvas intensidad/respuesta NMDAR dependiente tras el trauma cerebral.....	76
Figura 29.- La inhibición farmacológica de STEP restaura el estado de fosforilación de los NMDARS tras el trauma cerebral.....	77
Figura 30.- Efectos del daño del crónico y agudo evaluados en este trabajo sobre los NMDARs y su regulación a través de las fosfatasas STEP y PTEN.....	85

Índice de tablas

Tabla 1: anticuerpos utilizados.....26

Tabla 2: Severidad del daño psicomotor tras el trauma cerebral.....52

Abreviaciones utilizadas

NMDA: N-metilD-aspartato

NMDARs: Receptores de glutamato tipo NMDA

STEP: Striatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase

PTEN: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

LTP: Long- term potentiation

LTD: Long -term depression

SOD2: Superoxide dismutase 2

TC: Trauma cerebral

TBI: Traumatic brain injury

ROS: Reactive oxygen species

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPARs: Receptor de glutamato del tipo AMPA

EA: Enfermedad de Alzheimer

CREB: cAMP response element-binding

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

PIP₃: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

NOR: Novel object recognition

BSA: *Bovine serum albumin*

DAB: Diamino benzidina

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*

Iba-1: Ionized calcium binding adaptor molecule 1

4-HNE: 4-Hydroxynonenal

8-OHG: 8-hydroxyguanosine

GADPH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

PSD-95: postsynaptic density protein 95

PDI: *Protein* disulfide isomerase

GABA: ácido gama aminobutírico

fEPSP: field excitatory postsynaptic potential

NBQX: 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt

PTX: Picrotoxina

WT: Wild-type

CA3: Cornu Ammonis region 3

CA1: Cornu Ammonis region 1

DG: dentate gyrus

OE: Overexpression

RyRs: Ryanodine receptors

GPCR: G protein-coupled receptors

Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

1.- Introducción

1.1.-Trauma cerebral: implicancias y modelos

La lesión cerebral traumática o trauma cerebral (TC) es el daño al cerebro como resultado de una fuerza mecánica externa como por ejemplo golpes, aceleración rápida, ondas expansivas, etc., que puede provocar daños cognitivos temporales o permanentes, con alteraciones físicas y psicológicas y sociales, tanto a corto, mediano o largo plazo (Maas et al. 2008; Mollayeva et al. 2018). El TC es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en personas menores de 45 años producto de diversos tipos de accidentes y diversos deportes de contacto (Langlois et al. 2006). El TC no es un evento fisiológico sino un proceso que puede ser considerado como una enfermedad compleja con daños estructurales y funcionales que pueden ocurrir durante las lesiones primarias y secundarias (Masel and DeWitt 2010) (Figura 1 A y B). La lesión primaria corresponde a los mecanismos inmediatos a la exposición a la fuerza externa que incluye hemorragia, daño tisular y axonal, mientras que las lesiones secundarias evolucionan desde minutos a meses y es el resultado de cascadas metabólicas y eventos celulares y moleculares como por ejemplo reacciones inflamatorias, daño oxidativo y alteraciones que modifican el desempeño sináptico normal (Davis 2000a; b; Davis 2000c; Schwarzbach et al. 2006)(Figura 1B). Durante las últimas décadas, se han desarrollado modelos animales para replicar los efectos de TC en humanos, principalmente en ratas y ratones, para comprender mejor la fisiopatología que esto conlleva y explorar posibles tratamientos (Xiong et al. 2013). Sin embargo, una serie de fármacos neuroprotectores que fueron identificados en modelos animales de TC fracasaron en la fase II o III de ensayos clínicos, como fue el caso del uso de progesterona, estatinas y eritropoyetina (Kabadi and Faden 2014; Schouten 2007). Este fracaso en la homologación clínica de los estudios preclínicos se debe a una serie de motivos, entre ellos destaca el carecer

Figura 1

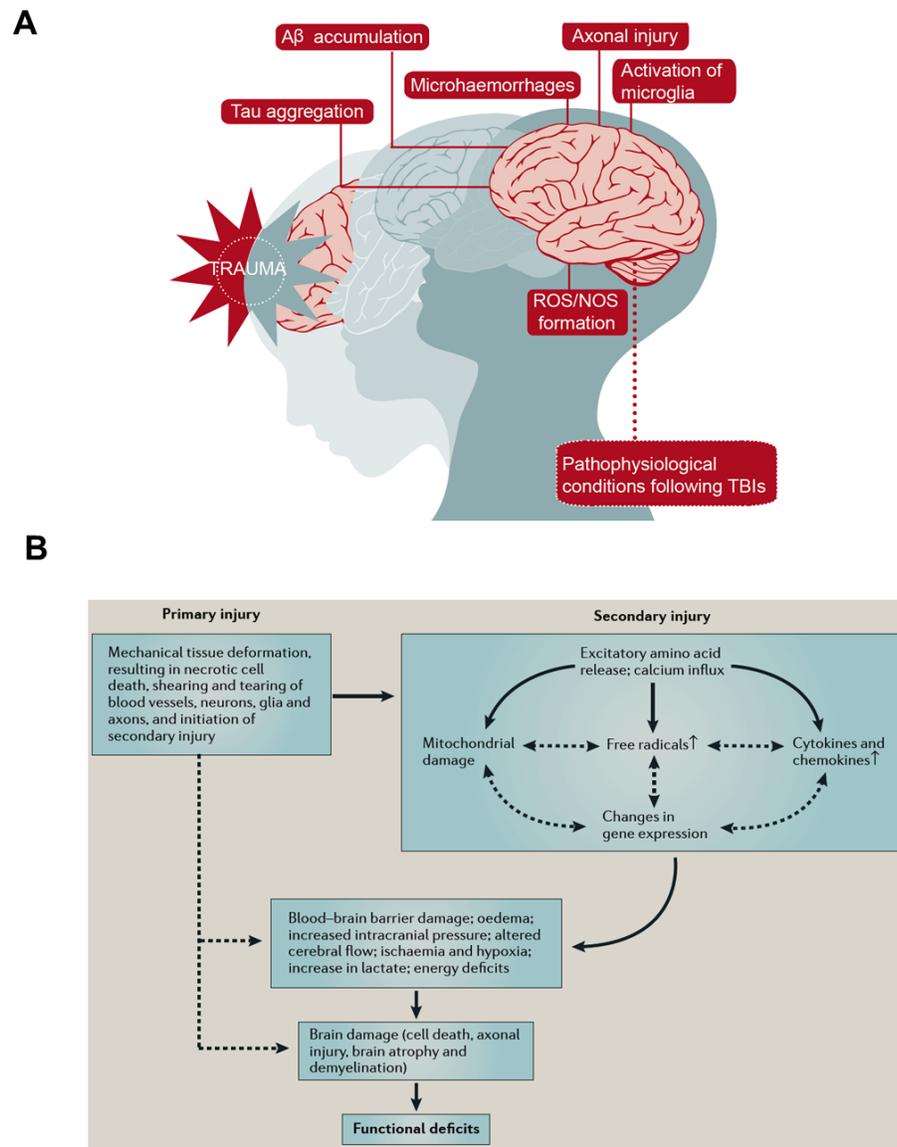


Figura 1: Mecanismos de daño a causa de trauma cerebral. **A.** Esquema general de los daños producidos tras el trauma cerebral, dentro de los que se incluyen agregación de la proteína *Tau* y del péptido $A\beta$, microhemorragias, daño axonal, neuroinflamación y generación de especies reactivas de oxígeno (modificado de Blennow et al, 20116). **B.** Esquema ilustrativo de la clasificación de los daños acorde a la temporalidad de los daños producidos tras el TC. Estos daños se clasifican en daños primarios, daños inmediatos producidos por el impacto (hemorragias, deformación mecánica, daño tisular, etc) y en daños secundarios, consecuencias de los daños primarios, lo que incluye daños en el metabolismo energético, inflamación, etc. Todos estos daños acumulados dan origen a los cambios fisiológicos que podrían desencadenar fallas del desempeño cognitivo (extraído de Xiong et al, 2013).

del conocimiento de los mecanismos de daño producidos por las lesiones secundarias para poder generar nuevas estrategias terapéuticas con especial interés en la sinapsis glutamatérgica, la cual está implicada directamente en procesos cognitivos, pero también en eventos asociados a toxicidad inducida por glutamato (excitotoxicidad) (Figura 1A) (Davis 2000b).

1.2.- Estrés oxidativo

Diversos fenómenos neurodegenerativos incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson (EP), Huntington (EH) y diversos daños agudos como la isquemia y distintos tipos de trauma que a pesar de tener orígenes o causas diferentes poseen varios mecanismos neuropatológicos en común como agregación anormal de proteínas, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y procesos inflamatorios (Jellinger 2010; von Bernhardi and Eugenin 2012). En general, el daño oxidativo y la falla sináptica son eventos tempranos en los procesos neurodegenerativos que caracterizan a varias enfermedades neurológicas (Carvajal et al. 2016; Jellinger 2010). Adicionalmente, el declive cognitivo asociado a la edad se debe al deterioro de la conectividad sináptica y falla sináptica, la cual exhibe una clara relación con un incremento en el estrés oxidativo (Jellinger 2010; von Bernhardi and Eugenin 2012). El estrés oxidativo es una condición celular que se manifiesta por un aumento en especies reactivas de oxígeno (ROS) o especies reactivas de nitrógeno (RNS) sin una adecuada respuesta celular. Las ROS incluyen varias moléculas como peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y radicales libres como el ion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el ion hidroxil (HO^{\bullet}), los cuales son altamente reactivos. La interacción de ROS con componentes celulares produce disfunción mitocondrial, mal plegamiento de proteínas y varios eventos deletéreos asociados a un amplio espectro de enfermedades (Ghosh et al. 2011). Debido a que la generación de ROS es un

evento normal en cualquier célula, incluyendo las neuronas, y está asociado con función neuronal y supervivencia, un desbalance en el equilibrio del estado redox de la célula se asocia a daño celular. Debido a esto, la fina sincronización del estado redox es necesaria para el correcto funcionamiento de la célula, lo cual se realiza en diferentes puntos de control. Los principales contribuyentes a este balance incluyen el lado de la generación de ROS la cadena respiratoria de la mitocondria y procesos inflamatorios y por el lado de respuesta a esta generación de ROS se incluyen enzimas involucradas en respuestas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), catalasa y peroxidoxinas; sequestradores de ROS como vitamina E, β -caroteno, ácido úrico y melatonina (von Bernhardt and Eugenin 2012). Un importante miembro de la maquinaria antioxidante es la enzima mitocondrial SOD2, también conocida como SOD manganeso dependiente (MnSOD). Esta proteína une al ion superóxido, un subproducto de la fosforilación oxidativa y lo convierte en peróxido de hidrogeno y oxígeno diatómico (Perry et al. 2009). Esta función permite a la SOD2 regular los niveles de ROS producidos en la mitocondria lo que le confiere un mecanismo de protección que evita la muerte celular (Pias et al. 2003). Esta enzima juega un papel antiapoptótico contrarrestando el estrés oxidativo, la fibrosis (Kwak et al. 2015), el daño por radiaciones ionizantes (Hosoki et al. 2012) y la inflamación por citoquinas (Ishihara et al. 2015). Además la función de SOD2 en el control de ROS también es sumamente importante en el envejecimiento y en diversas neuropatologías (Becuwe et al. 2014; Pias et al. 2003).

La alteración de estas respuestas antioxidante provoca que daños crónicos y agudos se vean potenciados por carecer de un mecanismo que los contrarreste. Un ejemplo concreto son los ratones SOD2^{+/-}, los cuales poseen una baja respuesta antioxidante a nivel sistémico,

lo que incluye tejido cerebral (Van Remmen et al. 1999). La baja respuesta antioxidante en estos animales provoca que lesiones como la isquemia sean exacerbadas (Mehta et al. 2011). Además, el daño oxidativo en estos ratones $SOD2^{+/-}$ provoca alteraciones en la distribución de los NMDARs (Carvajal et al. 2018), lo cual podría ser inducido y potenciado durante una lesión secundaria como el TC.

1.3.- Receptores NMDA: tráfico, distribución y excitotoxicidad.

La transmisión glutamatérgica es el principal blanco de neuropatologías, crónicas y agudas, asociadas con fallas cognitivas. Uno de los principales componentes de la transmisión glutamatérgica son los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPArs), receptor transmembrana ionotrópica que media la transmisión sináptica rápida en el sistema nervioso central, y los de N-metil-D-aspartato (NMDARs). Propiedades únicas, incluyendo la permeabilidad a Ca^{2+} , permiten a los NMDARs jugar un papel crítico en el desarrollo del cerebro, neuropatologías y en la plasticidad sináptica (Carvajal et al. 2016; Cull-Candy et al. 2001). Los NMDARs juegan un papel estructural en la sinapsis, reclutando moléculas de andamiaje y complejos de señalización (Barria and Malinow 2005). Factores críticos para el funcionamiento e integridad de la sinapsis son el número, la permeabilidad y la composición de las subunidades de los NMDARs sinápticos, los cuales deben estar bien controlados para regular la adecuada entrada de Ca^{2+} y la activación de diferentes cascadas de señalización asociadas con el receptor y su funcionamiento. La desregulación en la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDARs contribuye a la muerte neuronal durante el daño agudo, como ocurre en TC e isquemia, así como en diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de EA y la EH (Carvajal et al. 2016; Hynd et al. 2004). En cuanto a su estructura, los NMDARs

funcionales son canales heterótetraméricos y están formados por 2 subunidades GluN1 y GluN2 subunidades GluN2/3 (Traynelis et al. 2010). Estas subunidades tienen diversas variantes: una única subunidad GluN1 con 8 variantes de splicing, 4 subunidades GluN2 (GluN2A, B, C y D), y 2 subunidades GluN3. Cada subunidad contiene, estructuralmente hablando, un dominio extracelular N-terminal, una vuelta reentrante que forma el poro del canal y un dominio intracelular C-terminal. El glutamato se une a la subunidad GluN2, mientras que la glicina, un co-agonista, se une a la subunidad GluN1. El bucle interno de cada subunidad es el dominio que une Mg^{2+} , el cual bloquea el canal y es el sitio que permite la permeabilidad a Ca^{2+} (Figura 2; Traynelis et al. 2010). Aunque la subunidad GluN1 es crítica para la funcionalidad de los NMDARs, es la subunidad GluN2 la que le confiere especificidad en propiedades biofísicas y farmacológicas como la sensibilidad a poliaminas, protones, Zn^{2+} , afinidad por glutamato, permeabilidad específica para Ca^{2+} y diferentes características cinéticas, incluyendo probabilidad de apertura y tiempo de desactivación (Groc and Choquet 2009). Adicionalmente, la subunidad GluN2 le confiere al receptor propiedades en el tráfico y destino de los NMDARs en la membrana plasmática neuronal y en los distintos compartimentos sinápticos (Traynelis et al. 2010). En cuanto a la distribución de las subunidades, la subunidad GluN2A aparece más abundante en sitios sinápticos mientras que GluN2B está presente tanto en dominios sinápticos y como en dominios extrasinápticos. Además, los receptores que contienen GluN2B tienen difusión más rápida que los que contienen GluN2A en sitios de sinapsis madura (Groc et al. 2006) y se encuentran insertos en la sinapsis de manera constitutiva independiente de la actividad neuronal, por el contrario, la incorporación de los receptores que contienen GluN2A requieren actividad sináptica y son acumulados intracelularmente cuando se bloquea su actividad (Barria and Malinow 2002). El tráfico y la actividad de los NMDARs está directamente relacionado con

procesos para la formación de memoria, incluyendo la potenciación a largo plazo o LTP (del inglés long-term potentiation) en donde los NMDARs translocan hacia la membrana plasmática de la región post-sináptica y regulan la inserción de los AMPARs, los cuales son los principales responsables de la potenciación. Por otro lado, la depresión a largo plazo o LTD (del inglés long-term depression) es producto de la internalización de estos receptores (Lau et al. 2009; Montgomery et al. 2005; Peng et al. 2010). Para la LTP, el papel estructural de los receptores de NMDA que contienen la subunidad GluN2 parece ser más crítica que los canales que se forman por los GluN3. A pesar de esto, la LTP puede ser inducida cuando las subunidades GluN2B son farmacológicamente inhibidas, pero se reprime su inducción cuando se inhibe su expresión (Foster et al. 2010). Este papel estructural está relacionado con el fragmento C-terminal de GluN2B (Cerpa et al. 2016). Por lo tanto, la LTP no es restaurada por la subunidad GluN2A en ausencia de GluN2B, pero la subunidad GluN2A cuyo fragmento C-terminal fue reemplazado por el fragmento C-terminal de la subunidad GluN2B, restaura la LTP, indicando que este fragmento C-terminal es importante para la plasticidad sináptica (Figura 2 A y B)(Foster et al. 2010).

El tráfico de los NMDARs puede ser entre organelos intracelulares y la membrana plasmática (Grosshans et al. 2002; Lavezzari et al. 2004), así como también entre sitios sinápticos y extrasinápticos (Goebel-Goody et al. 2009). Los NMDARs ubicados en sitios sinápticos son los encargados de la transmisión sináptica en diversos circuitos neuronales y de activar vías de señalización de supervivencia neuronal y plasticidad sináptica como la vía CREB (cAMP response element-binding protein) (Huang and Hsu 2008) (Figura 3A). Por el contrario, los NMDARs ubicados en sitios extrasinápticos, al ser activados, son capaces de

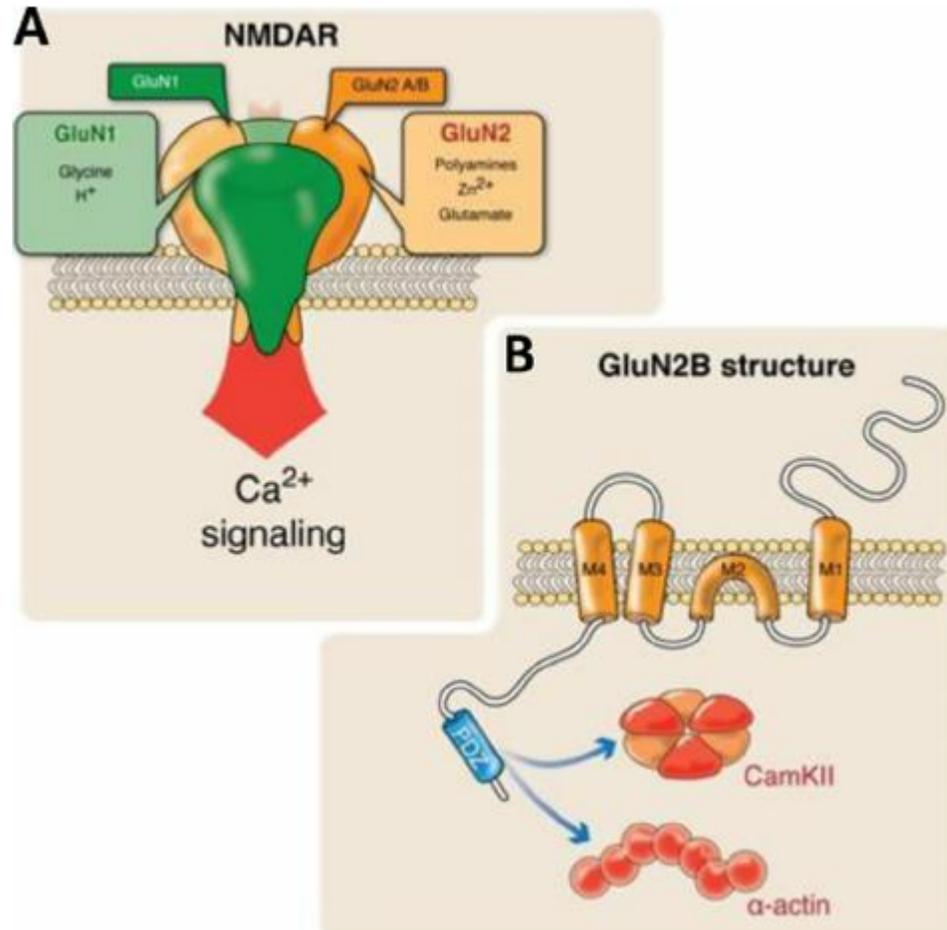


Figura 2: Esquema de la estructura general de los NMDARs. **A.** la estructura tetramérica del NMDAR con dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2A/B, permitiendo la entrada de Ca^{2+} . La regulación del receptor incluye el efecto de poliaminas, glicina, H^+ , Zn^{2+} , D-serina y glutamato. **B.** Dominios estructurales de la subunidad GluN2B del NMDAR, el cual posee un largo dominio C-terminal que contiene un dominio PDZ que interacciona con varias proteínas posinápticas, incluyendo CamKII y α -actina (Extraído de Cerpa et al, 2016).

encender cascadas intracelulares pro-apoptóticas como la activación de proteasas incluyendo calpains (Hardingham and Bading 2010) (Figura 3). El cambio de la localización de los NMDARs depende principalmente del estado de fosforilación de sus subunidades, especialmente en las fosforilaciones que involucran a la subunidad GluN2B (Goebel-Goody et al. 2009). Prueba de esto es el uso de inhibidores de quinasas y fosfatasa en residuos de tirosina, que demuestran que la fosforilación en distintos residuos tirosina en los NMDARs está asociada a su expresión y localización en la superficie neuronal (Goebel-Goody et al. 2009; Hallett et al. 2006). Estudios más detallados han demostrado que la fosforilación en el residuo Y1472 de la subunidad GluN2B, por quinasas de la familia Src, está asociado a un enriquecimiento en la región sináptica (Barria and Malinow 2002; Salter et al. 2004; Salter and Kalia 2004), mientras que la fosforilación Y1336 de la subunidad GluN2B está asociada a un enriquecimiento extrasináptico (Barria and Malinow 2002; Goebel-Goody et al. 2009) (Figura 3B).

1.4.- Contribución de fosfatasa en la sinapsis glutamatérgica

La modulación de los NMDARs depende del estado de fosforilación de sus subunidades, por lo tanto el papel de las fosfatasa es crucial para su actividad y distribución (Goebel-Goody et al. 2009). Una de las fosfatasa más importantes es STEP (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase), la cual se encuentra enriquecida en diferentes núcleos cerebrales incluyendo el estriado, la corteza y el hipocampo. Existen diversas isoformas, las más importantes y las que presentan actividad fosfatasa son STEP₄₆ la cual es citoplasmática y STEP₆₁ con presencia en terminales post-sinápticos de sinapsis glutamatérgica formando complejos con los NMDARs y PSD-95, la cual puede ser hidrolizada por calpaínas a STEP₃₃, sin actividad fosfatasa (Boulanger et al. 1995; Paul et al. 2003; Won et al. 2016). La

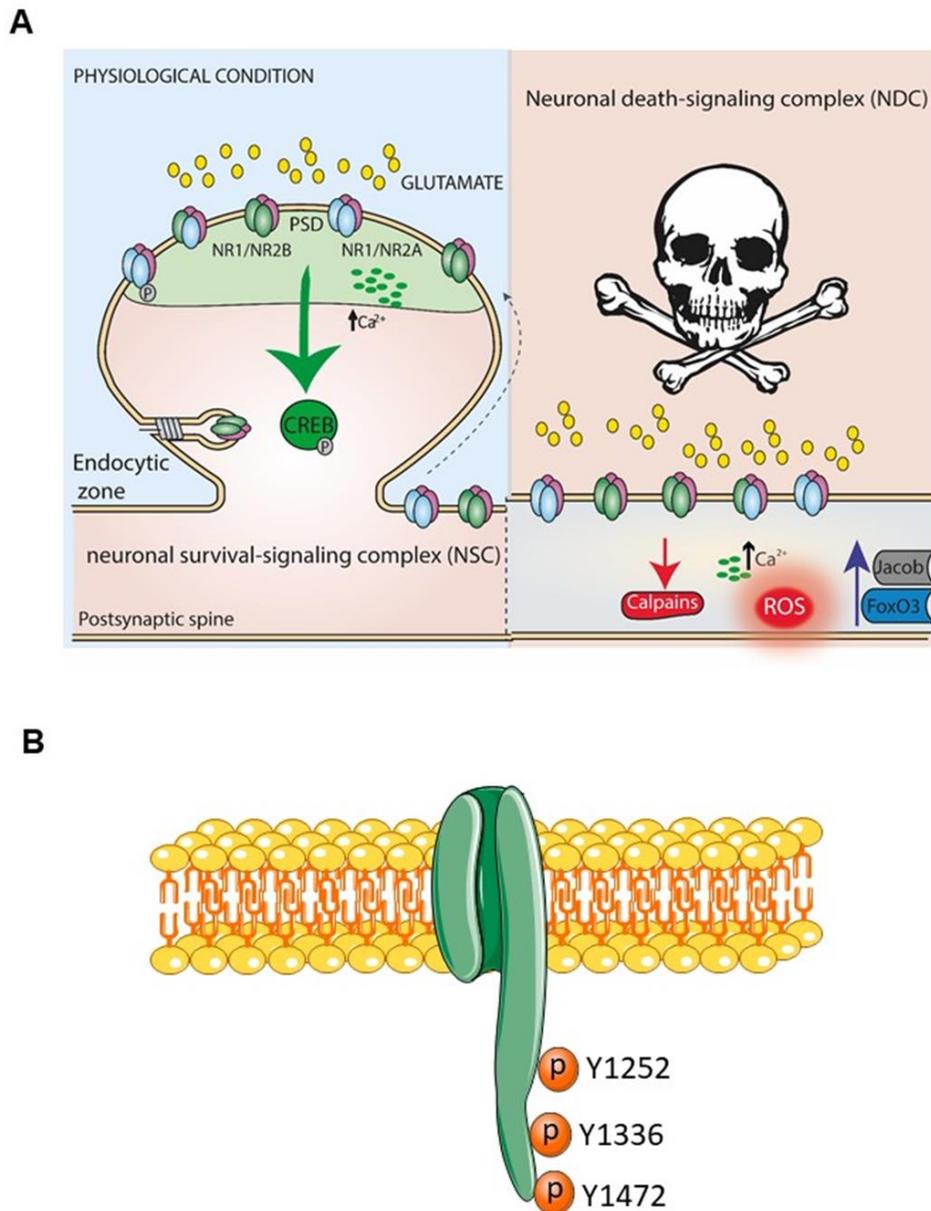


Figura 3: Esquema del antagonismo de la señalización de los NMDARs sinápticos y extrasinápticos. **A.** Esquema simplificado de la señalización correspondiente a los receptores sinápticos, los cuales permiten la entrada de calcio y activan vías de señalización de supervivencia como la vía CREB. Por otro lado, la activación de los NMDARs extrasinápticos, que también permiten la entrada de calcio, activan calpaínas y otras vías de señalización proapoptóticas incluyendo la activación de FoxO3, Jacob y p38 (modificado de Carvajal et al, 2016). **B.** Diagrama ilustrativo de la subunidad GluN2B de los NMDARs y las tirosinas con fosforilaciones con función conocidas destacando principalmente la fosforilación en tirosina 1336, que provoca un enriquecimiento del receptor en zonas extrasinápticas y la fosforilación en tirosina 1472 que provoca un enriquecimiento del receptor en zonas sinápticas.

sobreexpresión de STEP produce falla sináptica por la desfosforilación de sus sustratos, estos incluyen miembros de la familia MAPK, ERK, p38 y la subunidad GluN2B (Y1472) de los NMDARs lo cual reduce la presencia en la sinapsis de los NMDARs (Goebel-Goody et al. 2009; Munoz et al. 2003; Paul et al. 2003) lo cual se traduce en una regulación negativa de la LTP y una modulación en la plasticidad sináptica homeostática, dado que promueve la internalización de estos receptores a través de endocitosis dependiente de clatrina (Braithwaite et al. 2006; Jang et al. 2015; Pelkey et al. 2002) (Figura 4). Esta fosfatasa es activada por desfosforilación de la serina 221 mediada por la fosfatasa calcineurina (previamente activada por los NMDARs) (Paul et al. 2003) o regulada por GPCRs (principalmente receptores de dopamina) debido a que puede ser fosforilada por PKA y así pasar a ser inactiva (Paul et al. 2000). Además esta inactivación permite que STEP sea ubiquitinada y degradada vía proteosoma (Xu et al. 2009). A nivel sináptico la activación de STEP₆₁ disminuye la presencia en la zona postsináptica tanto de los NMDARs como de los AMPARs (Jang et al. 2015). En el caso de los NMDARs, esto lo realiza a través de dos mecanismos, uno directo, el cual es a través de la desfosforilación del residuo de tirosina 1472 de la subunidad GluN2B (Braithwaite et al. 2006) e indirectamente a través de la inactivación de la kinasa Fyn (kinasa responsable de esta fosforilación). Esta inactivación la realiza desfosforilando el residuo de tirosina 420 de Fyn (Nguyen et al. 2002). Rio debajo de la señalización sináptica NMDAR-dependiente, STEP₆₁ sigue regulando la señalización producida tras la estimulación sináptica, por ejemplo desfosforila e inactiva la señalización mediada por ERK, esto a través de la desfosforilación de las tirosinas 204 y 207 (Goebel-Goody et al. 2012a).

La estimulación de los NMDARs extrasinápticos activa a las calpaínas, proteasas dependientes de calcio. Uno de los sustratos de las calpaínas, en concreto la μ -calpaína, es STEP₆₁, la cual sufre un corte proteolítico que genera un producto de degradación de 33KDa (STEP₃₃, Figura 4) (Wang et al. 2013; Xu et al. 2009). La proteína p38-MAPK es uno de los sustratos con los que interacciona STEP y se encuentra en abundancia en las regiones extrasinápticas, se ha descrito que contribuye a la muerte neuronal mediada a través de la exposición crónica a NMDA o glutamato en las células granulares cerebelosas o en las neuronas corticales (He et al. 2013; Xue et al. 2014; Zhou et al. 2013a; Zhou et al. 2013b).

Otros estudios indican que la actividad de STEP se encuentra aumentada en enfermedades neurodegenerativas como la EA, esquizofrenia y en condiciones agudas, como la ingesta de alcohol, demostrando que STEP interfiere con la actividad sináptica y participa en la generación de las fallas cognitivas presentes en estos desordenes. Esto ocurre a través de la modulación de los NMDARs, específicamente a través de la desfosforilación de Y1472 (Carty et al. 2012; Hicklin et al. 2011; Zhang et al. 2010). En la misma línea, se ha demostrado la EA existe un aumento de los NMDARs extrasinápticos y el uso de inhibidores de STEP en modelos de EA revierte los daños cognitivos (Wang et al. 2013; Xu et al. 2014). Evidencia más directa, demostrada en ratones modelo de Huntington, indican que la sobreactivación de STEP, induce una mayor localización de NMDARs extrasinápticos en neuronas del estriado (Gladding et al. 2012). El mecanismo por el cual los niveles y la actividad de STEP están reguladas en estas enfermedades que poseen como mecanismo común el estrés oxidativo, tal como se mencionó anteriormente, es a través de oligomerización que se establece a través de la interacción de dos residuos disulfuro (Cys65-

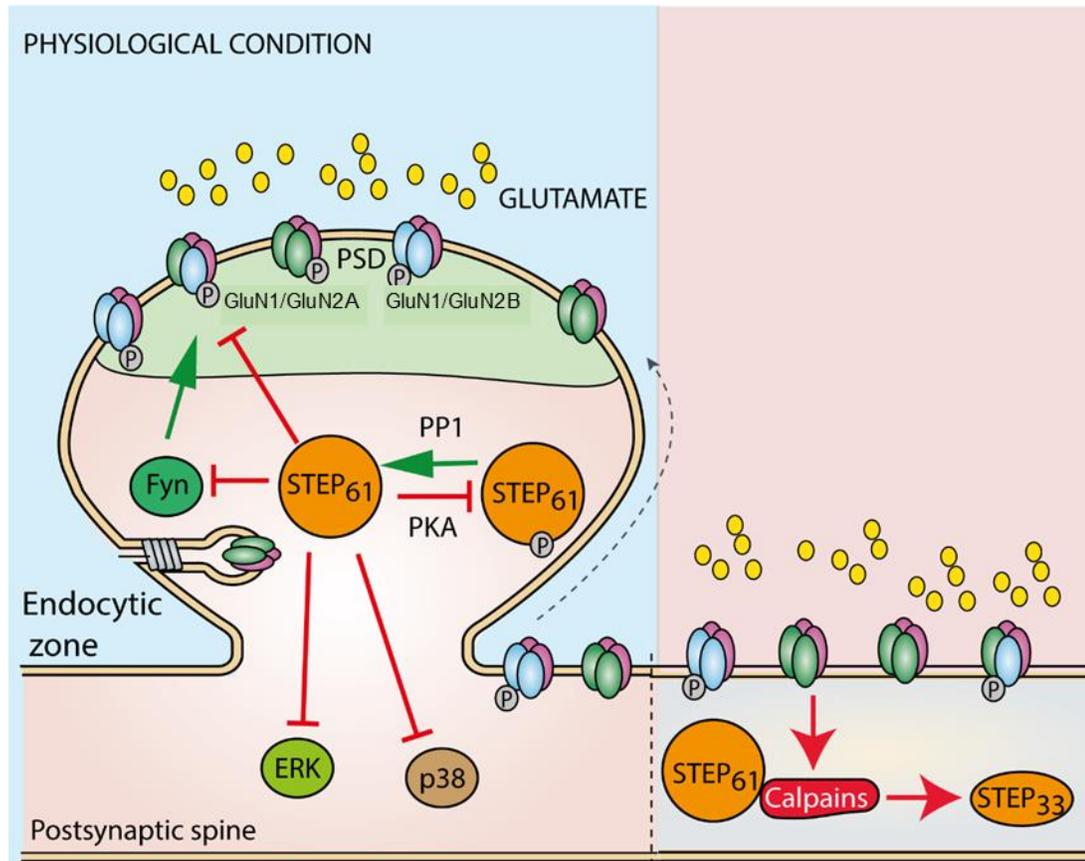


Figura 4: Esquema del mecanismo de acción de la fosfatasa STEP₆₁. Mecanismo de acción de la fosfatasa STEP₆₁, que bajo condiciones de actividad sináptica normal es ubiquitinada y degradada vía proteosoma. Esta fosfatasa actúa desfosforilando directamente a la subunidad GluN2B en la tirosina 1472 o inactivando la kinasa Fyn que provoca esta fosforilación encargada de mantener al NMDAR en la sinapsis. Otro blanco canónico de STEP es MEK y ERK, desfosforilando e inactivando sus vías de señalización. La activación de los NMDARs extrasinápticos provoca la activación de calpaínas que provocan la degradación de STEP dejando un subproducto de 33 KDa (STEP₃₃).

Cys76) producida directamente por el incremento del ambiente oxidativo dentro de la neurona. Esta dimerización de STEP₆₁ mantiene su actividad y es de difícil degradación, mientras que en oligómeros de mayor tamaño la actividad fosfatasa va disminuyendo (Deb et al. 2011).

Por otro lado PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome TEN), que posee actividad fosfatasa y fosfolipasa, contribuye al daño neuronal tras daño por isquemia y excitotoxicidad (Gary and Mattson 2002; Ning et al. 2004). Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estas funciones siguen estando poco caracterizados. Se ha descrito que PTEN promueve la supresión de tumores la cual depende principalmente de su actividad fosfolipasa, que antagoniza con su actividad fosfatasa sobre PIP₃ (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, Figura 5). Esta actividad fosfatasa promueve la activación de la vía de señalización PI3K/Akt (Maehama and Dixon 1998; Stambolic et al. 1998). La actividad de PTEN es regulada por el estado oxidativo de la célula, principalmente por acción de los aniones peróxido que gatilla la generación de puentes disulfuro entre los residuos Cys71 y Cys 124 del dominio fosfatasa, alterando su interacción con proteínas reguladoras y de señalización (Kwon et al. 2004; Lee et al. 2002). En células cancerígenas, se ha observado niveles incrementados de ROS debido a su alta actividad proliferativa, debido en parte a la acción de PTEN sobre la vía de señalización PIP₃/Akt, la cual regula el estado proliferativo de las células (Stambolic et al. 1998; Wang et al. 2018). Además, durante estados oxidativos elevados PTEN es capaz de translocar al núcleo donde es capaz de inducir la síntesis de elementos de respuesta antioxidantes como Nrf2 y NQO1 (NADH quinona reductasa) (Luo et al. 2018; Yamadori et al. 2012). En neuronas, este efecto antagónico tiene directa implicancia en la participación de PTEN en la LTD debido a su actividad fosfatasa en PIP₃,

apagando esta vía de señalización (Arendt et al. 2014; Jurado et al. 2010). Otros estudios han identificado un aumento de la translocación nuclear de PTEN como un paso esencial para activar las cascadas de señalización que conducen a apoptosis mediante daño por excitotoxicidad asociada a los NMDARs en lesiones cerebrales (Lai et al. 2011). Las evidencias que apoyan el papel de PTEN en lesiones neuronales mediante la modulación de los NMDARs son varias, entre ellas destacan que la translocación nuclear de PTEN es un evento que ocurre tras la activación de vías de muerte celular mediadas por NMDARs que contienen la subunidad GluN2B (Figura 5). Además, la sobreexpresión nuclear de un dominante negativo de PTEN reduce la excitotoxicidad mediada por glutamato. La ablación de PTEN previenen la excitotoxicidad mediada por NMDARs en neuronas y protege contra daño cerebral isquémico (Chang et al. 2007; Knafo et al. 2016). Además en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas, como modelos de migraña recurrente y modelos de la enfermedad de Alzheimer, la actividad y los niveles de esta fosfatasa se encuentra alterada, demostrando una directa relación con el mal funcionamiento sináptico dependiente de los NMDARs (Knafo and Esteban 2017; Knafo et al. 2016; Qin et al. 2016).

Por los antecedentes expuestos anteriormente señalados, se hace relevante el estudio de ambas fosfatasas PTEN y STEP sobre la modulación de los NMDARs y su balance entre la activación de receptores sinápticos y extrasinápticos en diversos contextos patológicos en donde el estrés oxidativo se encuentra elevado como en enfermedades neurodegenerativas o daños agudos como la isquemia y el TC.

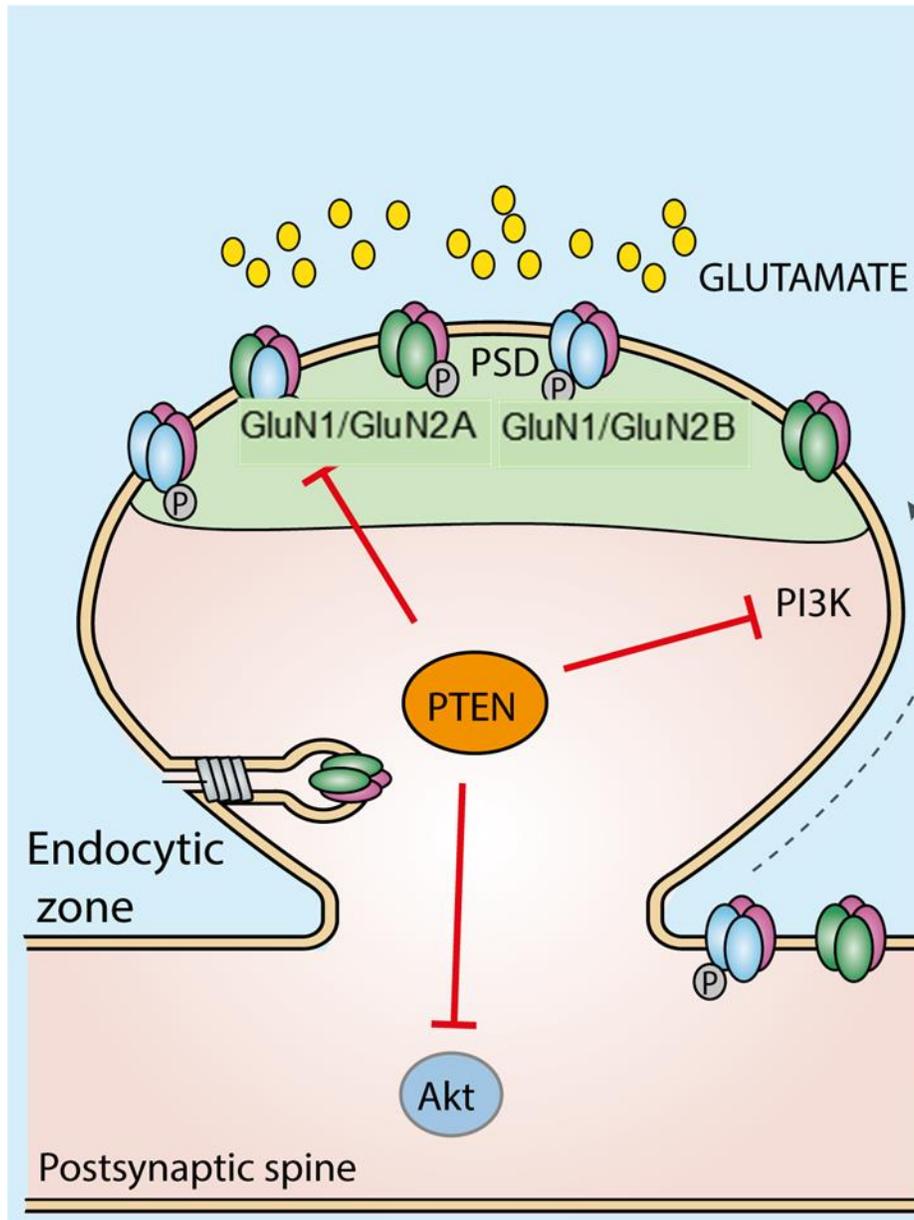


Figura 5: Esquema del mecanismo de acción de la fosfatasa PTEN. Mecanismo de acción de la fosfatasa y fosfolipasa PTEN. En cuanto a su acción fosfolipasa, está encargada de la fosforilación del inositol-trifosfato. En cuanto a su acción fosfatasa, tiene como blanco la desfosforilación de Akt con la inhibición de su vía río abajo y de la desfosforilando directamente a la subunidad GluN2B en la tirosina 1472.

2.- Hipótesis y objetivos

2.1.- Hipótesis

El daño oxidativo producido por trauma cerebral altera la distribución sináptica/extrasináptica de los NMDARs por un mecanismo dependiente de las fosfatasa PTEN y STEP

2.2.-Objetivo general

Demostrar que el daño oxidativo producido por trauma cerebral genera cambios en la localización de los NMDARs en regiones sinápticas y extrasinápticas, a través de la modulación de las fosfatasa STEP y PTEN.

2.3.- Objetivos específicos

- **1.-** Evaluar los daños que se producen a nivel funcional por el estrés oxidativo en animales con capacidad antioxidante reducida (ratones SOD2^{+/-})
- **2.-** Demostrar que el daño oxidativo en ratones SOD2^{+/-} induce cambios en la señalización asociada a los NMDARs en regiones sinápticas y extrasinápticas.
- **3.-** Evaluar el papel de las fosfatasa STEP y PTEN en la señalización sináptica/extrasináptica de los NMDARs durante la acumulación de daño oxidativo en ratones SOD2^{+/-}.
- **4.-** Evaluar los daños funcionales producidos en animales sometidos a trauma cerebral

- **5.-** Demostrar que el trauma cerebral induce cambios en la señalización de los NMDARs en regiones sinápticas y extrasinápticas.
- **6.-** Evaluar el papel de las fosfatasas STEP y PTEN en la señalización sináptica/extrasináptica de los NMDARs durante el trauma cerebral.

3.- Metodología/materiales y métodos

3.1.-Animales utilizados y tratamientos

Un grupo de ratones reproductores heterocigotos $Sod2^{tm11eb/j}$ ($SOD2^{+/-}$) fueron obtenidos desde Jackson Laboratory (Sacramento, CA, USA). Estos ratones poseen el fondo genético de los animales C57BL/6. La colonia se estableció cruzando animales C57BL/6 y animales $SOD2^{+/-}$. Las crías fueron genotipificadas como se describe en el protocolo de Jax Labs. Los ratones C57BL/6 de 2 meses de edad fueron provistos y mantenidos por el vivero central de la Pontificia Universidad Católica con agua y comida *ad libitum*. Los tratamientos con los inhibidores para las fosfatasas PTEN y STEP fueron administrados de forma intraperitoneal 3 veces a la semana durante las sesiones de inducción de trauma y durante el tiempo de reposo hasta el día del sacrificio (Ver esquema del protocolo en figura 5B). Los inhibidores utilizados fueron: Para STEP, TC-2153 (8-(Trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride), Sigma-Aldrich, USA, a una concentración de 6 mg/Kg por peso de animal. Para inhibir PTEN se utilizó el inhibidor VO-OHPic ((OC-6-45) Aqua (3-hydroxy-2-pyridinecarboxylato-kapaN1, kapaO2) [3-(hydroxy-kapaO)-2-pyridinecarboxylato(2-)-kapaO2]oxo-vanadate(1), hydrogen, trihydrate), Chem Cruz, Sta Cruz Biotechnology, USA, a una concentración de 10 ug/Kg de peso de animal.

3.2.-Modelo de generación de trauma cerebral

El daño cerebral fue generado utilizando el modelo de trauma cerebral por impacto frontal descrito por Kilbourne y cols. (2009; (Kilbourne et al. 2009)) para ratas con las modificaciones necesarias para utilizarlo en un modelo de ratón (Figura 6A). El daño generado por el impacto es por la aceleración rotacional antero-posterior del cerebro dentro

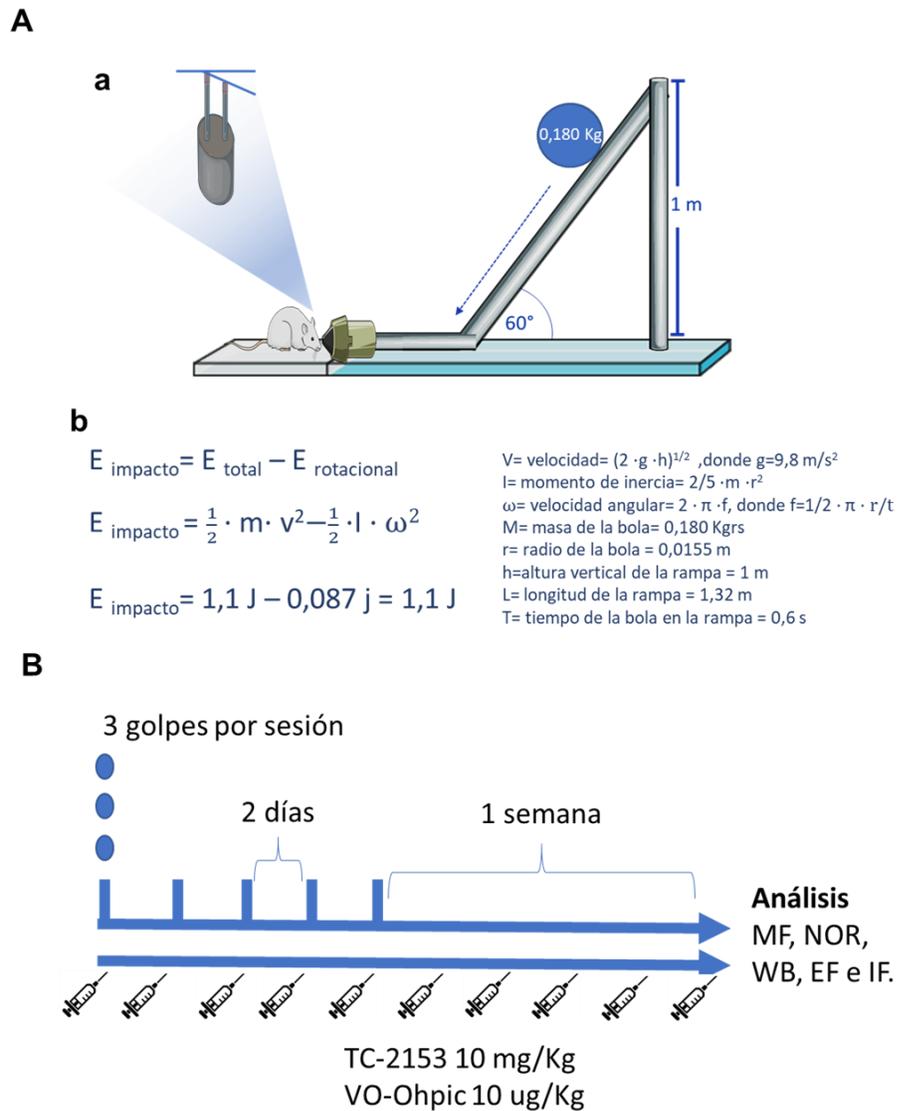


Figura 6: Protocolo experimental y diseño del modelo de trauma cerebral moderado y repetitivo. **Aa.** Dispositivo de fuerza controlada que genera el impacto frontal en ratones, el cual consiste en un riel con un ángulo de 60° y de 1 metro de altura por el cual se deja caer una bola de 200 gr que impacta a un adaptador acoplado a las prominencias malares del roedor. **b.** Fórmula utilizada para calcular la fuerza de impacto, extraído de Kilbourne et al, 2009. **B.** Diagrama que representa la frecuencia de golpes y la frecuencia de la inyección de los inhibidores utilizados. Se dieron 5 sesiones de golpes cada dos días. Cada sesión consiste en 3 golpe. Los animales fueron sacrificados 1 semana después de la última sesión de inducción de trauma cerebral. La inyección de los inhibidores fue realizada antes de la sesión de golpes y se siguió con la misma frecuencia hasta el día de sacrificio o de inicio de pruebas conductuales. (MF, memory flexibility test; NOR, novel object recognition test, WB, western-blot, EF, electrofisiología; IF, inmunofluorescencia)

del cráneo intacto. El dispositivo consiste en un riel metálico con una inclinación de 60° y 1 m de altura. La energía de impacto (calculada en 1.1 J, ver Figura 6 Ab) es aplicada mediante una bola de acero de 180 gr que se deja caer por el riel. La bola golpea un adaptador acoplado a las prominencias malares del roedor. Cabe destacar que el adaptador posee fijadores de distinta longitud lo que provoca la energía rotacional del impacto (Figura 6A). La sesión de impacto conto de 3 golpes consecutivos cada 2 días, con un total de 5 sesiones. Los animales fueron sacrificados una semana tras la última sesión de inducción de trauma. En el momento del impacto los animales se encontraban anestesiados previamente con isoflurano al 2% en una cámara cerrada. Como analgésico se utilizó Tramadol por vía oral a una dosis de 30 mg/kg cada 12 horas por 2 días. Los animales fueron supervisados de acuerdo a la pauta de supervisión animal aprobada por el protocolo de bioética de la Pontificia Universidad Católica (Identificación código ético científico 15073025) y por la evaluación de parámetros psicomotrices descritos en la tabla 1. Como grupo control se considerarán ratones anestesiados, posicionados en el dispositivo, sin ser expuestos al trauma (Sham).

3.3.-Ensayos conductuales

3.3.1.-Memoria espacial

Todos los animales fueron entrenados en una piscina circular (110 cm de diámetro y 30 cm de profundidad) (Bakhit et al. 1984; Morris 1984). Dentro de la piscina se ubica una plataforma de 9 cm de diámetro sumergida aproximadamente 1 cm bajo el nivel del agua. El agua es mantenida entre 17 y 19 °C. Se utiliza un régimen de tres ensayos por día durante diez días. Cada ensayo comienza cuando el animal es puesto en la piscina y termina una vez que el animal ha encontrado la plataforma o hasta 60 s de nado. Luego de este tiempo, si el animal no alcanza la plataforma, este es tomado y puesto en ella por un periodo de tiempo

entre 10 y 15 s y devuelto a su caja. El tiempo que transcurre desde que el animal comienza la exploración hasta que encuentra la plataforma oculta bajo la superficie se denomina latencia de escape (medida en segundos). Los datos fueron registrados y monitoreados automáticamente utilizando el programa ANY-maze (ANY-maze video tracking system, Stoelting Co. Wood Dale, IL, USA).

3.3.2.- Flexibilidad de memoria

El protocolo de flexibilidad de memoria se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Morris e implementado en nuestro laboratorio (Carvajal et al. 2018; Chen et al. 2000). Utilizando el mismo sistema de análisis para la memoria espacial, el animal es entrenado para aprender la posición de una plataforma escondida. Se fijó un criterio para evaluar que el animal ha aprendido y este criterio consiste en que el animal debe llegar a la plataforma tres veces seguidas con un tiempo promedio menor a 20 s y con ningún tiempo superior a 30 s. Se entrena al animal hasta lograr el criterio de aprendizaje, manteniendo entre ensayos un tiempo no mayor a 15 minutos. El número de veces necesario para lograr el criterio de aprendizaje es registrado para cada animal. El ensayo se repite durante 4 días seguidos, durante los cuales cada día se cambia la posición de la plataforma y el punto de entrada a la piscina en un patrón pseudo al azar, con el objetivo de no mantener una correlación entre el punto de entrada, la posición de la plataforma y las señales espaciales presentes.

3.3.4.- Prueba de reconocimiento de objeto nuevo

El paradigma de reconocimiento de objeto novedoso (*novel object recognition*, NOR), toma ventaja de la tendencia innata de los ratones por explorar más tiempo un objeto novedoso que uno familiar, descrito anteriormente en (Broadbent et al. 2010; Ennaceur 2010;

Inestrosa et al. 2013). Para esto se utilizó una caja de acrílico blanco de 47x 47 cm (largo x ancho) y 32 cm de alto. Se utilizaron diferentes objetos, ladrillos plásticos de color amarillo y frascos cilíndricos plásticos de color rojo. Los objetos correspondientes fueron colocados simétricamente. Los datos fueron registrados y monitoreados automáticamente utilizando el programa ANY-maze (ANY-maze video tracking system, Stoelting Co. Wood Dale, IL, USA). Antes de la prueba, los animales fueron sometidos a un proceso de habituación, el cual consiste en colocar al animal en la caja durante 15 minutos sin objetos durante 3 días seguidos. Estas sesiones permiten que los animales se familiaricen con el contexto previamente a la sesión de entrenamiento. El día de prueba comienza con 10 minutos en donde el animal es puesto en la caja con dos objetos iguales, en esta sesión ocurre el aprendizaje de los objetos. 5 horas más tarde comienza el proceso de evaluación el cual dura 5 minutos y consiste en poner el animal en la caja, manteniendo uno de los objetos de la sesión anterior y cambiando el otro objeto por uno nuevo. Se utiliza el tiempo empleado por los ratones para explorar cada objeto, considerándose exploración mordedura al objeto, o que tocara el objeto con las extremidades delanteras, nariz o vibrisas. El resultado es expresado como índice de preferencia, el cual es calculado de la siguiente manera:

Índice de preferencia = (Tiempo en objeto novedoso / Tiempo en objeto conocido + Tiempo en objeto novedoso)

3.4.-Análisis histológicos y de inmunofluorescencia

La perfusión, la fijación, los procedimientos inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia con rebanadas de cerebro y el análisis de imágenes se efectuaron como se ha descrito previamente en el laboratorio (Carvajal et al. 2018; Carvajal et al. 2013). Se anestesiaron los ratones con ketamina/xilazina y se perfundieron con suero salino

(NaCl 0,9%) seguido de una perfusión con paraformaldehído 4% en PBS (buffer fosfato salino) para la fijación. Se removieron los cerebros y se post-fijaron en la misma solución fijadora por 16 horas a temperatura ambiente, para luego ser almacenados en sacarosa 10% en PBS a 4°C. Luego se seccionaron los cerebros en rebanadas coronales de 30 µm usando un criostato (Leica CM1850, Alemania) a -20°C, segregando secciones de cada cerebro en diferentes grupos para los posteriores análisis.

La inmunodetección de proteínas por inmunofluorescencia fue llevada a cabo con una metodología análoga a la ya descrita (Carvajal et al. 2018). La eliminación de autofluorescencia fue realizada por la incubación de los cortes en NaBH₄ 10 mg/ml por 10 minutos. El anticuerpo primario es detectado por medio del anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (Ver tabla 1). Luego de la inmunodetección los cortes fueron montados en portaobjetos y cubiertos con medio de montaje para fluorescencia (Dako, USA).

Los cambios morfológicos a nivel cerebral, se realizaron mediante la tinción de Nissl. Las rebanadas son montadas en portaobjetos y deshidratadas utilizando una batería de alcoholes y xilol para luego ser teñidas con Cresyl violeta acetato 0.1% y montadas en bálsamo de Canadá (Synth, Brasil). Las secciones de cerebro teñidas fueron fotografiadas con un microscopio Olympus BX51 acoplado a una cámara Micropublisher 3.3 RTV (QImaging, Surrey, Canada). Para todas las preparaciones se calibró la luminancia de la luz incidente y el tiempo de exposición de manera tal que los valores de pixeles no se escaparan del rango dinámico de las imágenes RGB. Las cuantificaciones se efectuaron en el programa ImageJ v.1.44f (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EEUU), con las imágenes convertidas a 8 bits. Las cuantificaciones fueron realizadas mediante la fórmula

intensidad total corregida (ITC) tanto para intensidad de fluorescencia y densidad óptica integrada. Este valor permite estandarizar la tinción obtenida respecto al área de interés.

$$\text{ITC} = \text{Densidad integrada} - (\text{Área seleccionada} * \text{Intensidad de marca del fondo})$$

3.5.-Ensayos bioquímicos

3.5.1.-Inmunoblot

El hipocampo de los ratones fue disectado en hielo e inmediatamente procesado. 60-80 mg de tejido hipocampal, correspondiente al hipocampo de 2 animales, se homogenizó 400 μL de tampón RIPA (50mM Tris-Cl, pH 7,5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% deoxicolato de sodio, y 1% SDS) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich P8340) e inhibidores de fosfatasas (50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 y 30 μM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) usando un homogeneizador Potter, y luego se hizo pasar secuencialmente por micropipetas y jeringas de calibres decrecientes (1000 μl , 100 μl , jeringa 3 ml y jeringa tuberculina de 1 ml, calibre de aguja 25G). Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm a 4°C dos veces por 10 minutos. Se determinó la concentración de proteínas utilizando *BCA Protein Assay Kit* (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EEUU). 20 o 40 μg de homogenizado se resolvieron por SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF. A continuación, se bloqueó la membrana y se incubaron los anticuerpos primarios seguidos de los secundarios anti-IgG conjugados con peroxidasa, y se reveló usando un kit de sustrato quimioluminiscente ECL o West PICO PLUS (Thermoscientific, Rockford, IL, USA). Los anticuerpos utilizados para la inmunodetección y las concentraciones utilizadas se encuentran en la Tabla1.

Tabla1. Anticuerpos primarios utilizados

Antibody	Company	Dilution
GFAP	Sigma	1:500 for immunofluorescence, 1:1000 for western-blot
Iba-1	Sigma	1:500 for immunofluorescence
4-Hydroxynonenal (4-HNE)	USBiological	1:200 for immunofluorescence, 1:1000 for western-blot
8-Hydroxyguanine (8-OHG)	Santa crus Biotechnology	1:200 for immunofluorescence
Actina	Novus Biological	1:1000 for western-blot
Tubulina	Santa crus Biotechnology	1:1000 for western-blot
GAPDH	Santa crus Biotechnology	1:1000 for western-blot
STEP	Novus Biological	1:1000 for western-blot
PTEN	R&D Systems	1:1000 for western-blot
GluN2B	Sigma	1:1000 for western-blot
GluN2B p-1472	Cell Signaling Technology	1:1000 for western-blot
GluN2B p-1336	Invitrogen	1:1000 for western-blot
p-CREB s113	Novus Biological	1:500 for immunofluorescence, 1:1000 for western-blot
n-Tyrosine	Novus Biological	1:1000 for western-blot
PSD-95	Santa crus Biotechnology	1:1000 for western-blot
PDI	Santa crus Biotechnology	1:1000 for western-blot
Synaptophysin	Santa crus Biotechnology	1:1000 for western-blot
ERK	ThermoFisher Scientific	1:1000 for western-blot
p-ERK	ThermoFisher Scientific	1:1000 for western-blot
AKT	ThermoFisher Scientific	1:1000 for western-blot
p-AKT	ThermoFisher Scientific	1:1000 for western-blot

3.5.2.-Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular utilizado para separar membranas sinápticas (PSD) y no sinápticas (no-PSD), entre otras fracciones subcelulares se realizó utilizando un protocolo descrito con anterioridad (Gladding et al. 2012; Milnerwood et al. 2010), y que se muestra con más detalle en la figura 7.

3.6.- Registros electrofisiológicos

Para realizar los registros electrofisiológicos, se realizaron cortes coronales del hipocampo dorsal de 400 μm , cortados bajo solución de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, *artificial cerebrospinal fluid*; en mM 124 NaCl, 2.6 NaHCO₃, 10 D-glucosa, 2.69

KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄ y 2.60 NaHPO₄) usando un vibrátomo (BSK microslicer DTK-1500E, Ted Pella, Redding, CA, USA) e incubado en ACSF durante 1 hora a temperatura ambiente. En todos los experimentos se utilizó 10 µM de picrotoxina (PTX) con el fin de inhibir la transmisión de los receptores de GABA-A. Luego de la incubación, las rebanadas fueron transferidas a una cámara experimental de 2 ml, con recirculación de solución ACSF gasificada (mezcla utilizada: 95% O₂ y 5% CO₂) de 3 ml/min a temperatura ambiente. Los potenciales de campo post-sinápticos excitatorios evocados (*field excitatory postsynaptic potentials*, fEPSPs) se realizaron a través de un electrodo concéntrico bipolar (Tungsten, 125 µm OD diameter, Microprobes) conectado a una unidad de aislamiento (Isoflex, AMPI, Jerusalem, Israel). La estimulación fue realizada en la zona *Stratum radiatum* a una distancia aproximadamente de 200 µm del electrodo de registro. Los registros fueron filtrados a 2.0-3.0 KHz usando un convertidor A/D (National Instrument) y capturados con el programa WinLTP (Anderson and Collingridge 2007; Carvajal et al. 2018). La transmisión sináptica fue medida usando un protocolo de curvas de intensidad de estimulación versus respuesta sináptica (intensidad/respuesta), el cual consiste en incrementar la estimulación en un rango de 200 a 900 µA (Con un intervalo entre pulsos de 10 s). Para determinar la contribución de los NMDARs en la transmisión sináptica, se realizó el mismo protocolo de *input/output*, pero con la adición de NBQX (1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium) 20 µM. Para generar potenciación a largo plazo (LTP, *long-term potentiation*) fue usado un estímulo de alta frecuencia (*high frequency stimulation*, HFS), el cual consiste en 4 trenes de 100 Hz con un intervalo de 20 s entre ellos. Los datos fueron analizados off-line con el programa pClamp 10 (Molecular Devices).

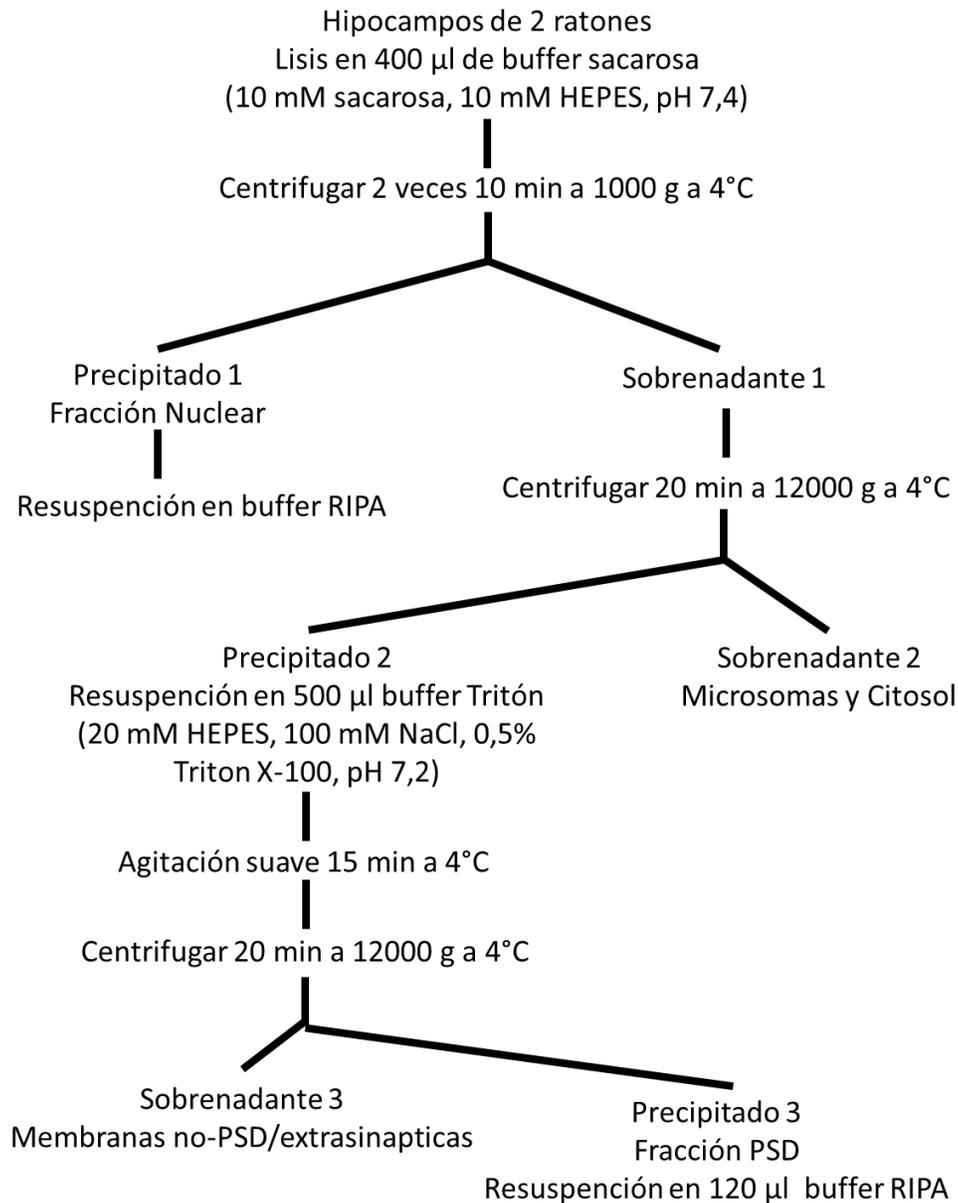


Figura 7. Diagrama del método utilizado para el fraccionamiento celular en hipocampo de ratón. Esquema donde se grafica los pasos y las soluciones utilizadas para el fraccionamiento subcelular de tejido hipocámpal. Desde los hipocampos de dos ratones se pudo obtener fracción nuclear, citosol/microsomas, membrana PSD y membranas no PSD/extrasinápticas.

3.7.- Análisis estadístico

Todos los resultados cuantitativos están graficados en la forma: promedio \pm 'error estándar de la media'. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía, usando la corrección de Bonferroni para comparaciones pareadas múltiples *post hoc*. En los gráficos de barras, los asteriscos indican significancia estadística de las diferencias observadas (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$). Las curvas temporales fueron analizadas utilizando análisis de varianza de medidas repetidas. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa GraphPad Prism 5.

4.- Resultados

4.1-Evaluación del efecto crónico de la acumulación de daño oxidativo, caracterización de los ratones SOD2^{+/-} a distintas edades.

La evaluación del efecto crónico de la acumulación de daño oxidativo y la implicancia de la actividad de las fosfatasa PTEN y STEP en la distribución sináptica/extrasináptica de los NMDARs, corresponde a la primera parte de esta tesis la cual fue publicada en la revista *BBA-Molecular Basis of Disease* a principios del 2018, bajo el título *Age-related NMDA signaling alterations in SOD2 deficient mice* (Carvajal et al. 2018).

4.1.1 Aumento de marcadores de daño oxidativo en rebanadas de hipocampo extraídos de ratones SOD2^{+/-}.

Los ratones heterocigotos SOD2^{+/-} usados en este estudio presentan una disminución de la actividad superóxido dismutasa 2 en varios tejidos. La actividad SOD2 en el cerebro de ratones de 5 semanas de edad decae en un 80% en comparación con un ratón WT (de tipo salvaje, del inglés *wild-type*) de la misma edad (Van Remmen et al. 1999). En nuestro caso nos hemos centrado principalmente en las áreas CA3 y CA1 del hipocampo por su importante participación en memoria y aprendizaje, además de que todos los estudios electrofisiológicos son realizados en estas áreas (Langston et al. 2010).

La disminución de la capacidad antioxidante producida por la disminución de SOD2 provoca un incremento en los marcadores de estrés oxidativo y este incremento es de mayor proporción en animales de edad más avanzada (Figura 8, 9 y 10). En este trabajo hemos evaluado 3 marcadores de estrés oxidativo mediante inmunofluorescencia: nitro-tirosina (n-Tyr, Figura 8, 4-hidroxinoneal, 4-HNE Figura 9 y 8-hidroxiguanina 8OH-dG Figura 10) en las regiones CA3 y CA1 en rebanadas de hipocampo de animales normales y SOD2^{+/-} a dos diferentes edades, 2 y 6 meses de edad. N-tyr es el producto de la nitración de residuos de

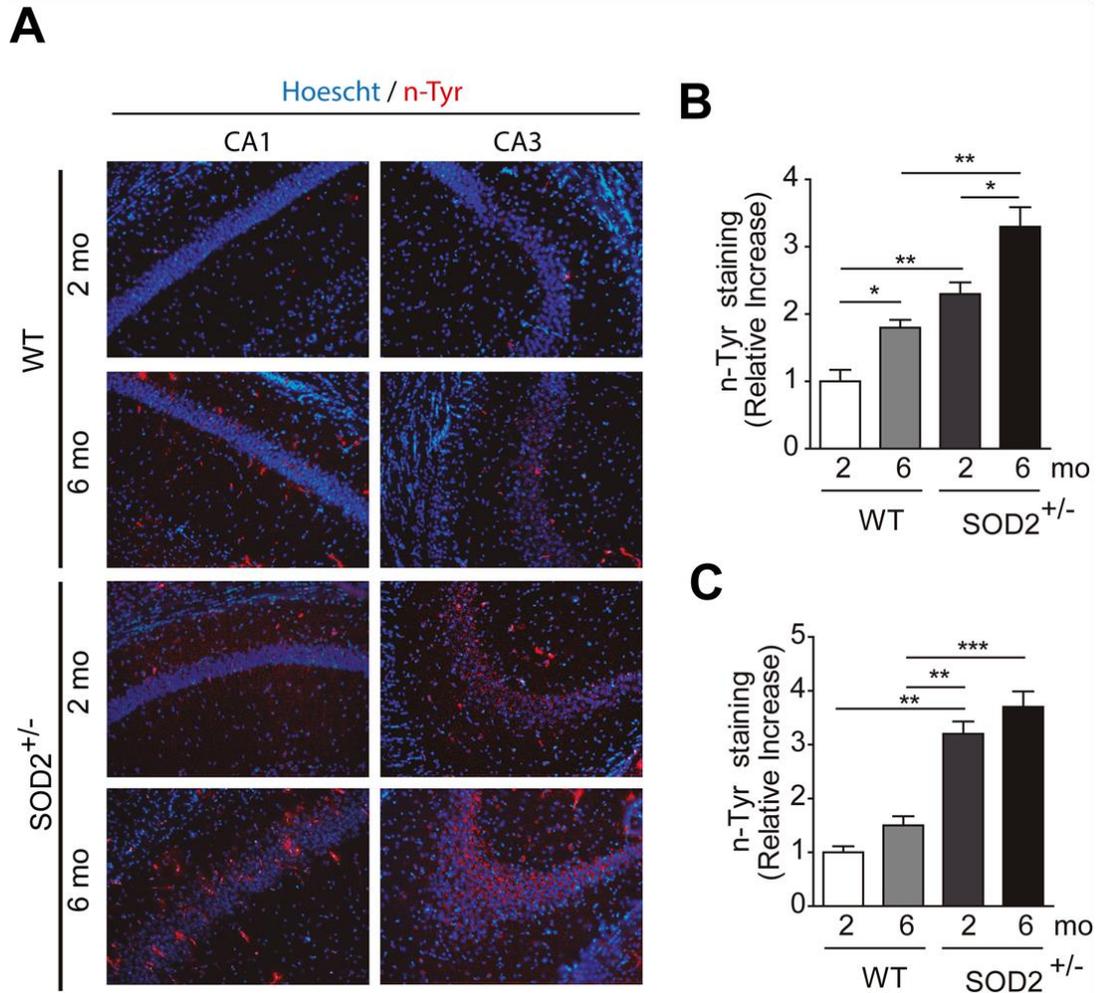


Figura 8. El marcador de estrés oxidativo n-Tyr se encuentra aumentado en los animales SOD2^{+/-}. **A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias contra n-tyr en rebanadas de hipocampo extraídas desde animales WT y animales SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad. Los gráficos muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las regiones CA1 (**B**) y CA3 (**C**) del hipocampo. Tres animales fueron usados por grupo experimental. Se Cuantificaron 6-8 imágenes por sección de cada animal. Los datos son mostrados como promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05; ** <0.01; *** <0.001).

tirosina mediado por especies reactivas de oxígeno como lo son el anión peroxinitrito y el dióxido de nitrógeno (Ferrante et al. 1997). Este marcador incrementa significativamente en la región CA1 de animales WT de 6 meses de edad Figura 7A y 7B. En el caso de los animales SOD2^{+/-}, la marca de n-Tyr aumenta significativamente en comparación a los animales normales de 6 meses de edad. En la región CA3, no se observaron diferencias significativas en la marca de n-Tyr entre los animales normales de 2 y 6 meses de edad (Figura 8A y 8C). Por otro lado, los niveles de n-Tyr en animales SOD2^{+/-} de 2 meses de edad es significativamente superior a los animales WT de 2 y 6 meses de edad y esta diferencia se acentúa en los animales SOD2^{+/-} de 6 meses de edad (Figura 8A y 8C).

Otro marcador de estrés oxidativo evaluado en este trabajo es 4-HNE, un aldehído producto de peroxidación lipídica. Se ha demostrado que 4-HNE está implicado en la etiología de cambios patológicos gatillados por estrés oxidativo y es un importante mediador en la muerte celular por apoptosis inducida por estrés oxidativo a través de la vía mitocondrial que incluye la liberación de citocromo C y la activación de caspasa 3. (Ji et al. 2001; Kim et al. 2015a). En este caso no hemos encontrado diferencias significativas entre animales de 2 y 6 meses de edad al medir los niveles de 4-HNE en CA3 ni CA1 en los ratones WT. (Figura 9A, 9B y 9C). Por otro lado, hemos observado un incremento de 2 veces en la marca para 4-HNE en la región CA1 en los animales SOD2^{+/-} de 2 meses de edad en comparación a los animales WT de la misma edad, y un incremento en más de 3 veces en los animales SOD2^{+/-} de 6 meses de edad (Figura 9A y 9B, respectivamente). En la zona Ca3 del hipocampo solo observamos un incremento en los niveles de 4-HNE en los animales SOD2^{+/-} de 6 meses de edad (Figura 9A y 9C).

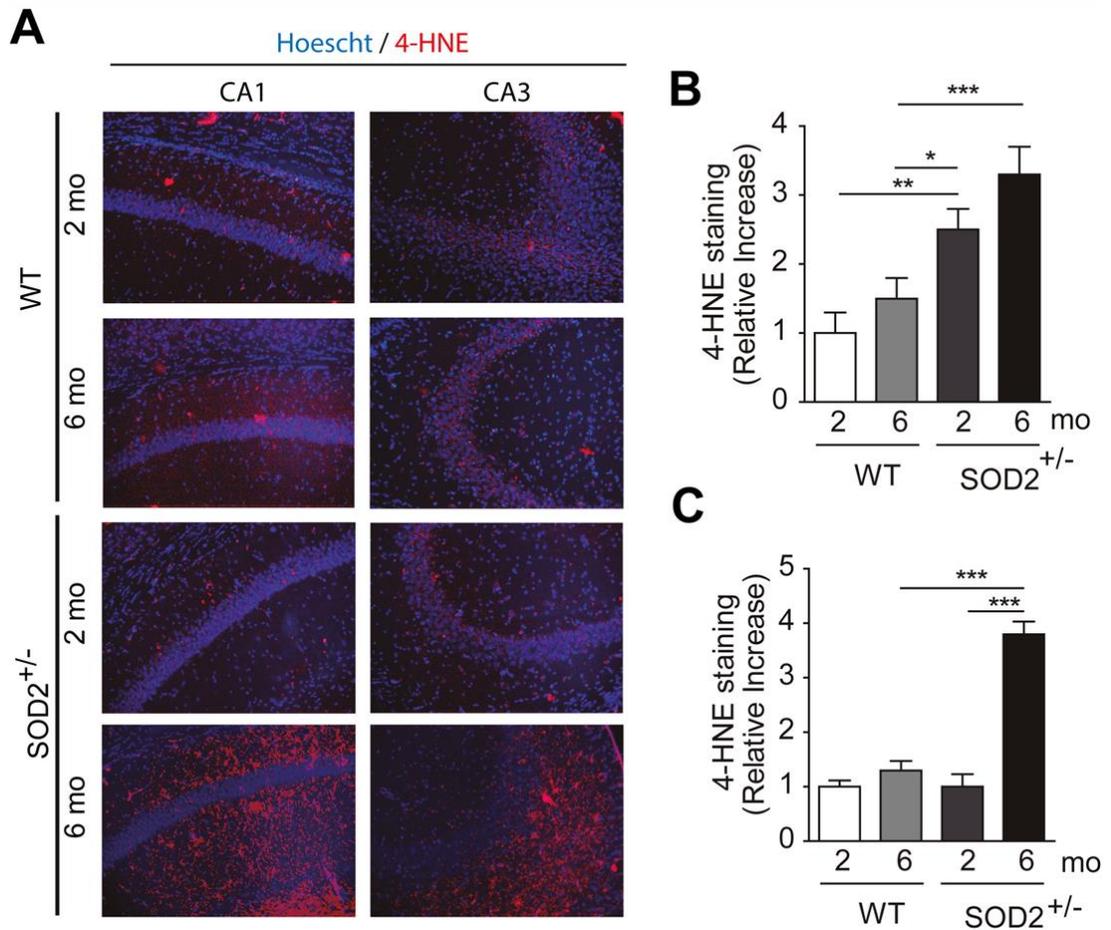


Figura 9. El marcador de estrés oxidativo 4-HNE se encuentra aumentado en los animales SOD2^{+/-} comparado con animales control de la misma edad. **A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias contra 4-HNE en rebanadas de hipocampo extraídas desde animales WT y animales SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad. Los gráficos muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las regiones CA1 (**B**) y CA3 (**C**) del hipocampo. Tres animales fueron usados por grupo experimental. Se Cuantificaron 6-8 imágenes por sección de cada animal. Los datos son mostrados como promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05; ** <0.01; *** <0.001).

Finalmente, hemos analizado 8-OHG, el más común marcador de lesiones en el ADN producto del incremento en especies reactivas de oxígeno (Nunomura et al. 1999), en el hipocampo de ratones WT y ratones SOD2^{+/-}. Hemos encontrado un incremento del doble en la marca de 8-OHG en la región CA1 en los animales WT de 6 meses y en los animales SOD2^{+/-} de 2 meses de edad en comparación a los animales control de 2 meses de edad. Además, los animales SOD2^{+/-} de 6 meses de edad muestran un incremento aun mayor de 8-OHG en esta área (Figura 10A y 10B). En la región CA3 no hemos encontrado diferencias significativas entre los animales WT de 2 y 6 meses de edad (Figura 10A y 10C). En la región CA3, la marca de 8-OHG incrementa al doble en los animales SOD2^{+/-} de 2 meses en comparación a los animales WT de la misma edad, mientras que en el caso de los animales SOD2^{+/-} de 6 meses, este aumento es aún mayor (Figura 10A y 10C).

Resultados similares han sido reportados para 4-HNE y 8-OHG en un modelo de trauma cerebral (Jung et al. 2009; Murakami et al. 1998), sugiriendo que el estrés oxidativo es una parte importante del mecanismo de daño. En conclusión, la disminución de los niveles de la enzima antioxidante SOD2^{+/-} aumenta significativamente marcadores de estrés oxidativo en el hipocampo de estos ratones.

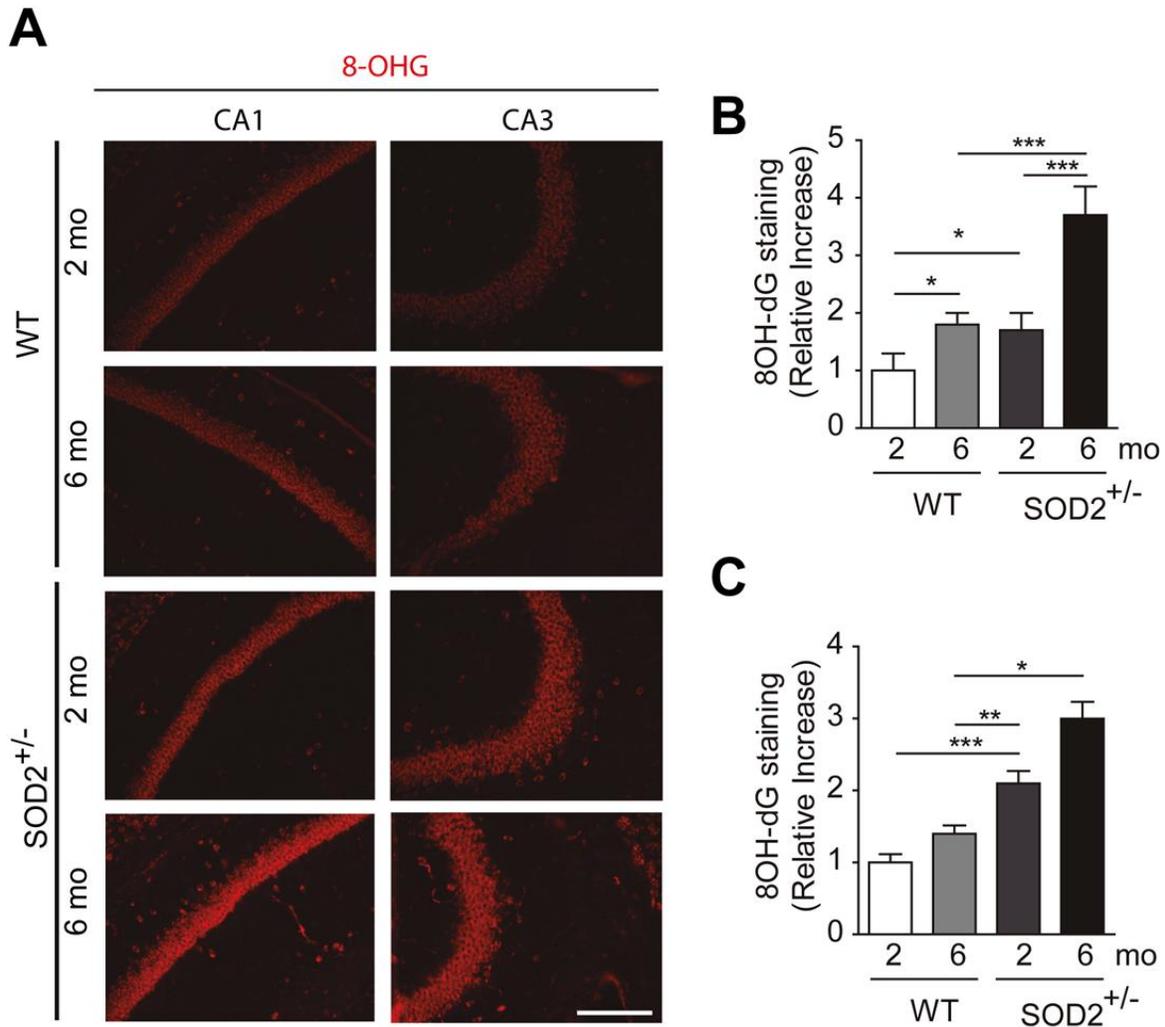


Figura 10. El marcador de estrés oxidativo 8-OHG se encuentra aumentado en los animales SOD2^{+/-} comparado con animales control de la misma edad. A. Imágenes representativas de inmunofluorescencias contra 8-OHG en rebanadas de hipocampo extraídas desde animales WT y animales SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad. Los gráficos muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las regiones CA1 (**B**) y CA3 (**C**) del hipocampo. Tres animales fueron usados por grupo experimental. Se Cuantificaron 6-8 imágenes por sección de cada animal. Los datos son mostrados como promedio \pm error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguid posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (* <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001).

4.1.2.- Ratones SOD2^{+/-} presentan fallas en la memoria espacial, la cual se intensifica con la edad.

El daño oxidativo y el déficit cognitivo son características comunes de varias condiciones neuropatológicas como la enfermedad de Parkinson (Bageetta et al. 2010), la enfermedad de Huntington (Brooks et al. 2012) y la EA (Carvajal et al. 2013; Inestrosa et al. 2011). Por este motivo hemos decidido evaluar el desempeño cognitivo de los ratones SOD2^{+/-}, los cuales han demostrado tener altos niveles de marcadores de daño oxidativo (Figura 8, 9 y 10). La función hipocampal fue evaluada mediante la prueba de memoria espacial del laberinto acuático de Morris, la cual consiste básicamente en que los ratones deben encontrar la ubicación de una plataforma oculta mediante estímulos visuales externos (Chen et al. 2000; Morris 1984). En este caso no se observaron diferencias entre los animales WT de 2 y 6 meses en los distintos días de prueba (Figura 11A). Por el contrario, los animales SOD2^{+/-} de 6 meses de edad presentan un incremento significativo en la latencia de escape en varios días de prueba al ser comparados con los animales controles de 2 meses (Figura 11Ab). Esta falla en el desempeño cognitivo, puede ser observado más claramente en el día 8 de prueba en donde se muestran recorridos representativos realizados por los ratones en la búsqueda de la plataforma. Se puede observar que los animales SOD2^{+/-} de 6 meses de edad nadan en círculos alrededor de la piscina mientras que los animales WT y los animales SOD2^{+/-} de 2 meses de edad lo hacen en zonas cercanas a la plataforma. Esta observación es confirmada comparando la latencia de escape de todos los grupos experimentales en este mismo día (Figura 11Ac). La figura 11B muestra la relación entre la agudeza espacial y el promedio de la latencia de escape de los animales de los distintos grupos experimentales. El gráfico indica que los animales de 6 meses de edad están localizados en una región del gráfico que corresponde a una alta latencia de escape y valores de baja agudeza espacial. En

contraste, los animales SOD2^{+/-} de 2 meses de edad y ambos grupos de animales WT presentan bajas latencias de escape y bajos valores de agudeza espacial (Figura 11B).

Al finalizar el test, durante el día 11 de prueba, la plataforma fue removida para realizar una prueba evaluando el tiempo en que los animales nadan en zonas cercanas a la ubicación donde se encontraba la plataforma (un radio circular el doble del que tiene la plataforma). Los animales WT de 2 y 6 meses de edad y los animales SOD2^{+/-} de 2 meses de edad recorren durante el mismo tiempo el área donde se encontraba la plataforma el cual es significativamente superior al que recorre el animal SOD2^{+/-} de 6 meses de edad (Figura 11 Ca y Cb), demostrando la incapacidad de los ratones de 6 meses de recordar la ubicación donde se encontraba la plataforma. Adicionalmente, hemos evaluado el desempeño cognitivo de estos animales usando una prueba modificada del laberinto de agua ya utilizado, evaluar memoria espacial asociada con memoria episódica (flexibilidad de memoria, (Chen et al. 2000)), la cual es más sensible en detectar disfunción hipocampal. El análisis del desempeño conductual indica que los animales SOD2^{+/-} de 6 meses de edad requieren de más intentos para alcanzar el criterio de aprendizaje que los animales SOD2^{+/-} de 2 meses y que los animales WT de ambas edades (ver métodos; Figura 11D). En resumen, estos resultados indican que la capacidad antioxidante reducida provocada por la baja expresión de SOD2 no es suficiente para producir daño cognitivo a los dos meses de edad. Sin embargo, en los animales SOD2 de 6 meses de edad (que acumulan importantes niveles de estrés oxidativo) existe un compromiso del desempeño cognitivo dependiente del hipocampo.

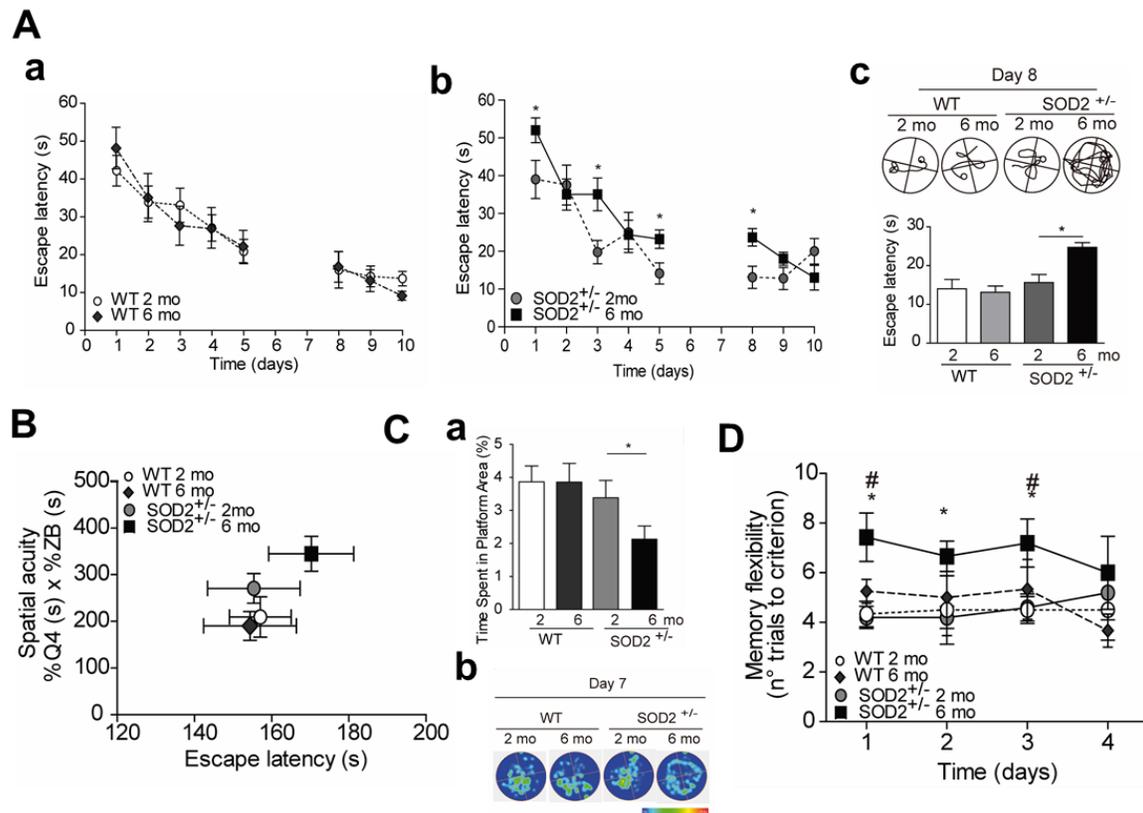


Figura 11.- Los ratones SOD2^{+/-} presentan daños en la memoria espacial dependiente de la edad comparado con animales control. El desempeño conductual fue evaluado usando el método del laberinto acuático de Morris. **Aa.** Latencia de escape para animales WT de 2 y 6 meses de edad. **Ab.** Latencia de escape para ratones SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad. **Ac.** Trayectorias de nado representativas y latencia de escape para ratones WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad durante el día 8. **B.** Análisis de la agudeza espacial para animales WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad después de 2 semanas de entrenamiento. **Ca.** Análisis del tiempo del nado recorrido en el área donde se encontraba la plataforma que fue removida durante el día 11 de entrenamiento. **Cb.** Mapa de calor representativo del recorrido de los animales durante el día 11. **D.** Desempeño cognitivo de ratones WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad en la prueba de flexibilidad de memoria. Seis animales fueron usados por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05; entre WT y SOD2^{+/-} de 6 meses de edad; # <0.05 para animales SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad). Las curvas fueron analizadas por ANOVA de medidas repetidas.

4.1.3. Los ratones SOD2^{+/-} presentan alteraciones en la estructura hipocampal y falla sináptica dependiente de la edad.

La tinción de cuerpos de Nissl es una marca para neuronas maduras y puede ser usada para detectar pérdida neuronal y apoptosis (Zhou et al. 2016). El análisis de los cuerpos de Nissl muestra cambios neuropatológicos en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo de ratones SOD2^{+/-} de 6 meses de edad, dentro de los que se incluyen pérdida neuronal o desaparición de la marca nuclear (Figura 12A). Estas características están ausentes en ratones SOD2^{+/-} de 2 meses y en los animales WT de ambas edades. Además, la densidad de cuerpos de Nissl (medido mediante la densidad óptica integrada) desciende significativamente en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo de los ratones SOD^{+/-} 2 de 6 meses de edad en comparación a los otros grupos experimentales (Figura 12Aa y 12Ab).

Con el fin de evaluar el efecto del descenso de la actividad SOD2 y la acumulación de marcadores de estrés oxidativo sobre la transmisión sináptica a diferentes edades, hemos registrado la actividad sináptica en el circuito hipocampal colaterales de Schaffer-CA1, midiendo corrientes excitatorias postsinápticas evocadas de campo (fEPSP). Las corrientes postsinápticas excitatorias responden principalmente al neurotransmisor glutamato. Para este neurotransmisor existen varios tipos de receptores, entre los más importantes se encuentran los receptores de glutamato tipo NMDA, los cuales son permeables a calcio, sodio y potasio y los de tipo AMPA, los cuales son permeables a sodio y potasio principalmente (Carroll and Zukin 2002; Greger et al. 2017). En este caso, hemos realizado experimentos Intensidad de estimulación versus respuesta (intensidad/respuesta) para evaluar la fuerza sináptica. Hemos analizado las curvas intensidad/respuesta para evaluar la respuesta postsináptica total y curvas intensidad/respuesta para evaluar respuestas dependientes de NMDARs, usando

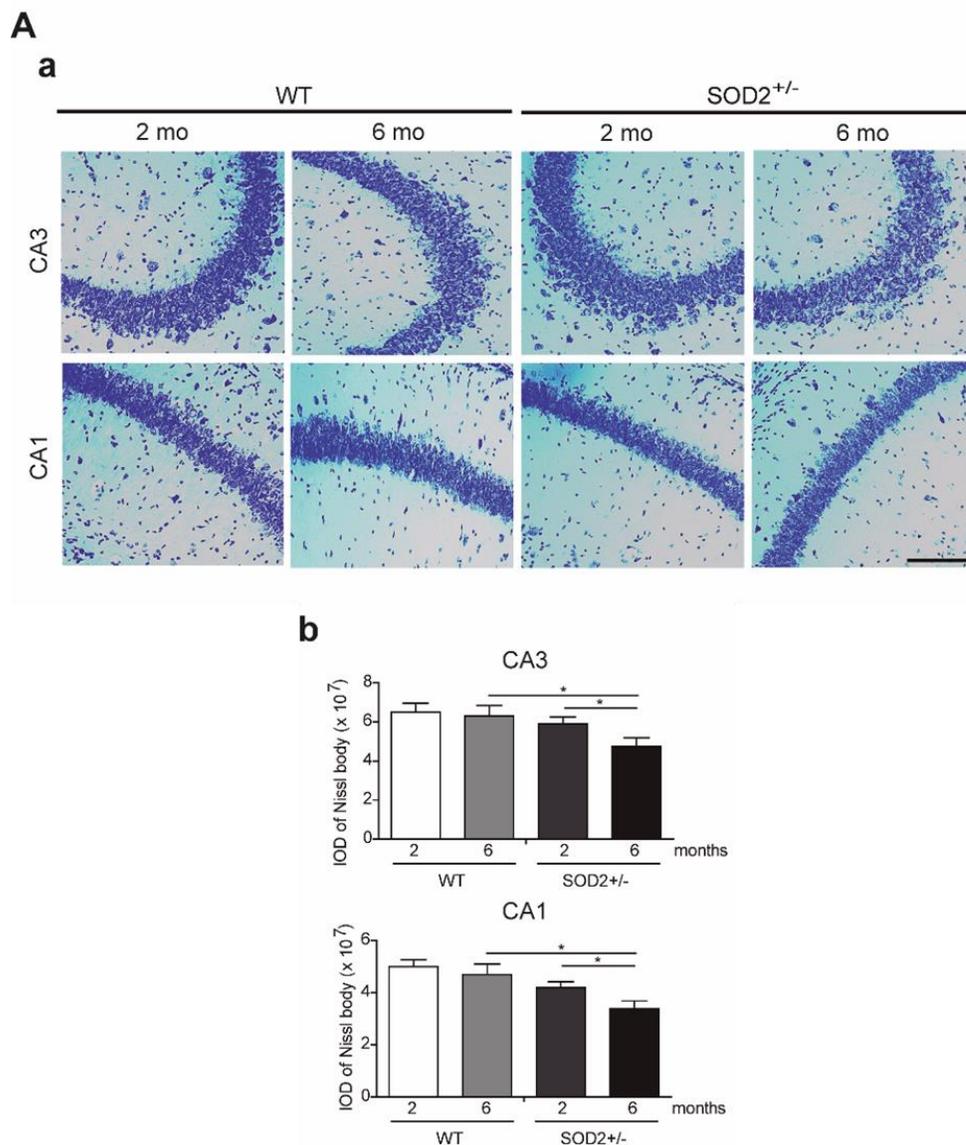


Figura 12.- Los ratones SOD2^{+/-} presentan alteraciones en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo dependiente de la edad comparado con animales control. Aa. Imágenes representativas de la tinción de Nissl mostrando los cuerpos de Nissl en el hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad. Cuantificación de los cuerpos de Nissl en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad (IOD: densidad óptica integrada). Se utilizaron 3 animales para los ensayos histoquímicos por grupo experimental. Se analizaron 8-10 fotos por animal. Las barras representan promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguidas posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05).

NBQX, un inhibidor de AMPARs (Figuras 13Aa y 13Ab respectivamente). No se observaron diferencias significativas en las respuestas totales ni en las respuestas dependientes de NMDARs entre los animales WT de 2 y 6 meses de edad (Figura 13Aa y 13Ab). Sin embargo, hemos encontrado una disminución significativa en la respuesta total a diferentes intensidades de estimulación en ratones $SOD2^{+/-}$ de 2 meses de edad, y una disminución aún mayor en los ratones $SOD2^{+/-}$ de 6 meses (Figura 12Aa). Hemos obtenido una tendencia similar cuando analizamos las respuestas dependientes de los NMDARs, una disminución significativa en los animales $SOD2^{+/-}$ de 2 meses de edad y una disminución aún mayor en los animales de 6 meses de edad (Figura 13Ab).

Varios reportes han demostrado que tanto la actividad y la plasticidad sináptica dependen del tráfico de los receptores de glutamato, tanto los AMPARs como los NMDARs (Groc and Choquet 2006), en nuestro caso hemos encontrado una disminución en la respuesta sináptica correspondiente a los NMDARs (Figura 13Ab). Generalmente, la ubicación en membrana y la funcionalidad de los receptores de glutamato dan cuenta de su actividad, pero para el caso de los NMDARs su ubicación en membrana no define los efectos que su activación podría tener, es posible que los receptores se posicionen de forma sináptica o extra sináptica con funciones diametralmente diferentes (Groc et al. 2009; Hardingham and Bading 2002; 2010; Hardingham et al. 2002). Por este motivo hemos decidido analizar si existen cambios en la distribución de los NMDARs entre regiones sinápticas y extrasinápticas que podrían contribuir a los efectos neuropatológicos observados en los ratones $SOD2^{+/-}$. Numerosos reportes han demostrado que ciertas fosforilaciones en residuos de tirosina en la subunidad GluN2B de los NMDARs está fuertemente asociada con su expresión en la superficie. Por ejemplo, dos fosforilaciones de nuestro interés son la fosforilación en tirosina 1472, que regula la expresión en la superficie sináptica de los NMDARs (Xu et al. 2006) , y

la fosforilación en residuos de tirosina 1336 la cual está asociado con el enriquecimiento de los receptores NMDARs en membranas extrasinápticas (Goebel-Goody et al. 2009). No se han observado diferencias significativas en el estado de fosforilación de los NMDARs en animales WT de 2 y 6 meses de edad (Figura 14 A y 14C). Sin embargo, hemos observado una disminución del 20% en la fosforilación que mantiene a los NMDARs en la zona sináptica (tirosina 1472) en los animales $SOD2^{+/-}$ de 2 y 6 meses de edad en comparación a los animales WT de 2 meses de edad. Además, la fosforilación específica que enriquece los NMDARs en la zona extrasináptica (tirosina 1336) incrementa aproximadamente un 60% en los ratones $SOD2^{+/-}$ de 2 y 6 meses de edad (Figura 14B y 14C).

Consistente con la idea en que un incremento en ciertos marcadores de estrés oxidativo puede comprometer funciones cognitivas y la fuerza sináptica, hemos evaluado la plasticidad sináptica en animales normales y $SOD2^{+/-}$ ha diferentes edades a través de la magnitud de la LTP en la transmisión hipocampal CA3 CA1, la cual se ha correlacionado con memoria y aprendizaje (Whitlock et al. 2006). Hemos usado un protocolo débil de alta frecuencia consistente en 2 trenes de 100 Hz para la inducción de la LTP (Débil en comparación a otro protocolo ocupado en este trabajo, el cual consiste en 4 trenes de 100 Hz). Hemos encontrado que alteraciones de la LTP está comprometida en los ratones $SOD2^{+/-}$ de 6 meses de edad en comparación con animales WT de la misma edad (13 B). Mientras que los animales $SOD2^{+/-}$ de 2 meses de edad presentan la capacidad de inducir LTP, pero solo se mantiene por 15 min (Figura 13 B), indicando que la incapacidad de mantener la potenciación inducida inicialmente.

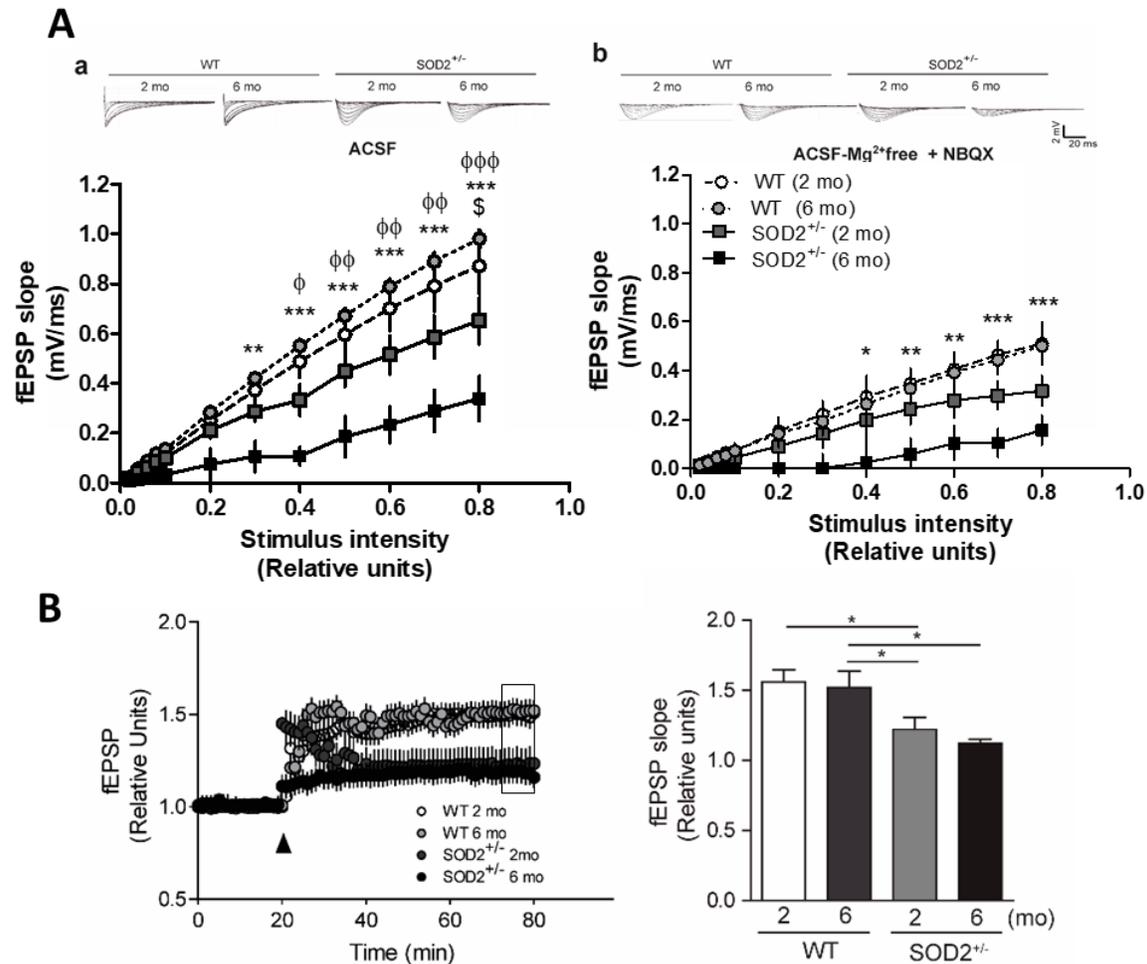


Figura 13.- Los ratones SOD2^{+/-} presentan alteraciones en curvas intensidad/respuesta y en la plasticidad sináptica dependiente de la edad comparado con animales control. Pendiente de la respuesta sináptica (fEPSP) inducida por protocolo intensidad/respuesta para las respuestas totales (**Aa**) o correspondientes a los NMDARs (**Ab**) en el hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad. **C.** LTP fue generado por estimulación de alta frecuencia débil, consistente en 2 trenes de 100 Hz en el circuito hipocampal CA1-CA3 de rebanadas de cerebro de ratones WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad. Cuantificación de la pendiente de las respuestas sináptica durante los minutos 50-60 de registro después del estímulo de alta frecuencia. Se utilizaron 2 a 3 rebanadas por cada animal de 3 animales por grupo experimental. Los puntos y las barras representan promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Las curvas fueron analizadas por ANOVA de medidas repetidas. Los símbolos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05, **<0.01, ***<0.001; entre WT y SOD2^{+/-} de 6 meses de edad, #<0.05 para animales WT de 2 meses de edad y animales SOD2^{+/-} de 2, ϕ *<0.05, $\phi\phi$ <0.01, $\phi\phi\phi$ <0.001; entre WT de 2 meses de edad y animales SOD2^{+/-} de 6 meses de edad).

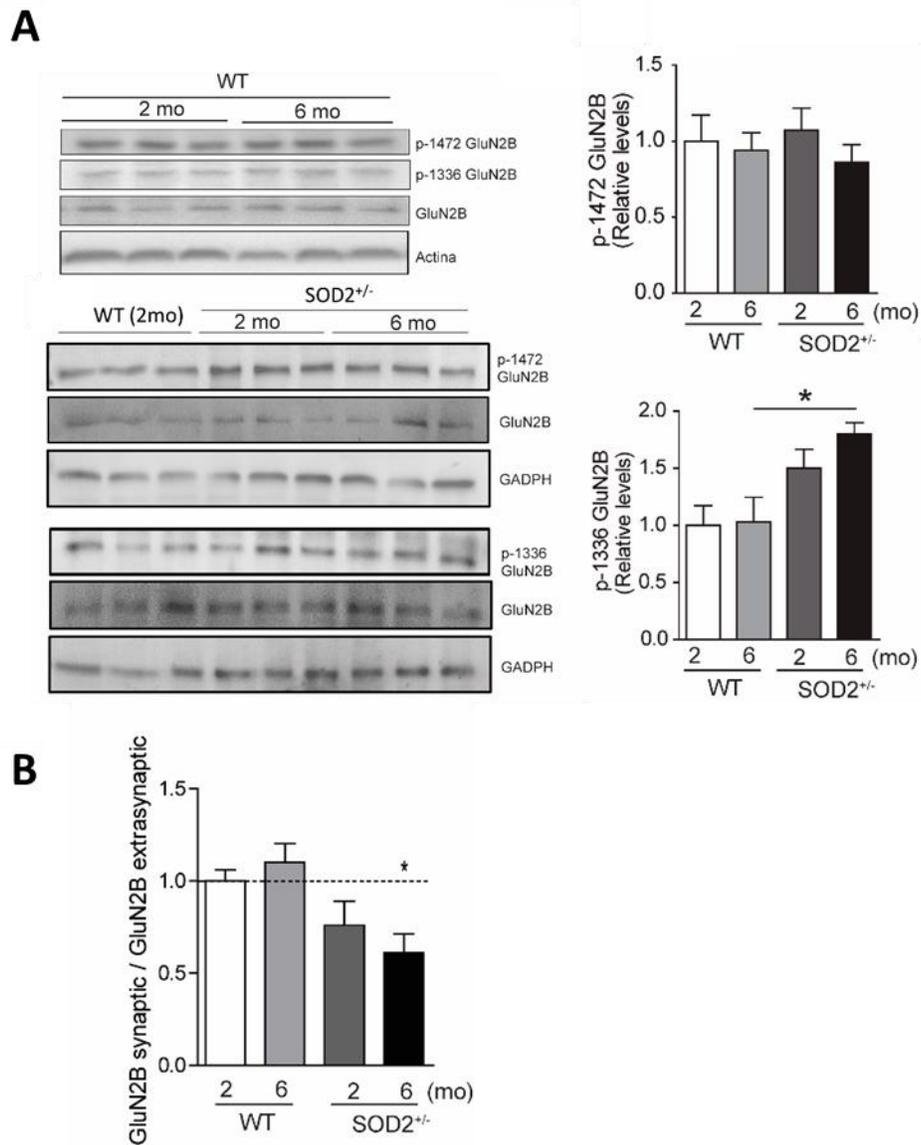


Figura 14.- Los ratones SOD2^{+/-} presentan alteraciones en el estado de fosforilación de los NMDARs dependiente de la edad comparado con animales control. **A.** Análisis por inmunoblot de las fosforilaciones de la subunidad GluN2B de los NMDARs y análisis densitométricos de la fosfo-tirosina 1472 y de la fosfo-tirosina 1336 en lisados de hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad. **B.** Radio normalizado de fosfo-tirosina 1472 (sináptico) y fosfo-tirosina 1336 (extrasináptico) de la subunidad GluN2B. Se utilizaron 6 animales para los ensayos de inmunoblot. Las barras representan promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05).

Estos resultados sugieren que la acumulación de daño oxidativo puede inducir cambios fisiopatológicos en el hipocampo afectando la estructura y función hipocampal, esto podría deberse, en parte, al incremento en la población de NMDARs extrasinápticos.

4.1.4.- La señalización asociada a los NMDARs esta alterada en los ratones SOD2^{+/-}.

Debido a que observamos un incremento en la población de NMDARs extrasinápticos, detectado por la fosforilación en tirosina 1336, y una reducción de la forma sináptica de los NMDARs, detectada por la fosforilación en tirosina 1472 en los animales SOD2^{+/-}, hemos analizado 3 blancos relacionados en la señalización de los NMDARs. Estos blancos son CREB, STEP₆₁ y PTEN. Previos reportes indican que la actividad sináptica gatillada por la activación de los NMDARs induce la transcripción génica mediada por CREB. CREB transloca al núcleo a través de la fosforilación en el residuo de serina 133 y es utilizado como un marcador de actividad transcripcional. Además se ha reportado que esta marca de actividad transcripcional, la fosforilación en serina 133, disminuye con la activación de los NMDARs extrasinápticos (Hardingham et al. 2001; Hardingham and Bading 2002; Hardingham et al. 2002). El análisis de p-CREB (S133) en el hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-} fue realizado mediante inmunofluorescencia (Figura 15A). Hemos observado que los animales SOD2^{+/-} de 7 meses de edad presentan un descenso significativo de p-CREB en la región CA3 del hipocampo (Figura 15Aa y 15Ac), pero no en la zona CA1 (Figura 15Ab). Por otro lado, hemos analizado 2 fosfatasa implicadas directa e indirectamente en el estado de fosforilación de los NMDARs, STEP₆₁ y PTEN. STEP₆₁ regula el estado de fosforilación y la densidad de los NMDARs superficial a través de 2 vías paralelas, la directa desfosforilación de la tirosina 1472, o indirectamente a través de la desfosforilación e inactivación de la quinasa Fyn (Nguyen et al. 2002; Pelkey et al. 2002).

Además, la estimulación de los NMDARs extrasinápticos está asociada con la activación de calpaínas y el corte proteolítico de STEP, provocando la acumulación de un subproducto de degradación de 33KDa (STEP₃₃) (Gladding et al. 2012; Xu et al. 2009), el cual puede ser utilizado como marcador de actividad de NMDARs extrasinápticos. El fallo en la regulación de esta fosfatasa está implicado en varias neuropatologías como es el caso de la EA, Huntington, esquizofrenia y en el envejecimiento (Carty et al. 2012; Castonguay et al. 2018; Gladding et al. 2012; Goebel-Goody et al. 2012a; Kurup et al. 2010). Hemos medido los niveles de STEP total mediante inmunofluorescencia (Figura 15B) y mediante análisis por inmunoblot (Figura 16). Hemos observado que los niveles de STEP están incrementados en la región CA1 de los animales SOD2^{+/-}, los cuales presentan sobre un 70 % de incremento con respecto a los animales WT (Figura 16Ba y 16Bb). En la región CA3, hemos observado un incremento significativo en los niveles de STEP en los ratones SOD2^{+/-} de 7 meses de edad en comparación con los animales WT y de los animales SOD2^{+/-} de 2 meses de edad (Figura 15Ba y 15Bc). Un incremento similar en los niveles de STEP han sido reportados para modelos de ratones transgénicos de la EA y de Huntington (Gladding et al. 2012; Xu et al. 2014). El análisis por inmunoblot permite diferenciar dos isoformas de STEP presentes en el hipocampo, STEP₆₁ y STEP₃₃ (Figura 16). STEP₆₁ es la forma activa de esta fosfatasa, mientras que STEP₃₃ es el producto de degradación asociado a la activación de calpaínas por la estimulación de los NMDARs extrasinápticos (Gladding et al. 2012; Goebel-Goody et al. 2012a; Hermel et al. 2004). No se observaron diferencias significativas de los niveles de STEP₆₁ ni de STEP₃₃ en los animales WT de 2 y 6 meses de edad (Figura 16A y 16C). En estos casos la banda de STEP₃₃ es casi indetectable. En los ratones SOD2^{+/-} de 2 meses de edad los

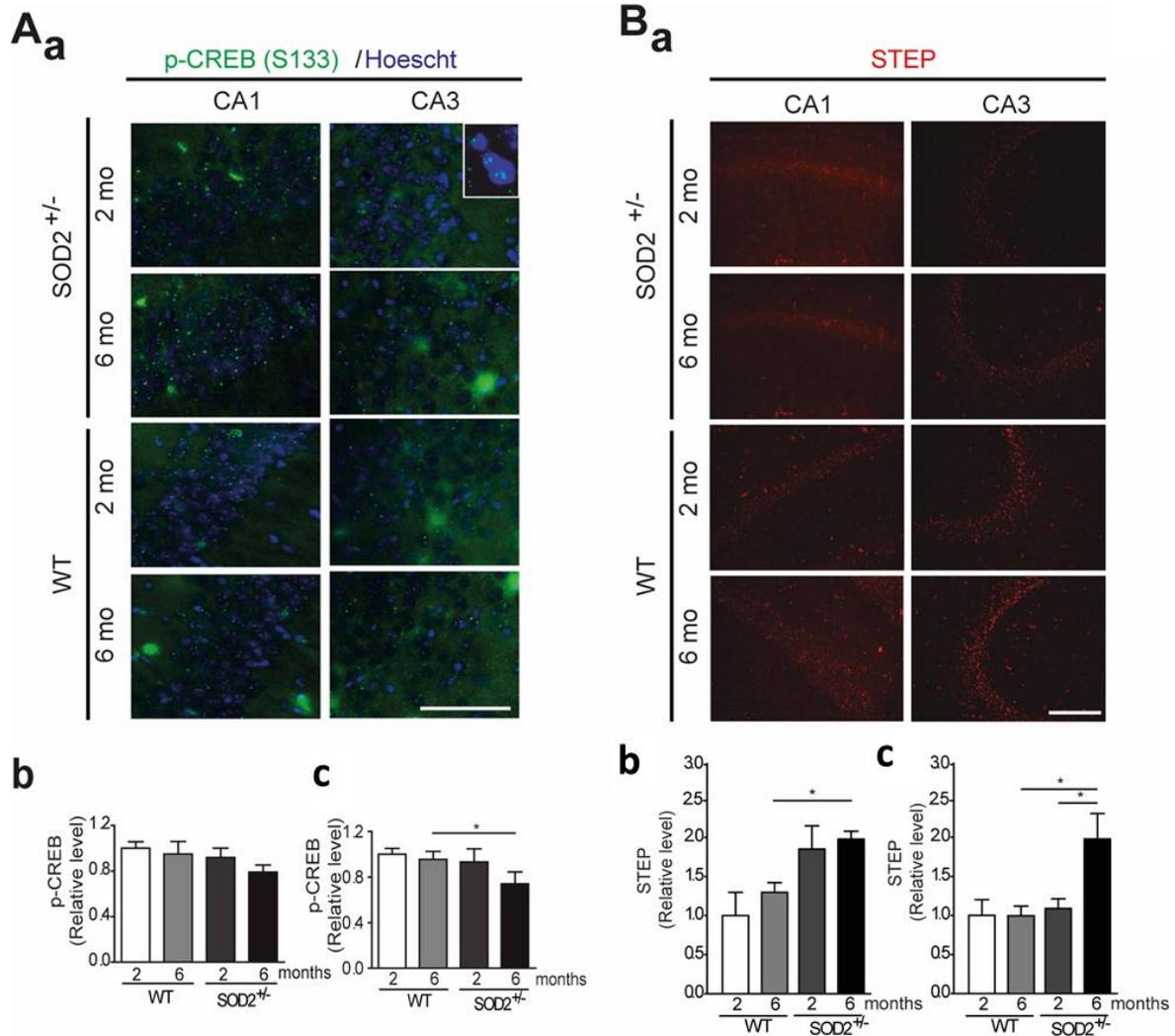


Figura 15.- p-CREB y STEP, dos señalizaciones río debajo de los NMDARs se encuentran alterados en ratones SOD2^{+/-} comparado con animales control. Aa. Imagen representativa de inmunofluorescencia contra p-CREB (S133) en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad. Los gráficos muestran los niveles relativos de p-CREB en las regiones CA1 (**Ab**) y CA3 (**Ac**) del hipocampo. El inserto muestra la tinción de p-CREB dentro del núcleo. **Ba.** Imagen representativa de la inmunofluorescencia contra STEP en las regiones CA1 y CA3 de ratones WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad. **Bb.** Los gráficos muestran la intensidad de fluorescencia de STEP en las regiones CA1 (**Bb**) y CA3 (**Bc**). Tres animales fueron usados por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05).

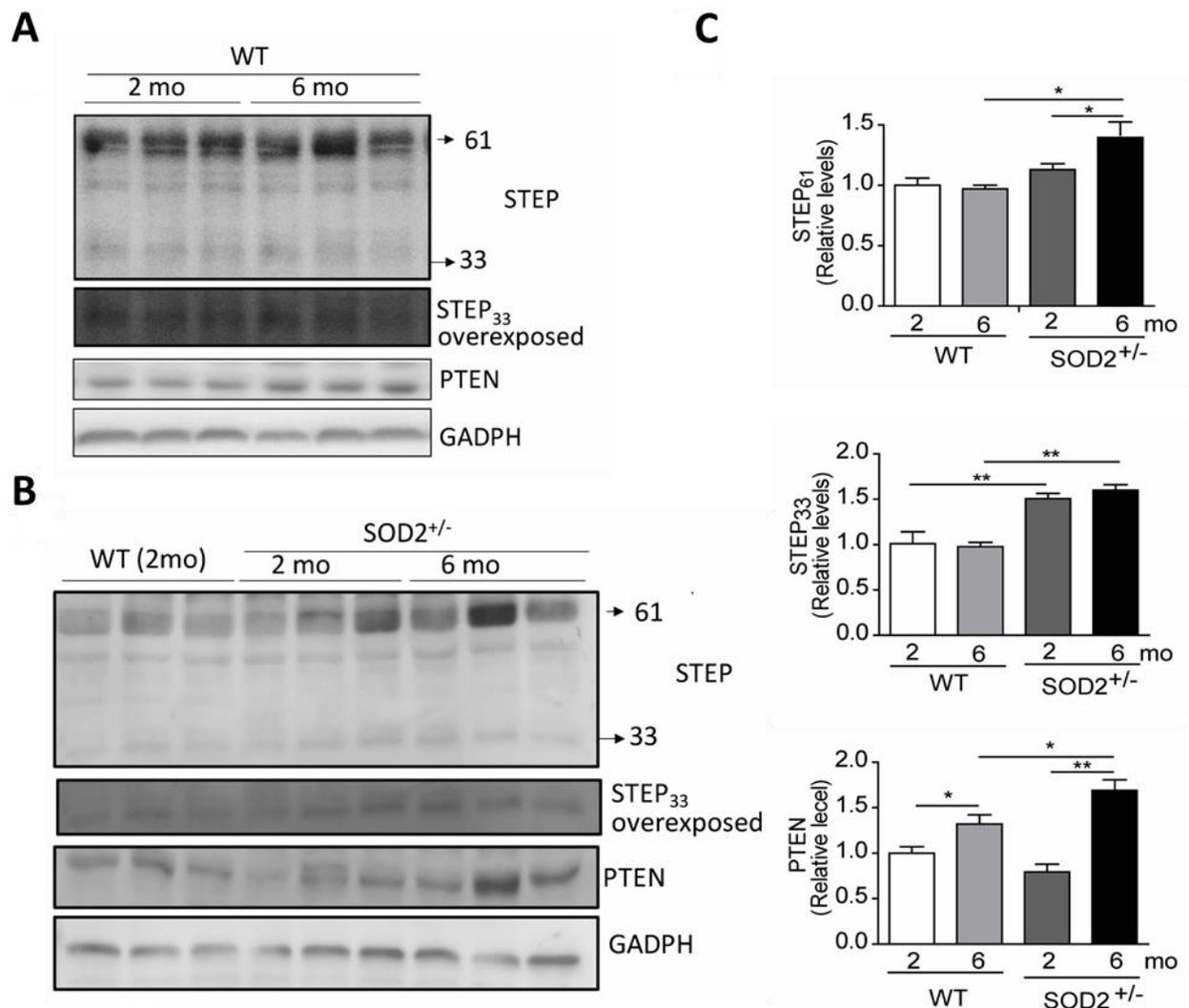


Figura 16.- PTEN y STEP, fosfatasa asociada a la señalización de los NMDARs se encuentra alterada en los ratones SOD2^{+/-} comparado con animales control. Inmunoblot contra STEP y PTEN desde lisados hipocámpales extraídos desde ratones WT y SOD2^{+/-} de 2 y 6 meses de edad (**A** y **B**, respectivamente). **C.** Análisis densitométrico de STEP₆₁, STEP₃₃ y PTEN. Tres animales fueron usados por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05; ** <0.01).

niveles de STEP₆₁ y de STEP₃₃ son similares al de los animales WT. Por otro lado, hemos detectado un incremento significativo en los niveles de STEP₆₁ y un severo incremento de STEP₃₃ en los animales SOD2^{+/-} de 6 meses de edad (Figura 16B y 16C). Otra fosfatasa evaluada fue PTEN mediante análisis de inmunoblot (Figura 14). Esta fosfatasa también se ha visto implicada en desordenes neuropatológicos como la AD y el daño por isquemia a través de un mecanismo similar sobre el estado de fosforilación de los NMDARs (Chang et al. 2007; Knafo et al. 2016). Se observaron diferencias significativas entre los animales WT de 2 y 6 meses de edad, debido al avance en la edad (Figura 16A y 16C). Adicionalmente hemos encontrado un incremento del 50% en los ratones SOD2^{+/-} de 6 meses de edad comparado con los animales WT de la misma edad (Figura 16B y 16C). Estos resultados indican que la acumulación de daño oxidativo en el hipocampo altera las vías de señalización inducidas por la activación de los NMDARs, en este caso una disminución de la actividad transcripcional de CREB (evaluada por el marcaje de p-CREB S133) la cual es inhibida por la estimulación de los NMDARs extrasinápticos. Además, hemos encontrado un desbalance de dos fosfatasas implicados en el estado de fosforilación de los NMDARs, los cuales también se han visto alterados en varias otras neuropatologías. Como la EA, Huntington, Parkinson, isquemia, etc (Carty et al. 2012; Chang et al. 2007; Gladding et al. 2012; Knafo et al. 2016; Xu et al. 2014; Zhang et al. 2013).

4.2.- Modelo de trauma cerebral moderado en ratones.

La evaluación de la generación de daño oxidativo de forma aguda fue realizada mediante un modelo de trauma cerebral, generado por impacto frontal. El daño generado por el impacto es ocasionado por la aceleración rotacional antero-posterior del cerebro dentro del cráneo intacto. Este modelo fue descrito por Kilbourne y cols. (2009; (Kilbourne et al. 2009))

con las modificaciones necesarias para utilizarlo en modelo de ratón. Al igual que en el caso de la generación de daño crónico, aquí se evaluará el desempeño cognitivo, parámetros electrofisiológicos y el estado de los NMDARs y su señalización asociada.

4.2.1.- Evaluación de parámetros neuroanatómicos tras la inducción de trauma cerebral.

El primer paso en la utilización del modelo de inducción de TC descrito anteriormente fue la evaluación de parámetro psicomotores y neuroanatómicos como control del modelo utilizado. En cuanto a los parámetros psicomotores, se realizaron a distintos días posteriores a la aplicación del trauma. Estos parámetros consisten en una serie de pruebas, que se describen en la tabla 2. Se evalúa, la presencia de mono o hemiparesia, con el fin de confirmar que se trata de un trauma leve, la capacidad de búsqueda y de sobresalto y algunos parámetros de reflejo y habilidad como es el movimiento en vigas de madera de distinto diámetro y distinta forma con la finalidad de descartar daños motores que puedan interferir en las pruebas conductuales a realizar posteriormente, este tipo de test se encuentra ampliamente estandarizado desde los trabajos de Chen y cols. (Chen et al. 1996) . En el gráfico de la figura 17A, se puede observar que el trauma cerebral inducido, genera los mismos puntajes que el grupo control, puntajes muy por debajo al establecido para la aparición de daño neurológico, lo que descarta daños severos de nuestro modelo. En cuanto a los parámetros neuroanatómicos, se pudo observar al momento de sacrificio, ocurrido una semana después de la última sesión de inducción de trauma, la presencia de edema cerebral vasogénico (Figura 17B). En otras palabras, inflamación de los vasos sanguíneos de las meninges y microhemorragias. A nivel histológico, se realizaron cortes sagitales y marcados con cresil

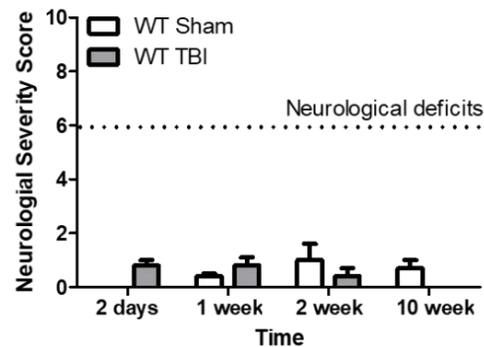
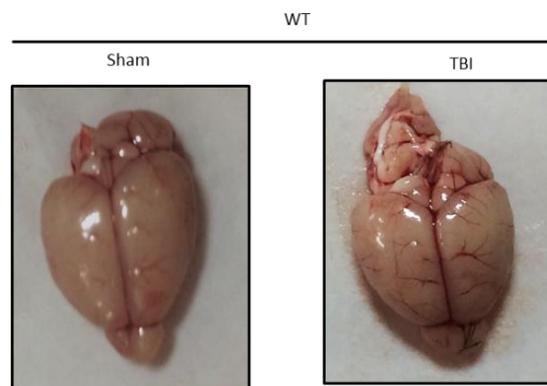
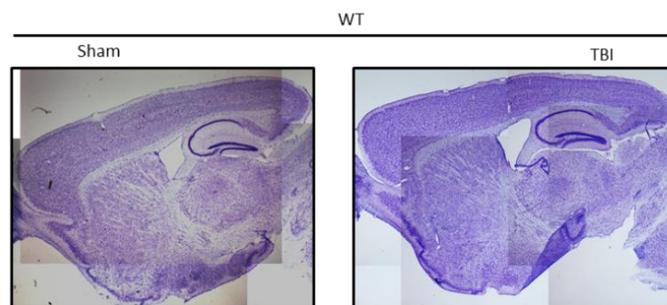
A**B****C**

Figura 17.- Evaluación psicomotriz y estructural del cerebro de los ratones sometidos al modelo de trauma cerebral moderado. A. Gráfico del puntaje obtenido en la escala de severidad de daño psicomotriz evaluado bajo diferentes parámetros (ver tabla 2) y a distintos tiempos. **B.** Fotografía del cerebro completo al momento de la extracción 1 semana después de la última sesión de inducción de trauma cerebral, en donde se puede observar la presencia de edema cerebral. **C.** Reconstrucción del cerebro de ratones sometidos a trauma cerebral, realizada transversalmente y utilizando como medio de tinción el cresil violeta. En este caso se puede observar que el modelo de trauma no genera cambios morfológicos aparentes ni ruptura de tejido. Doce animales fueron usados por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni.

violeta a través de la tinción de Nissl (Figura 17C), donde se pueden evaluar la ausencia de cambios morfológicos a nivel estructural en los cerebros de los animales sometidos a trauma.

Tabla 2. Análisis de severidad del daño a través de la actividad psicomotriz.

Prueba	Puntaje
Presencia de mono/hemiparesia	1
Incapacidad de caminar sobre viga plana de 3 cm de ancho	1
Incapacidad de caminar sobre viga plana de 2 cm de ancho	1
Incapacidad de caminar sobre viga plana de 1 cm de ancho	1
Incapacidad de caminar sobre viga circular de 1 cm de diametro	1
Incapacidad de balancearse en una viga circular de 0,5 cm de diametro	1
Fracaso en la salida de un circulo de 30 cm de diametro en 2 min	1
Incapacidad de caminar derecho	1
Perdida del comportamiento de sobresalto	1
Perdida del comportamiento de busqueda	1
Maximo Total	10

Dentro de los daños secundarios producidos por el trauma cerebral se encuentran la neuroinflamación y el aumento de marcadores de estrés oxidativo (Davis 2000b). Para evaluar la presencia de neuroinflamación, evaluamos 2 marcadores clásicos para este fin. La proteína fibrilar ácida (GFAP), presentes en astrocitos y la proteína de la microglía Iba-1 (Figura 18A). Estos marcadores se analizaron a 2 días y a una semana después de la última sesión de inducción de trauma (Figura 18). La marca de GFAP a nivel de hipocampo y el tamaño promedio de sus somas crece a los 2 días y aumenta aún más a una semana post-sesión de golpes (Figura 18Ba y 18Bc, respectivamente). En el caso de Iba-1, la intensidad de la marca total de la zona analizada y el tamaño promedio de aumentan fuertemente a los dos días, pero decaen un poco a la semana después de la inducción de trauma (Figura 18Bd y 18Be, respectivamente). Otra lesión secundaria analizada es la acumulación de marcadores

de estrés oxidativo. En este caso se analizó 4-HNE (19A y 19Ba), un producto de peroxidación lipídica, y 8OH-dG (19A y 19Bb), producto de oxidación de bases nitrogenadas. En ambos casos se produjo un aumento a los dos días tras la última sesión de inducción de trauma, el cual se mantiene a la semana después.

El modelo de trauma cerebral leve/moderado implementado logro generar lesiones secundarias importantes como la neuroinflamación y el estrés oxidativo presentes en el hipocampo, sin alterar la estructura del cráneo ni del cerebro y sin provocar daños psicomotrices en el animal, estos controles en el modelo de trauma implementado nos permiten realizar una buena comparación a los efectos producidos en trauma leve/moderado ocurrido en humanos, el cual es un tema de salud pública a nivel mundial de gran preocupación, ya que las personas que los este tipo de lesiones presentan significativas discapacidades a nivel cognitivo y de conducta a largo plazo (Jordan 2014; Langlois et al. 2006; Mollayeva et al. 2018; Rutland-Brown et al. 2006), lo que permitiría a través de un modelo animal buscar potenciales biomarcadores y posibles tratamientos para esta condición.

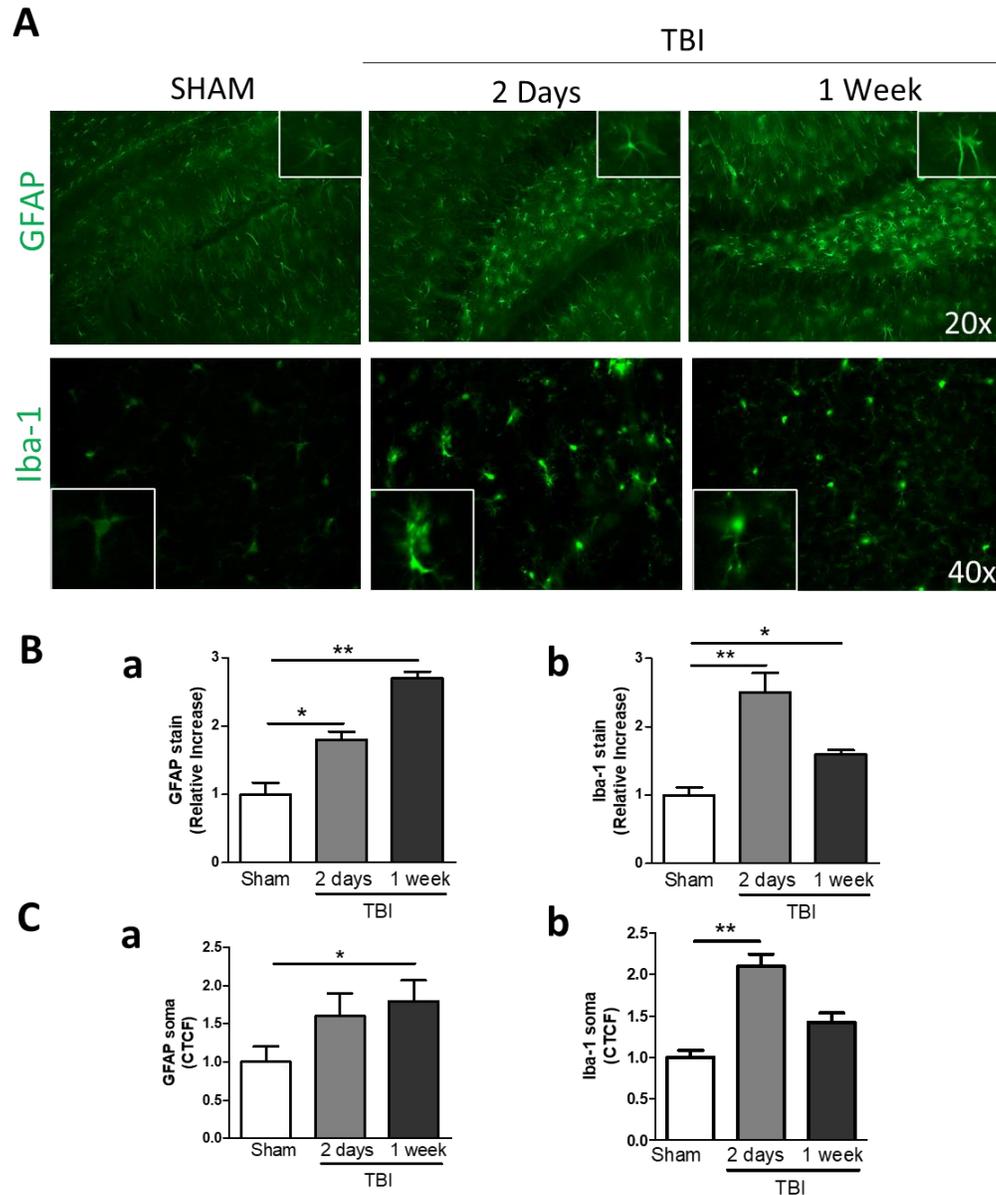


Figura 18.- El modelo de trauma cerebral moderado y repetitivo produce neuroinflamación en el hipocampo. A. Fotos de inmunofluorescencia representativas contra dos marcadores de neuroinflamación, GFAP e Iba-1, marcadores de astrocitos y de microglía, respectivamente evaluados a 2 días y a 1 semana tras la última sesión de inducción de trauma. **B.** Cuantificación de los niveles relativos de la marca total de GFAP (**Ba**) e Iba-1 (**Bb**) a distintos tiempos. **C.** Cuantificación de los niveles relativos de la marca correspondiente al soma de GFAP (**Ca**) e Iba-1 (**Cb**) a distintos tiempos. Tres animales fueron usados por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio \pm error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguid posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (* <0.05 ; ** <0.01).

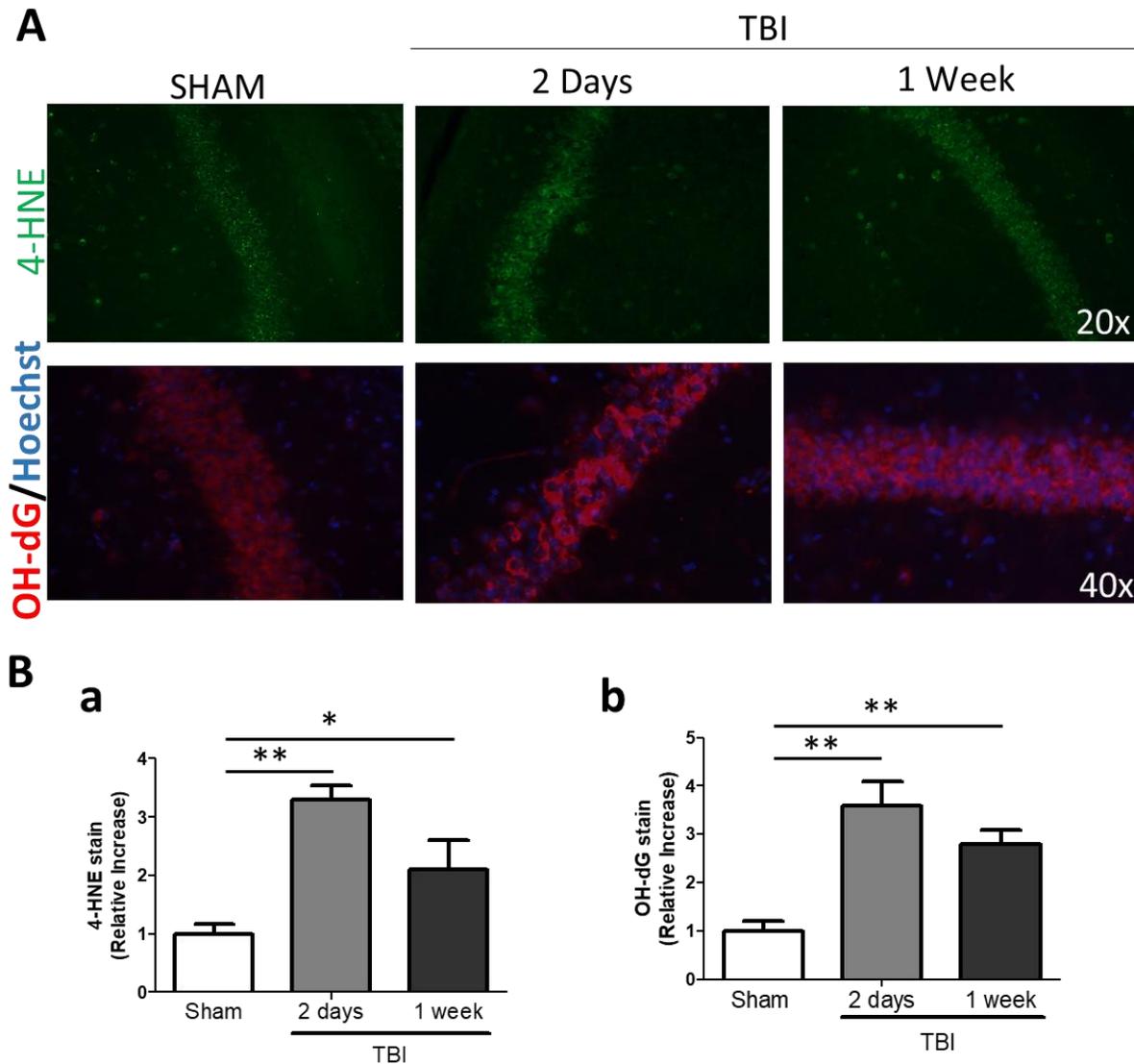


Figura 19. -El modelo de trauma cerebral moderado y repetitivo produce acumulación de marcadores de estrés oxidativo en el hipocampo de ratones WT. A.- Fotos de inmunofluorescencia representativas contra dos marcadores de estrés oxidativo, 4-HNE y Oh-dG, marcadores de peroxidación lipídica y de oxidación de ácidos nucleicos, respectivamente evaluados a 2 días ya 1 semana tras la última sesión de inducción de trauma. **B.** Cuantificación de los niveles relativos de la marca total de 4-HNE (**Ba**) y OH-dG (**Bb**) a distintos tiempos. Tres animales fueron usados por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio \pm error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (* <0.05 ; ** <0.01).

4.2.2.- Evaluación conductual de ratones WT y SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral.

El déficit cognitivo es la consecuencia final que ocurre tras el trauma cerebral (Davis 2000a). Nos propusimos intervenir en la susceptibilidad al daño secundario en los animales sometidos al protocolo de trauma, en este caso decidimos disminuir la capacidad antioxidante en nuestro modelo de trauma utilizando animales transgénico SOD2^{+/-} en animales de 2 meses de edad, que como se observó en la figura 11 no presenta alteraciones en el desempeño cognitivo bajo condiciones control a esta edad pero si ocurren en edades posteriores, en este caso a los 6 meses de edad (Carvajal et al. 2018). Evaluamos el desempeño cognitivo de los ratones WT y SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral (Figura 20), usando una prueba modificada que permite evaluar memoria espacial asociado con memoria episódica (flexibilidad de memoria, (Chen et al. 2000)), el cual es más sensible en detectar disfunción hipocampal (Figura 20A), la misma prueba utilizada en la figura 11. El análisis del desempeño conductual indica que los animales WT sometidos a trauma requieren de más intentos para alcanzar el criterio de aprendizaje que los animales WT control en un par de días de prueba (el criterio corresponde a que los animales deben encontrar la plataforma con un tiempo menor a 20s, tres veces consecutivas. Ver sección 3.3.2 en métodos) (Figura 20Aa y 20Ac). Por otro lado, el análisis del desempeño conductual indica que los animales SOD2^{+/-} sometidos a trauma también requieren de un mayor número de intentos para alcanzar el criterio de aprendizaje (Figura 20Ab y 20Ac). Otro análisis conductual utilizado fue el del reconocimiento de objeto nuevo (NOR) (Figura 20B). Este análisis toma ventaja de la tendencia innata de los ratones por explorar más tiempo un objeto novedoso que uno familiar y siguiendo protocolos descritos anteriormente con la configuración de los objetos en ambas fases que se describe en la figura 20Ba (Broadbent et al. 2010; Ennaceur 2010; Inestrosa et al. 2013). Esta prueba indicó que los animales WT sometidos a trauma cerebral no presentaron diferencias significativas en

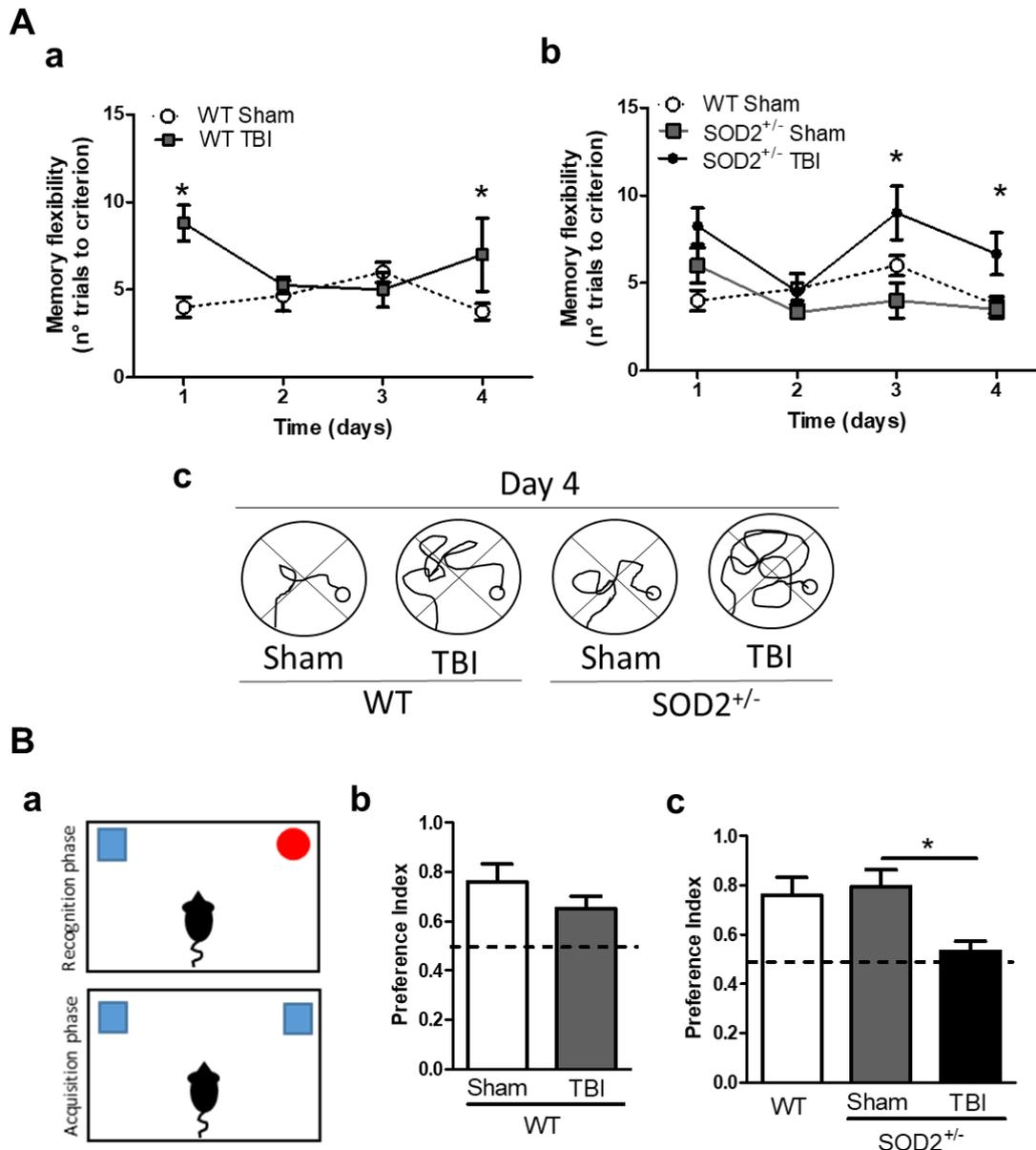


Figura 20.- El trauma cerebral moderado genera alteraciones en el desempeño cognitivo de ratones WT y ratones SOD2^{+/-}. **A.** Desempeño cognitivo de ratones WT (**Aa**) y SOD2^{+/-} (**Ab**) sometidos a trauma cerebral en la prueba de flexibilidad de memoria. (**Ac**) Imágenes representativa del nado recorrido para encontrar la plataforma en el día 4. Seis animales fueron usados por grupo experimental. **B.** Análisis conductual bajo el paradigma del reconocimiento de objeto nuevo. **Ba.** Esquema ilustrativo que muestra la disposición de los objetos durante la fase de adquisición y durante la fase de reconocimiento. Grafico del índice de preferencia por el objeto nuevo en animales WT (**Bb**) y en animales SOD2^{+/-} (**Bc**) sometidos a trauma cerebral. Los datos son mostrados como promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguid posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05). Las curvas fueron analizadas por ANOVA de medidas repetidas.

comparación al grupo control (Figura 20Bb). En el caso de los animales SOD2^{+/-}, los animales sin golpear no presentan alteraciones en el índice de preferencia por el objeto nuevo. Por el contrario, los animales SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral no presentan una diferencia significativa entre el índice de preferencia por el objeto nuevo indicando falla cognitiva en este grupo experimental (Figura 20Bc). En resumen, estos resultados indican que la baja capacidad antioxidante provocado por la baja expresión de SOD2 no es suficiente para producir daño cognitivo a los dos meses de edad. Sin embargo, la acumulación de marcadores de estrés oxidativo en los animales SOD2 por trauma cerebral podría comprometer el desempeño cognitivo dependiente del hipocampo.

4.2.3 Evaluación de la plasticidad y de la respuesta sináptica de ratones WT y SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral.

Con el fin de evaluar el efecto de la acumulación de marcadores de estrés oxidativo sobre la transmisión sináptica tras el trauma cerebral, hemos registrado la actividad sináptica en el circuito hipocampal colaterales de Schaffer-CA1, midiendo potenciales postsinápticos excitatorios evocados de campo (fEPSP). Hemos realizado experimentos de curvas intensidad/respuesta para evaluar la fuerza sináptica (Figura 21A). Hemos encontrado una disminución significativa en la respuesta total a diferentes intensidades de estimulación en ratones WT sometidos a trauma cerebral en comparación a los animales WT control (Figura 20A). En cuanto a los SOD2^{+/-} de 2 meses de edad utilizados como control de los animales transgénicos, hemos observado un decaimiento en la respuesta total en comparación a los animales WT control, tal como fue observado en la figura 13 (Carvajal et al. 2018), y una disminución aún más fuerte en los ratones SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral (Figura 21A).

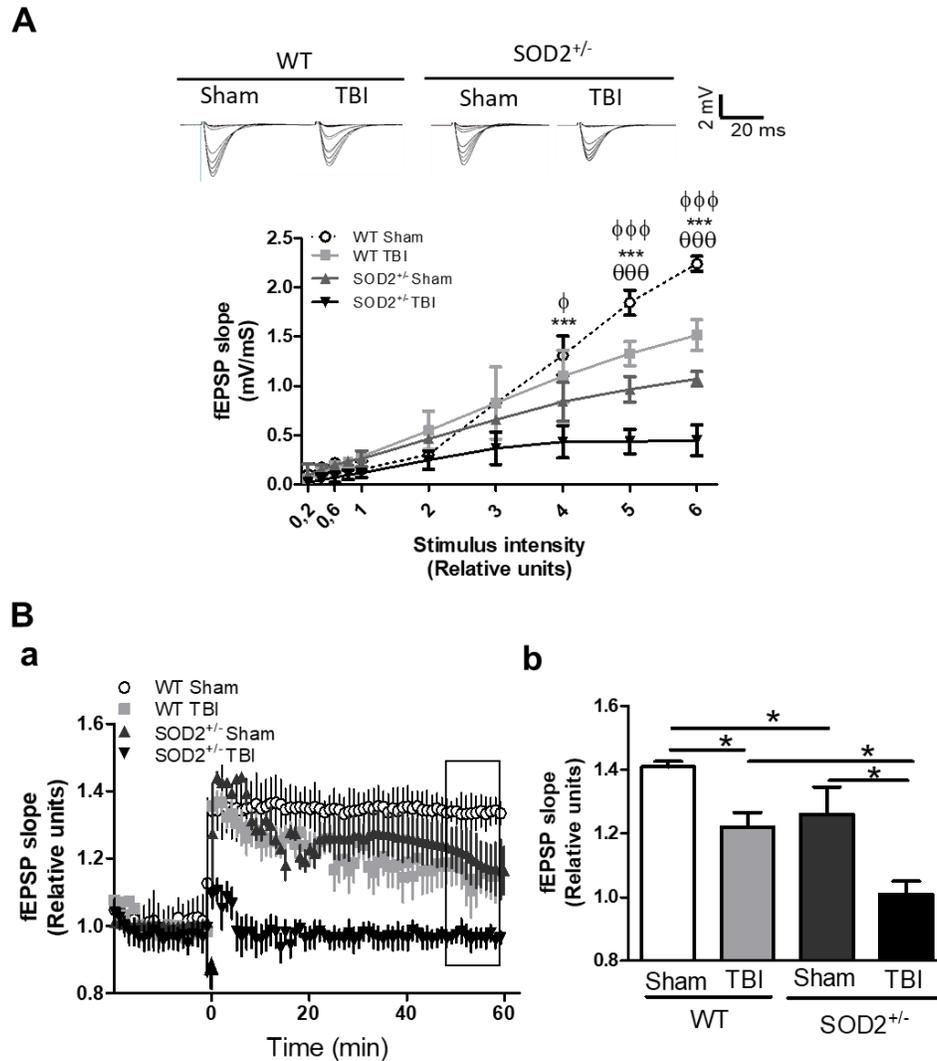


Figura 21.- El trauma cerebral induce alteraciones en la curvas intensidad/respuesta y en plasticidad sináptica en el hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-}. **A.** Pendiente de la respuesta sináptica (fEPSP) inducida por protocolo intensidad/respuesta para las respuestas totales en el hipocampo de de ratones WT y SOD2^{+/-}. **Ba.** LTP fue generado por estimulación de alta frecuencia (4 trenes de 100 Hz) en el circuito hipocampal CA1-CA3 de rebanadas de cerebro de ratones WT y SOD2^{+/-} en condiciones control y sometidos a trauma cerebral. Cuantificación de la pendiente de las respuestas sináptica durante los minutos 50-60 de registro después del HFS en condiciones control y sometidos a trauma cerebral en cerebro de ratones WT y SOD2^{+/-} (**Bb**). Se utilizaron 2 a 3 rebanadas por cada animal de 3 animales por grupo experimental. Los puntos y las barras representan promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Las curvas fueron analizadas por ANOVA de medidas repetidas. Los símbolos indican la significancia de la diferencia estadística observada ($\theta < 0.001$ entre WT Sham y WT TBI; $*** < 0.001$; entre WT TBI y SOD2^{+/-} TBI; $\phi < 0.05$, $\phi\phi\phi < 0.001$; entre SOD2^{+/-} Sham y SOD2^{+/-} TBI).

Consistente con la idea de que un incremento en el déficit cognitivo y en ciertos marcadores de estrés oxidativo puede comprometer la fuerza sináptica, hemos evaluado la plasticidad sináptica en animales WT y SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral (Figura 21 Ba y Bb, respectivamente). Hemos encontrado que la inducción de la LTP está comprometida en los ratones WT sometidos a trauma cerebral en comparación con animales control de la misma edad (Figura 21 Ba y 21Bb). Por otro lado, los animales SOD2^{+/-} de 2 meses de edad presentan una expresión del LTP deficiente en comparación a un animal WT de la misma edad, mientras que los animales SOD2^{+/-} sometidos a la inducción de trauma son incapaces de generar potenciación (Figura 21 Ba y 21Bb). Estos datos sugieren fuertemente que el trauma cerebral altera la fuerza y la plasticidad sináptica y estos efectos son más severos sin la barrera antioxidante de la enzima SOD2.

Adicionalmente, analizamos en más detalle la contribución de los NMDARs dentro de la respuesta sináptica tras la inducción de trauma cerebral en ratones WT y SOD2^{+/-} a través de ensayos electrofisiológicos y bioquímicos (Figura 22). Hemos encontrado una disminución significativa en la respuesta de los NMDARs (registros realizados sin Mg⁺², con 20μM de NBQX) a diferentes intensidades de estimulación en ratones WT sometidos a trauma cerebral en comparación a los animales WT control (Figura 21A). En cuanto a los SOD2^{+/-} de 2 meses de edad hemos observado un decaimiento en la respuesta total en comparación a los animales WT control tal como se había observado anteriormente, y una disminución aún más fuerte en los ratones SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral (Figura 22A). Como hemos encontrado una disminución en la respuesta correspondiente a los NMDARs, hemos decidido analizar si existen cambios en la distribución de los NMDARs entre regiones sinápticas y extrasinápticas que podrían contribuir a los efectos neuropatológicos observados tras el trauma cerebral en los ratones WT y SOD2^{+/-} (Figuras 22B). Como ya se ha explica

anteriormente, numerosos reportes han demostrado que ciertas fosforilaciones en residuos de tirosina en la subunidad GluN2B de los NMDARs está fuertemente asociada con su expresión en la superficie. En resumen la fosforilación en tirosina 1472, que regula la expresión en la superficie sináptica de los NMDARs (Xu et al. 2006), y la fosforilación en residuos de tirosina 1336 la cual está asociado con el enriquecimiento de los receptores NMDARs en membranas extrasinápticas (Goebel-Goody et al. 2009). Entre los animales WT control y sometidos a trauma cerebral no se encontraron diferencias significativas entre los niveles totales de la subunidad GluN2B. Sin embargo, hemos observado una disminución del 40% en la fosforilación que mantiene a los NMDARs en la zona sináptica (tirosina 1472) en los animales WT sometidos a trauma cerebral en comparación con los animales control. Por otro lado, la fosforilación que enriquece los NMDARs en la zona extrasináptica (tirosina 1336) incrementa aproximadamente un 60% en los ratones en los animales sometidos a trauma (Figura 22B). Al analizar los mismos parámetros en los animales $SOD2^{+/-}$ de 2 meses de edad, de igual manera no hemos observado diferencias significativas entre los niveles totales de la subunidad GluN2B. Sin embargo, la marca de fosfo-tirosina 1472 desciende un 20% en los animales $SOD2^{+/-}$ control y desciende aún más, cerca de un 50% en los mismos animales sometidos a trauma cerebral. Por otro lado, la marca de fosfo-tirosina 1336 de los animales $SOD2^{+/-}$ control posee niveles relativos similar a los animales WT, pero los animales $SOD2^{+/-}$ sometidos a trauma cerebral presentan un incremento de esta fosforilación cerca de un 60% (Figura 22B). Para confirmar el efecto del trauma sobre la distribución de los NMDARs, los cuales solo se habían analizado a través de las fosforilaciones selectivas para cada ubicación, hemos realizado un protocolo de fraccionamiento subcelular en donde,

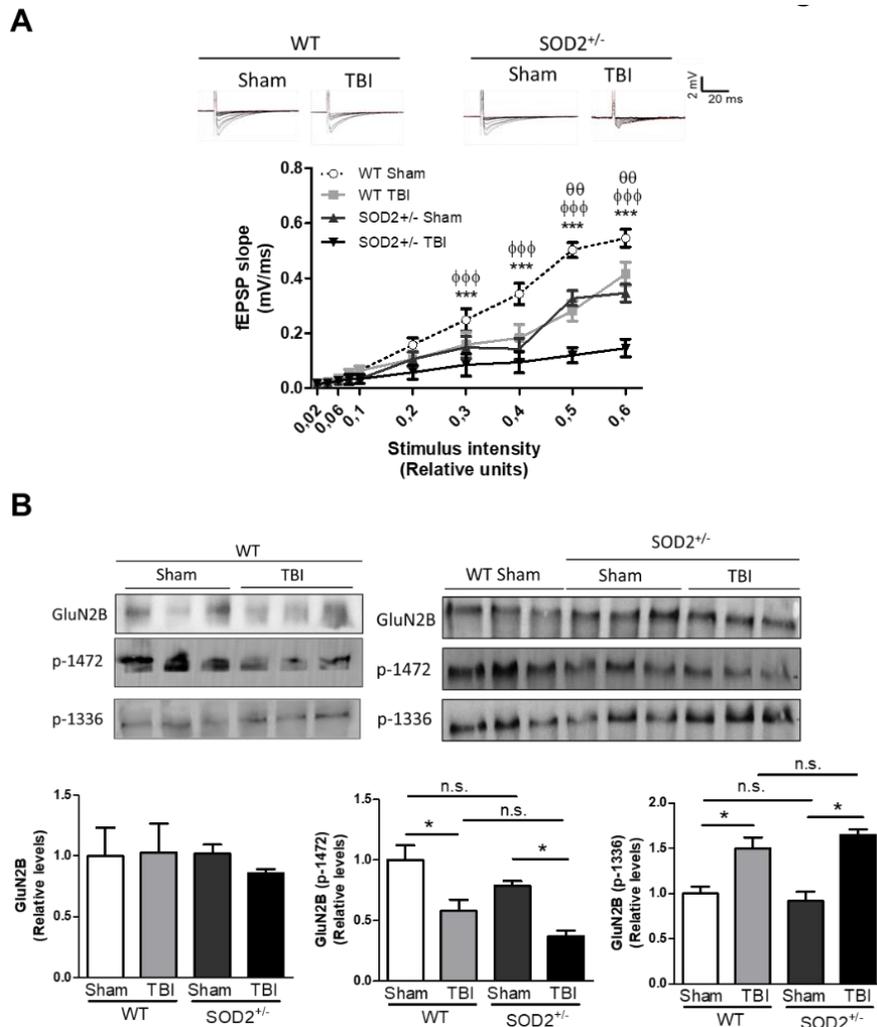


Figura 22.- El trauma cerebral altera la funcionalidad y el estado de fosforilación de los NMDARs en el hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-}. **A.** Pendiente de la respuesta sináptica (fEPSP) inducida por protocolo intensidad/respuesta para las respuestas correspondientes a los NMDARs en el hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-} en condiciones control y sometidos a trauma cerebral. **B.** Análisis por inmunoblot de las fosforilaciones de la subunidad GluN2B de los NMDARs y análisis densitométricos de la fosfo-tirosina 1472 y de la fosfo-tirosina 1336 en lisados de hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-} en condiciones control y sometidos a trauma cerebral. Se utilizaron 2 a 3 rebanadas por cada animal de 3 animales por grupo experimental para la electrofisiología y 3 animales por grupo experimental para los análisis bioquímicos. Los puntos y las barras representan promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguid posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05). Las curvas fueron analizadas por ANOVA de medidas repetidas. Los símbolos indican la significancia de la diferencia estadística observada (θ < 0.01, θθ < 0.001 entre WT Sham y WT TBI; *** < 0.001; entre WT TBI y SOD2^{+/-} TBI; φ<0.05, φφφ < 0.001; entre SOD2^{+/-} Sham y SOD2^{+/-} TBI).

entre varias fracciones pudimos separar la zona postsináptica (PSD) de la zona extrasináptica (Figura 23). Dentro de los marcadores utilizados esta tubulina, proteína del citoesqueleto, marca para fracciones de citoplasma; PDI (proteína disulfuro-isomerasa), presente en retículo endoplasmático utilizado como marcador de fracción microsomal; sinaptofisina, proteína asociada a fracciones presinápticas, pero también presente en zonas no sinápticas y PSD-95, proteína de andamiaje de la zona postsináptica (Figura 23Aa y 23Ab) (Dosemeci et al. 2006; Milnerwood et al. 2010). Al analizar los niveles de la subunidad GluN2B en la zona postsináptica observamos una disminución en los animales WT golpeados en comparación a los animales WT control (Figura 23B), en el caso de los animales SOD2^{+/-}, observamos un descenso parcial en estos animales en comparación a los animales WT control que se acrecienta fuertemente cuando se someten al protocolo de trauma (Figura 223B). El análisis de la fracción no sináptica revela un fuerte incremento de la subunidad GluN2B en esta fracción en los animales WT tras la sesión de inducción de trauma (Figura 23C). En el caso de los animales SOD2^{+/-}, solo se observa un fuerte incremento en los animales SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral (Figura 23C).

Estos resultados sugieren que el trauma cerebral y la baja barrera antioxidante de los animales puede inducir cambios patológicos en la función sináptica del hipocampo y afectar la función hipocampal, esto posiblemente en parte a la reducción de los NMDARs sinápticos y al incremento en la población de NMDARs extrasinápticos.

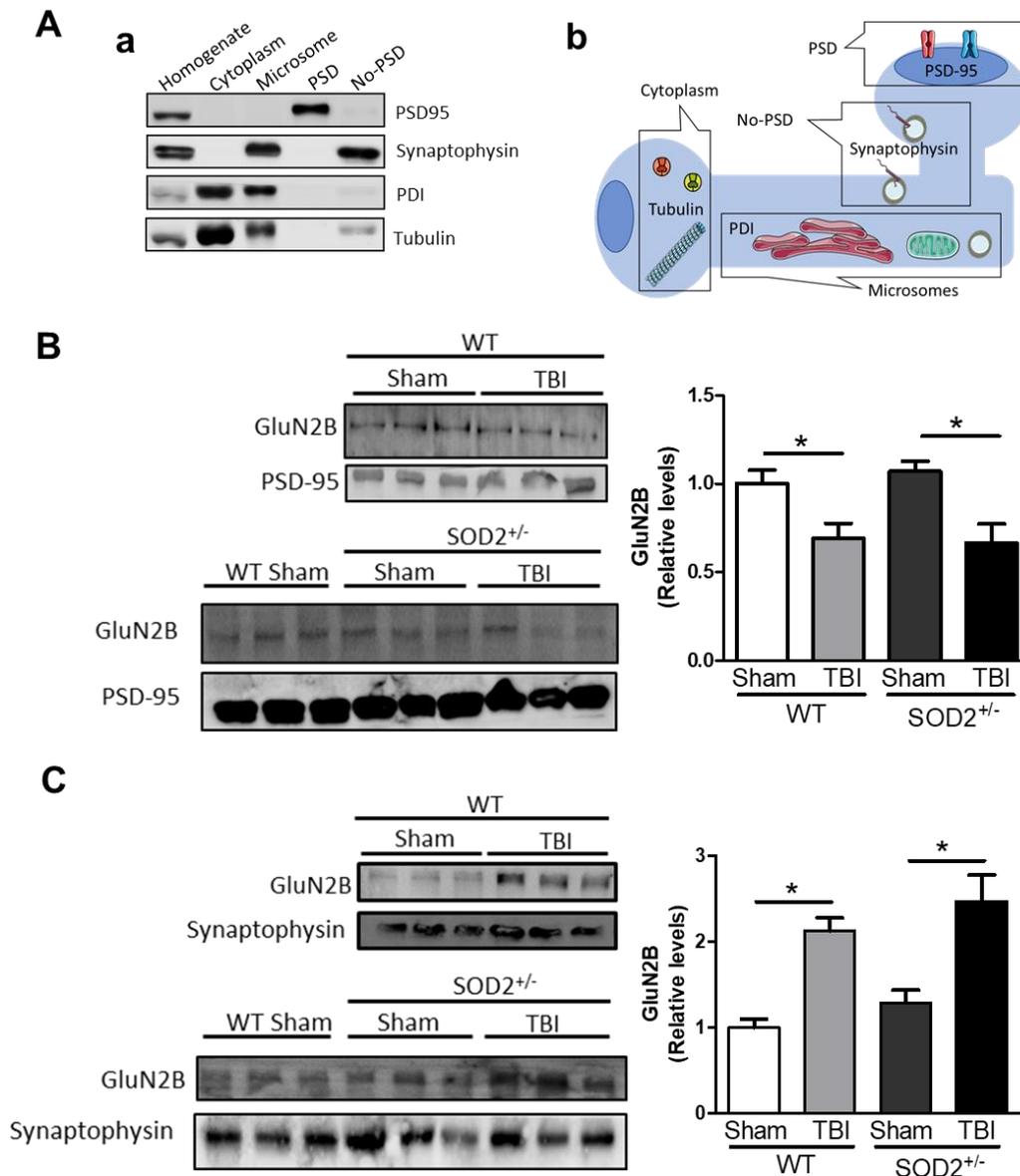


Figura 23.- El trauma cerebral altera la distribución sináptica/extrasináptica de los NMDARs en el hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-}. **A.** Caracterización del fraccionamiento subcelular descrito en la figura 6 con distintos marcadores para cada una de fracción obtenida (**Aa**). Diagrama representativo de cada fracción obtenida y del marcador utilizado para reconocerla (**Ab**). **B.** Fracción correspondiente a la densidad postsináptica de hipocampus de ratones WT y SOD2^{+/-} bajo condiciones control y sometidos a trauma cerebral y su respectiva cuantificación. **C.** Fracción correspondiente fracciones de membranas no sinápticas/extrasinápticas de hipocampus de ratones WT y SOD2^{+/-} bajo condiciones de control y sometidos a trauma cerebral y su respectiva cuantificación. Seis animales fueron usados por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguid posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05).

4.2.4.- La señalización asociada a los NMDARs esta alterada en los ratones WT y SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral.

Debido a que observamos un incremento en la población de NMDARs extrasinápticos, detectado por la fosforilación en tirosina 1336, y una reducción de la forma sináptica de los NMDARs, detectada por la fosforilación en tirosina 1472 en los animales WT y SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral, hemos analizado diversos blancos relacionados en la señalización relacionada a los NMDARs, similar a lo realizado en la figura 14 y 15 y descrito previamente (Carvajal et al. 2018). Estos blancos son CREB, STEP₆₁, PTEN y ERK (Figura 24). Como ya se mencionó anteriormente, la actividad sináptica gatillada por la activación de los NMDARs induce la transcripción génica mediada por CREB. CREB transloca al núcleo por fosforilación en el residuo de serina 133 y es utilizado como un marcador de actividad transcripcional. Además se ha reportado que esta marca de actividad transcripcional, fosforilación en serina 133, disminuye con la activación de los NMDARs extrasinápticos (Hardingham et al. 2001; Hardingham and Bading 2002; Hardingham et al. 2002). El análisis de p-CREB (S133) en el hipocampo de ratones WT y SOD2^{+/-} fue realizado mediante ensayos de inmunoblot. Se pudo observar que el trauma cerebral disminuye los niveles de p-CREB, tanto en animales WT como en animales SOD^{+/-} (Figura 24). Estos datos son acordes con la disminución de la señalización sináptica mediada por los NMDARs observadas anteriormente (Figura 22). Por otro lado, hemos analizado 2 fosfatasa implicadas directa e indirectamente en el estado de fosforilación de los NMDARs, STEP₆₁ y PTEN. PTEN se ha visto implicada en desordenes neuropatológicos como la EA y el daño por isquemia a través de un mecanismo similar sobre el estado de fosforilación de los NMDARs. No se observaron diferencias significativas entre los animales WT sometidos a trauma y los

animales WT control. Tampoco se observaron cambios entre los animales SOD2^{+/-} control y sometidos a trauma cerebral (Figura 24).

En el caso de la fosfatasa STEP₆₁, como se explicó con anterioridad, regula el estado de fosforilación a través de 2 vías, por la directa desfosforilación de la tirosina 1472, o indirectamente a través de la desfosforilación e inactivación de la quinasa Fyn, responsable de esta fosforilación (Nguyen et al. 2002; Pelkey et al. 2002). El análisis de los animales WT sometidos a trauma cerebral, evidencio un incremento sobre el 50% en su nivel de expresión (Figura 24). En el caso de los animales SOD2^{+/-}, no se observaron cambios significativos entre los animales sin inducción de trauma con los animales WT, por el contrario, el grupo de animales SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral, poseen un incremento de más del 100% en sus niveles de expresión (Figura 24). Además de medir los niveles totales de STEP₆₁, se midió su actividad mediante otro blanco de esta fosfatasa, el cual es la versión fosforilada de ERK, específicamente en los residuos de treonina 202 y tirosina 204 (Li et al. 2014). En el caso de los animales WT control y sometidos a trauma no se observaron cambios significativos en los niveles de ERK fosforilado (Figura 24). Por el contrario, los animales SOD2^{+/-} sometidos a trauma, presentan un drástico descenso de p-ERK en comparación a la condición SOD2^{+/-} control sugiriendo que además de un incremento en los niveles de STEP₆₁, también se observa un fuerte incremento en su actividad (Figura 24). Un incremento similar en los niveles de STEP han sido reportados para modelos de ratones transgénicos de la EA y de Huntington (Gladding et al. 2012; Xu et al. 2014). STEP₆₁ es la forma activa de esta fosfatasa, mientras que STEP₃₃ es el producto de degradación asociado a la activación de calpaínas por la estimulación de los NMDARs extrasinápticos (Gladding et al. 2012; Goebel-Goody et al. 2012a; Hermel et al. 2004). No se observaron diferencias significativas de los niveles de STEP₃₃ en los animales WT control y sometidos a trauma cerebral, esta versión

de STEP se encuentra en tan bajos niveles que fue necesaria la sobreexposición de la membrana al momento de revelar (Figura 24). En el caso de los animales SOD2^{+/-}, sometidos a trauma cerebral, la presencia de STEP₃₃ se incrementa sobre 6 veces en comparación a los animales control, evidenciando que además del incremento de la población de los NMDARs extrasinápticos, también existe una activación de esta población de receptores (Figura 24).

Estos resultados indican que los daños producidos en el hipocampo tras el trauma cerebral alteran diversas vías de señalización, entre ellas se encuentran las vías que median la distribución de los NMDARs, en este caso demostrando un desbalance de dos fosfatasa implicados en el estado de fosforilación de los NMDARs, los cuales también se han visto alterados en varias otras neuropatologías que podrían estar mediando los eventos neuropatológicos presentes en este modelo de trauma cerebral.

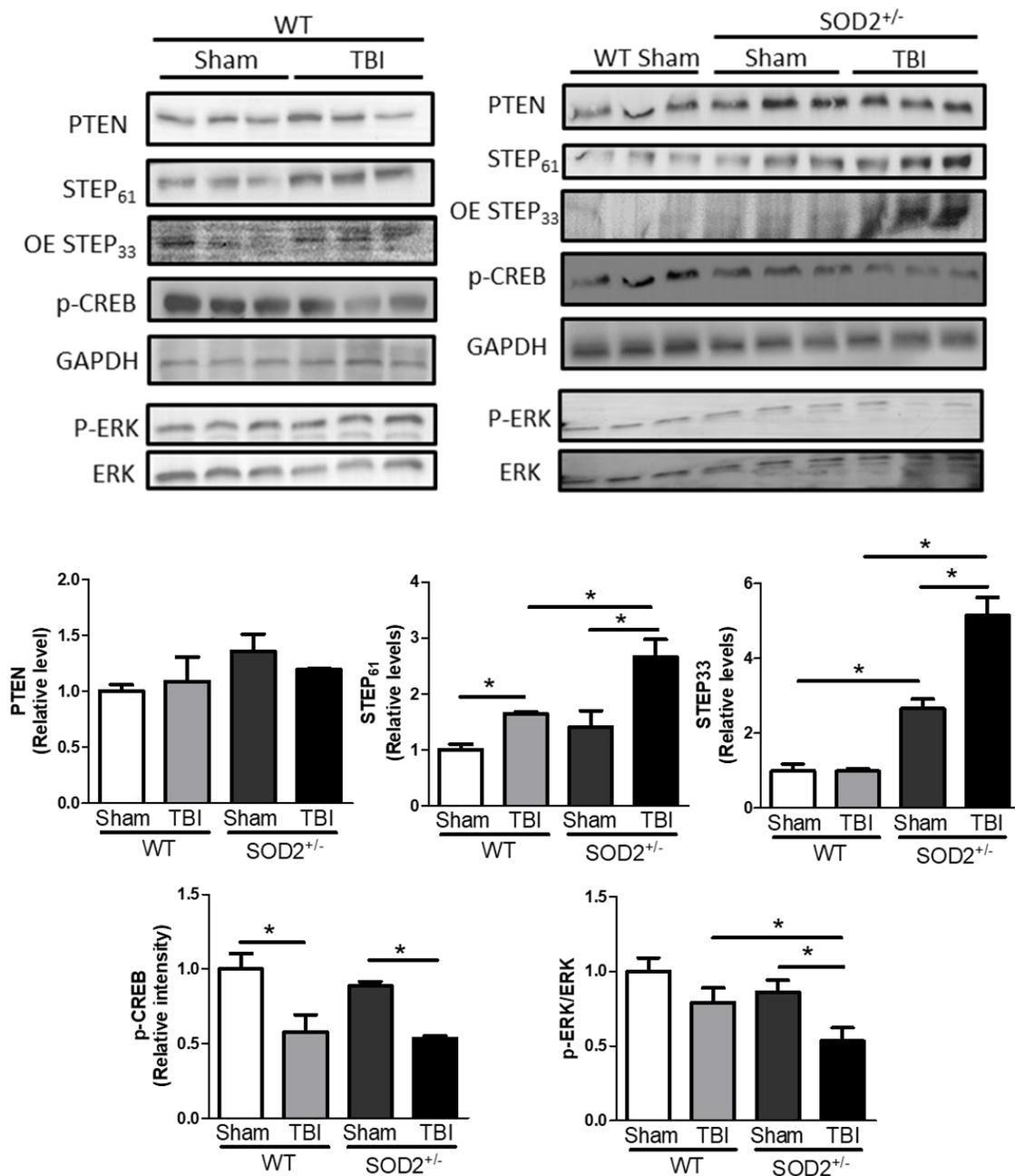


Figura 24.- La señalización asociada a los receptores NMDA se encuentra alterada en los ratones WT y SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral. Inmunoblot contra STEP, PTEN, p-CREB (S133) y p-ERK desde lisados hipocámpales extraídos desde ratones WT y SOD2^{+/-} bajo condiciones de control y sometidos a trauma cerebral y su respectiva cuantificación. La banda de STEP₃₃ fue sobreexpuesta debido a su baja expresión. Se utilizaron 3 animales por grupo experimental. Las barras representan promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05).

4.2.5.- La inhibición farmacológica de PTEN y STEP restauran parcialmente los daños producidos tras el trauma cerebral.

Los resultados observados previamente demostraron una desregulación en los estados de fosforilación de la subunidad GluN2B de los NMDARs, lo cual influye en su localización a nivel neuronal y en su funcionalidad (Figura 23) (Goebel-Goody et al. 2009). Este cambio en los estados de fosforilación de la subunidad GluN2B tras el trauma cerebral se debe principalmente al aumento en los niveles de las fosfatasa PTEN y STEP (Figura 24). Por este motivo hemos decidido administrar inhibidores farmacológicos para ambas fosfatasas por separado con el fin de revertir los efectos producidos tras el trauma cerebral atribuidos a los cambios de fosforilación de los NMDARs. Comenzamos por analizar el efecto de la inhibición de PTEN a pesar de no ver grandes cambios en sus niveles totales (Figura 24). Para ello utilizamos el inhibidor VOH-pic, una molécula pequeña de la familia vanadil, que ha demostrado ser un potente inhibidor de la actividad fosfatasa de PTEN (Mak et al. 2010; Rosivatz et al. 2006). Este inhibidor ha sido estudiado como una potencial terapia contra los daños cardiacos y neurológicos causados por el paro cardiaco repentino y para los daños causados por la isquemia/reperfusión (Li et al. 2015). Este inhibidor fue administrado de forma intraperitoneal a una dosis de 10 μ g/Kg de peso de animal y dos horas antes de cada sesión de golpes como se ha descrito en trabajos previos (Li et al. 2015), y continuando el tratamiento hasta el día de sacrificio (Ver materiales y métodos, Figura 6B). La concentración y el tiempo utilizado entre la inyección y la inducción del trauma fue estimado de acuerdo a otros trabajos que demuestran que este inhibidor, VO-pic y otros compuestos en base a vanadio, al ser administrados intraperitonealmente son capaces de aumentar los niveles de p-Akt desde los 30 minutos con el máximo nivel de inhibición a las 2 horas (Li et al. 2015; Liu et al. 2010; Zu et al. 2011).

En nuestro caso, tras el tratamiento, se observó un aumento en los niveles de Akt fosforilado, blanco canónico de la actividad fosfatasa de PTEN, demostrando que el inhibidor funciona correctamente (Figura 25 A). Al analizar el desempeño cognitivo de los animales sometidos a trauma cerebral, no se observaron diferencias significativas entre los animales sometidos a trauma cerebral tratados con solución salina y tratados con el inhibidor de PTEN, VOH-pic (Figura 25). Esto se observó en la prueba de flexibilidad de memoria, tanto en animales WT y SOD2^{+/-} (Figura 25 Ba y 25 Bb), así como en la prueba de reconocimiento de objeto nuevo (Figura 25 C). Tendencia similar fue observada al analizar las respuestas sinápticas tras el tratamiento con VOH-pic tras el trauma cerebral. No se observaron diferencias significativas entre las respuestas totales en animales WT ni en animales SOD2^{+/-} (Figura 26 Aa y 26 Ab), ni las respuestas correspondientes a los NMDARs, tanto en animales WT como en animales SOD2^{+/-} sometidos a TC (Figura 26 Ba y 26 Bb). Estos datos nos sugieren que los efectos dañinos producidos por el trauma cerebral no pueden ser restablecidos tras la inhibición farmacológica de la fosfatasa PTEN.

Por otro lado, la inhibición farmacológica de STEP, se realizó usando el compuesto TC-2153 (benzopentathiepin 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride), perteneciente a una nueva familia de inhibidores de proteínas tirosina fosfatasa en base a farmacóforos cíclicos polisulfurados que forman enlaces covalentes reversibles con la cisteína catalítica en STEP (Xu et al. 2014). Este inhibidor demostró poseer una alta especificidad en la inhibición de STEP en comparación a otras fosfatasas, además no se observaron fenómenos de toxicidad en cultivos neuronales y es capaz de revertir el déficit cognitivo en ratones modelo de la EA sin afectar los marcadores clásicos de la enfermedad (fosforilación de Tau y depósitos de β -amiloide) (Xu et al. 2014).

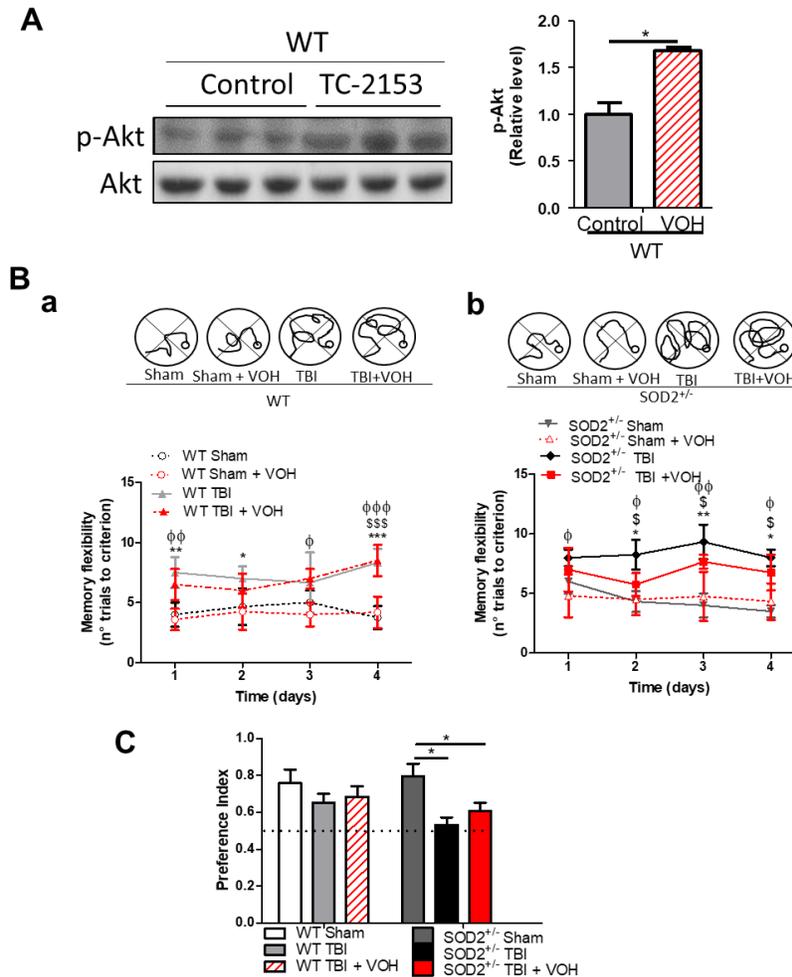


Figura 25. La inhibición farmacológica de PTEN no altera los cambios conductuales producidos por el trauma cerebral a nivel cognitivo. (A) Análisis de los niveles de p-Akt mediante análisis de western blot junto al gráfico de su análisis densitométrico de animales tratados con el inhibidor para la fosfatasa PTEN, VOH. Desempeño cognitivo de ratones WT (Ba) y SOD2^{+/-} (Bb) sometidos a trauma cerebral tratados con VOH en la prueba de flexibilidad de memoria e imágenes representativa del nado recorrido para encontrar la plataforma en el día 4. C. Análisis conductual NOR evaluado a través del del índice de preferencia por el objeto nuevo en animales WT y en animales SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral y tratados con VOH. Se utilizaron 6 animales por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio \pm error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Las curvas fueron analizadas por ANOVA de medidas repetidas. Los símbolos indican la significancia de la diferencia estadística observada. (Figura Ba, ** <0.01 , *** <0.001 ; entre WT Sham y WT TBI; \$\$\$ <0.001 para WT Sham y WT TBI + VOH; $\phi\phi\phi <0.05$, $\phi\phi <0.01$, $\phi\phi <0.001$; para WT Sham + VOH y WT TBI + VOH; Figura Bb, * <0.05 , ** <0.01 para SOD2^{+/-} Sham y SOD2^{+/-} TBI; \$ <0.05 para SOD2^{+/-} Sham y SOD2^{+/-} TBI + VOH; $\phi <0.05$, $\phi\phi <0.01$, $\phi\phi\phi <0.001$ para SOD2^{+/-} + VOH y SOD2^{+/-} TBI; Figura C, * <0.05).

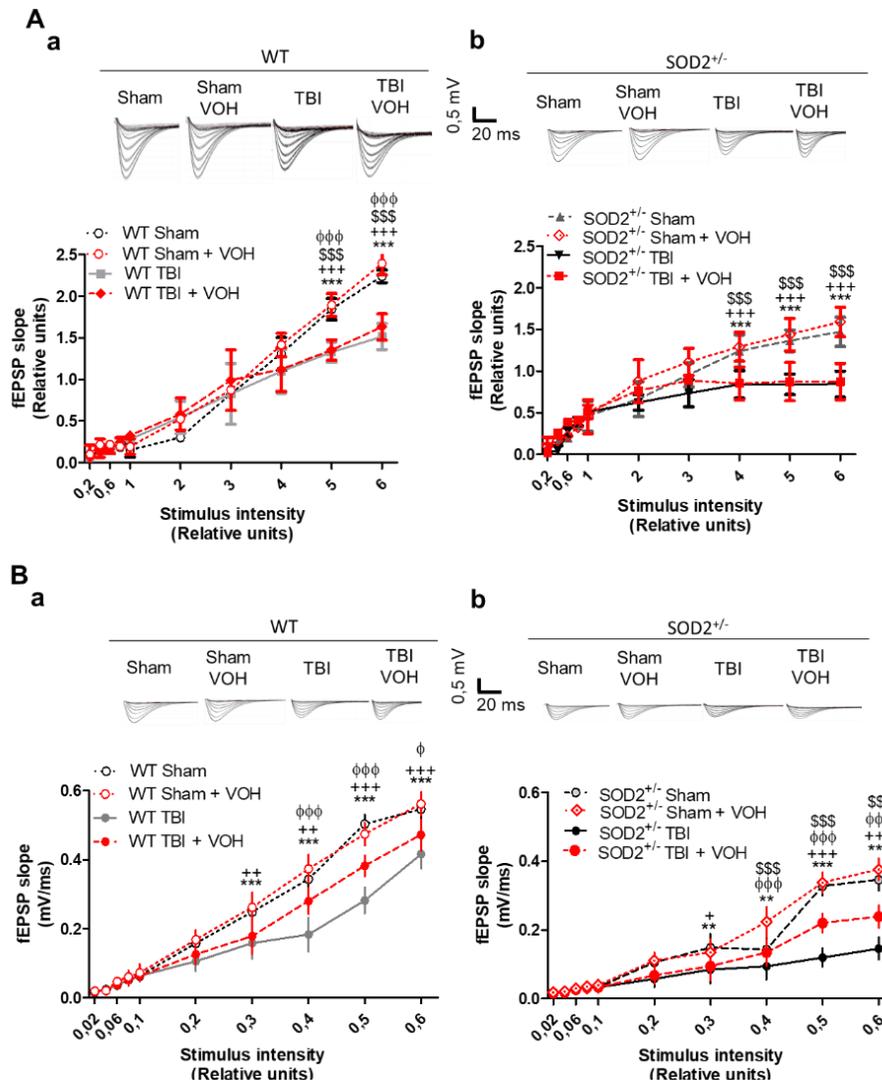


Figura 26. La inhibición farmacológica de PTEN no altera los daños sinápticos producidos por el trauma cerebral. Pendiente de la respuesta sináptica (fEPSP) inducida con distintas intensidades de estímulo para las respuestas totales en el hipocampo de ratones WT (**Aa**) y SOD2^{+/-} (**Ab**) y para las respuestas correspondientes a los NMDARs en el hipocampo de ratones WT (**Ba**) y SOD2^{+/-} (**Bb**) en condiciones control y sometidos a trauma cerebral tratados con el inhibidor de la fosfatasa PTEN, VOH. Se utilizaron 3 animales por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio \pm error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Las curvas fueron analizadas por ANOVA de medidas repetidas. (Figura Aa y Ba, *** < 0.001; entre WT Sham y WT TBI, \$\$\$ < 0.001 para animales WT Sham + VOH y WT TBI + VOH, ϕ < 0.05, $\phi\phi\phi$ < 0.001 para WT TBI y WT TBI + VOH; ++ < 0.01, +++ < 0.001 para WT Sham y WT TBI + VOH; Figura Ab y Bb, * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 para SOD2^{+/-} Sham y SOD2^{+/-} TBI; ++ < 0.01, +++ < 0.001 para SOD2^{+/-} Sham y SOD2^{+/-} TBI + VOH; \$\$\$ < 0.001 para animales SOD2^{+/-} Sham + VOH y SOD2^{+/-} TBI + VOH; $\phi\phi\phi$ < 0.05 para SOD2^{+/-} TBI y SOD2^{+/-} TBI + VOH).

El inhibidor TC-2153 se administró a una dosis de 10 mg/Kg por peso de animal con la misma frecuencia que el inhibidor de PTEN (Ver materiales y métodos, Figura 6B). En este caso si se demostró la efectividad para revertir algunos de los cambios producidos tras la inducción del trauma cerebral. La dosis utilizada ya había sido reportada previamente (Castonguay et al. 2018; Xu et al. 2014), pero de todas maneras evaluamos la efectividad del tratamiento a través de un blanco conocido de la actividad fosfatasa de STEP, el cual es la fosforilación de ERK en los residuos treonina 202 y tirosina 204 (Munoz et al. 2003; Paul et al. 2003). El tratamiento con TC-2153 demostró ser efectivo como inhibidor, logrando un incremento de p-ERK en comparación al grupo control tratado con suero salino (Figura 27 A). El análisis del desempeño cognitivo reveló una mejora tras el tratamiento con TC-2153 evaluado por la prueba de flexibilidad de memoria y por la prueba de reconocimiento de objeto nuevo (Figura 27 B y 27 C). En el caso de la prueba de flexibilidad de memoria se observa una mejora en los animales WT sometidos a trauma tratados con TC-2153 en comparación a los tratados con suero salino (Figura 27 Ba). En el caso de los animales SOD2^{+/-} la reversión del daño inducido por trauma cerebral tras el tratamiento con TC-2153 es aún más evidente (Figura 27 Bb).

Previamente se había demostrado que el trauma cerebral induce cambios en las respuestas sinápticas totales y de las respuestas correspondientes a los NMDARs (Figura 21 y 22). Por este motivo se evaluó si la inhibición farmacológica de STEP restaura los cambios producidos por el trauma cerebral. En efecto, el tratamiento con TC-2153 restaura las respuestas sinápticas tanto en animales WT como en animales SOD2^{+/-} (Figura 28 Aa y 28 Ab). Similar tendencia fue observada al evaluar las corrientes correspondientes a los NMDARs, TC-2153 restauró la pérdida de respuesta tras la inducción de trauma cerebral

tanto en animales WT como en animales SOD2^{+/-} (Figura 28 Ba y 28 Bb). Como ya se ha explicado anteriormente, numerosos reportes han demostrado que ciertas fosforilaciones en residuos de tirosina en la subunidad GluN2B de los NMDARs está fuertemente asociada con su expresión en la superficie y que este balance en el estado de fosforilación de los NMDARs y por ende de su ubicación a nivel neurona es alterado tras la inducción de trauma cerebral (Goebel-Goody et al. 2009)(Figura 21). La fosforilación en tirosina 1472, que regula la expresión en la superficie sináptica de los NMDARs (Xu et al. 2006), baja significativamente tras el trauma cerebral (Figura 22 y 29). En los animales WT, el tratamiento con TC-2153 logro restaurar parte de la disminución observada tras el trauma cerebral (Figura 22 B). En el caso de los animales SOD2^{+/-}, la restauración de los niveles de fosforilación en tirosina 1472 de los NMDARs es aún más evidente (Figura 29 B). En el caso de la fosforilación en residuos de tirosina 1336 la cual está asociado con el enriquecimiento de los NMDARs en membranas extrasinápticas (Goebel-Goody et al. 2009) se observó previamente un aumento de esta fosforilación tras el trauma cerebral (Figura 22 y 29). Tras el tratamiento con TC-2153 los niveles p-1336 no evidenciaron cambios significativos en animales WT (Figura 29 A). Caso contrario ocurrió con los animales SOD2^{+/-}, donde se evidencio un significativo descenso de esta fosforilación tras el tratamiento con TC-2153 (Figura 29 B). Estos datos sugieren fuertemente el clave papel que juega la fosfatasa STEP en el mecanismo de daño generado tras el trauma cerebral que incluye alteraciones en el estado de fosforilación de los NMDARs y que su inhibición farmacológica ayuda a revertir los cambios observados tanto a nivel cognitivo y molecular.

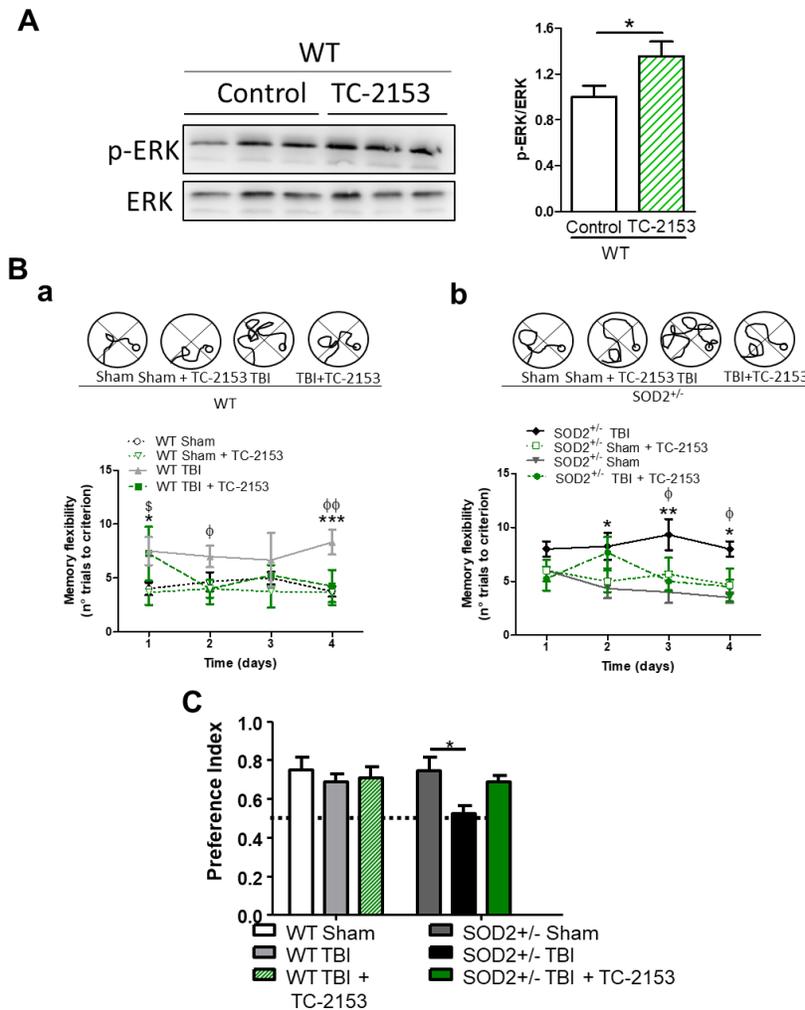


Figura 27. La inhibición farmacológica de STEP restaura parcialmente la falla cognitiva tras el trauma cerebral. (A) Análisis de los niveles de p-ERK mediante análisis de western blot junto al gráfico de su análisis densitométrico de animales tratados con el inhibidor para la fosfatasa STEP, TC-2153. Desempeño cognitivo de ratones WT (**Ba**) y SOD2^{+/-} (**Bb**) sometidos a trauma cerebral tratados con TC-2153 en la prueba de flexibilidad de memoria e imágenes representativa del nado recorrido para encontrar la plataforma en el día 4. **C.** Análisis conductual NOR evaluado a través del del índice de preferencia por el objeto nuevo en animales WT y en animales SOD2^{+/-} sometidos a trauma cerebral y tratados con TC-2153. Se utilizaron 3 animales por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio \pm error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Las curvas fueron analizadas por ANOVA de medidas repetidas. Las figuras indican la significancia de la diferencia estadística observada. (Figura Ba, **<math><0.01</math>, *** <math><0.001</math>; entre WT Sham y WT TBI, \$ <math><0.01</math> para animales WT Sham y WT TBI + TC-2153, $\phi<0.05</math>, $\phi\phi<0.01</math> para WT TBI y WT TBI + TC-2153; $\phi<0.05</math>, $\phi\phi<0.01</math> para WT TBI y WT TBI + TC-2153; Figura Bb, *<math><0.05</math>, **<math><0.01</math> para SOD2^{+/-} Sham y SOD2^{+/-} TBI; $\phi<0.05</math> para SOD2^{+/-} TBI y SOD2^{+/-} TBI + TC-2153; Figura C, *<math><0.05</math>).$$$$$

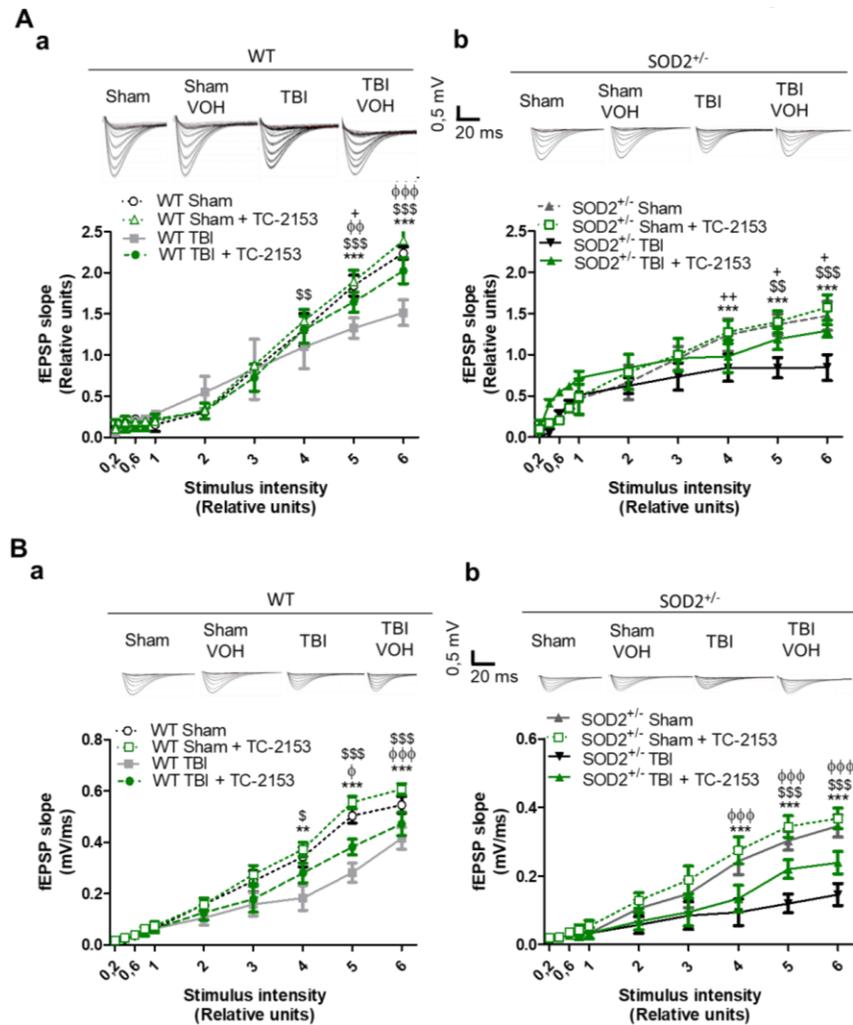


Figura 28. La inhibición farmacológica de STEP restaura parcialmente la falla sináptica y la respuesta NMDAR dependiente. Pendiente de la respuesta sináptica (fEPSP) inducida por distintas intensidades de estímulo para las respuestas totales en el hipocampo de ratones WT (**Aa**) y SOD2^{+/-} (**Ab**) y para las respuestas correspondientes a los NMDARs en el hipocampo de ratones WT (**Ba**) y SOD2^{+/-} (**Bb**) en condiciones control y sometidos a trauma cerebral tratados con el inhibidor de la fosfatasa STEP, TC-2153. Se utilizaron 3 animales por grupo experimental. Los datos son mostrados como promedio \pm error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguido posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada ($* < 0.05$). Las curvas fueron analizadas por ANOVA de medidas repetidas. (Figura Aa y Ba, $*** < 0.001$; entre WT Sham y WT TBI, $$$$ < 0.001$ para animales WT Sham + TC-2153 y WT TBI + TC-2153, $\phi < 0.05$, $\phi\phi\phi < 0.001$ para WT TBI y WT TBI + TC-2153; $++ < 0.01$, $+++ < 0.001$ para WT Sham y WT TBI + TC-2153; Figura Ab y Bb, $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$ para SOD2^{+/-} Sham y SOD2^{+/-} TBI; $++ < 0.01$, $+++ < 0.001$ para SOD2^{+/-} Sham y SOD2^{+/-} TBI + TC-2153; $$$$ < 0.001$ para animales SOD2^{+/-} Sham + TC-2153 y SOD2^{+/-} TBI + TC-2153; $\phi\phi\phi < 0.05$ para SOD2^{+/-} TBI y SOD2^{+/-} TBI + TC-2153).

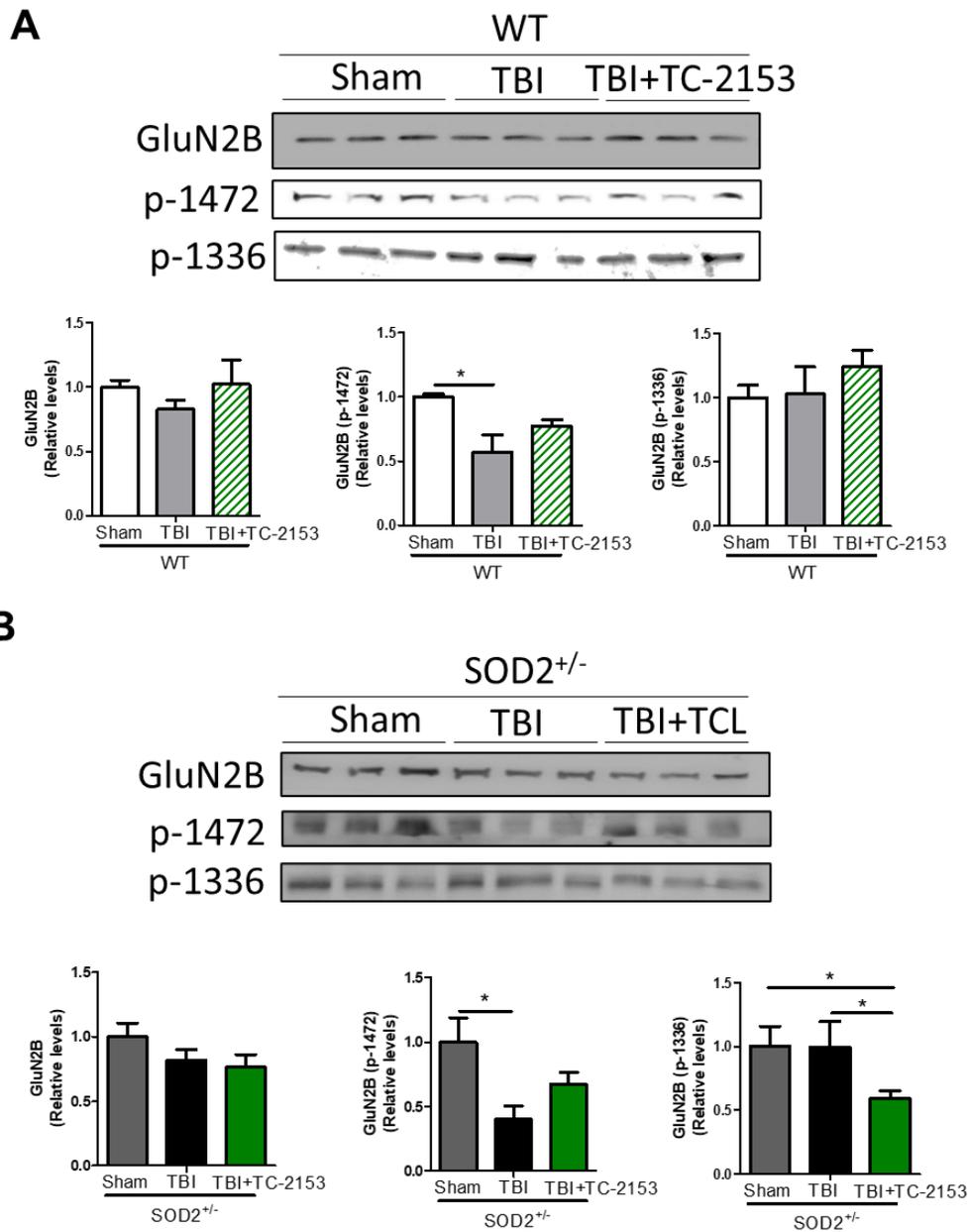


Figura 29. La inhibición farmacológica de STEP restaura el estado de fosforilación de los NMDARS tras el trauma cerebral. Análisis por inmunoblot de las fosforilaciones de la subunidad GluN2B de los NMDARS y análisis densitométricos de la fosfo-tirosina 1472 y de la fosfo-tirosina 1336 en lisados de hipocampo de ratones WT (A) y SOD2^{+/-} (B) en condiciones control y sometidos a trauma cerebral tratados con el inhibidor de STEP, TC-2153. Se utilizaron 3 animales por grupo experimental. Las barras representan promedio + error estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA, seguid posteriormente del análisis de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia de la diferencia estadística observada (*<0.05).

5.- Discusión

Usando un modelo transgénico con capacidad antioxidante comprometida (baja actividad de la enzima SOD2), hemos demostrado que, bajo condiciones de estrés oxidativo, existe una desregulación en la señalización intracelular asociada a la distribución y/o localización de los NMDARs, lo que gatilla cambios en las funciones dependientes del hipocampo con consecuencias a nivel conductual, de memoria y aprendizaje. Además, hemos demostrado la susceptibilidad que existe al presentar esta baja en la capacidad antioxidante al daño bajo un modelo de daño traumático cerebral leve y repetitivo, lo que provoca que estos animales presenten las características del animal en estados más avanzados de edad con un alto nivel de marcadores de ROS a nivel tisular. En general existen principalmente dos mecanismos a través los cuales los ROS afectan los canales iónicos: 1) por la oxidación directa de los residuos aminoacídicos o 2) interfiriendo con las vías de señalización que regulan estos canales (Aizenman et al. 1989; Patel and Sesti 2016; Paula-Lima et al. 2014). La actividad de los NMDARs puede ser regulada por radicales hidroxilos ligados directamente en sitios moduladores redox de este receptor (Aizenman 1995; Aizenman et al. 1990; Aizenman et al. 1989). Sin embargo, estos receptores no son los únicos canales que se ven afectados por ROS en el hipocampo afectando procesos dependientes de esta estructura como el aprendizaje y la memoria. Los receptores de rianodina (RYRs) son una familia de canales que liberan calcio desde organelos intracelulares. La disfunción de estos canales sensibles al estado de oxidación de sus aminoácidos puede generar alteraciones en la capacidad de generar LTP en algunos circuitos neuronales (Paula-Lima et al. 2014).

En este trabajo nos hemos centrado en evaluar como el daño oxidativo, generado a través de modelos de estrés oxidativo crónico (animal SOD2^{+/-} y envejecimiento), o a través

de un daño externo (trauma cerebral), se altera la señalización implicada en la distribución de los NMDARs. Nuestros experimentos en hipocampo de animales SOD2^{+/-}, que tienen una disminución considerable en la actividad de SOD2 en el cerebro (Van Remmen et al. 1999), demuestran que el estrés oxidativo afecta la transmisión sináptica mediada por los NMDARs, esto es especialmente drástico en ratones de mayor edad o bajo condiciones de trauma. Dada la importancia de los NMDARs en la transmisión sináptica (Carroll and Zukin 2002; Carvajal et al. 2016), la desregulación de la señalización río-abajo a través del daño oxidativo proporciona un mecanismo de disfunción sináptica en varias otras condiciones neuropatológicas donde el incremento de ROS tiene un papel regulador fundamental (Cahill-Smith and Li 2014; Ghosh et al. 2011; Lewerenz and Maher 2011; von Bernhardt and Eugenin 2012).

Los NMDARs se encuentran localizados en distintos compartimentos de la membrana neuronal y todos ellos pueden activar vías de señalización diferentes cuando son activadas por glutamato. Por ejemplo, la activación de los NMDARs sinápticos esta acoplada con la activación de ERK, con la subsecuente activación de CREB, señalización envuelta en la plasticidad sináptica y sobrevivencia neuronal (Hardingham et al. 2001; Huang et al. 2008). Además, previos reportes indican que la regulación de la subunidad GluN2B por Cdk5 mejora la memoria en modelos de rata y que su aumento en actividad está asociado a diversos tipos de daño cerebral (Meyer et al. 2014; Plattner et al. 2014; Tassin et al. 2015; Yousuf et al. 2016). En contraste, la activación de los NMDARs extrasinápticos está asociado con la activación de calpaínas, p38 y varias otras vías de muerte celular, junto con la inhibición de la vía CREB (Fan et al. 2012; Hardingham and Bading 2002; 2010; Hardingham et al. 2002).

Los NMDARs son más dinámicos de lo que originalmente se pensaba, y las neuronas son capaces de regular el número, la distribución y la composición de la subunidad de receptores sinápticos y extrasinápticos (Barria and Malinow 2005; 2002; Groc et al. 2009; Groc et al. 2006; Hardingham and Bading 2010). Sin embargo, el mecanismo y las señales que controlan la presencia de los NMDARs en diferentes dominios celulares son dependientes principalmente del estado de fosforilación de la subunidad GluN2B (Goebel-Goody et al. 2009). Dentro de las fosforilaciones más importantes se encuentran dos realizadas en residuos de tirosina. La fosforilación en la tirosina 1472 de la subunidad GluN2B es crítica para mantener al receptor NMDA en la sinapsis y previniendo su endocitosis (Carroll and Zukin 2002; Carvajal et al. 2016; Goebel et al. 2005). Por otro lado, la fosforilación en la tirosina 1336 de la subunidad GluN2B está asociada a un enriquecimiento de los NMDARs extrasinápticos (Gladding and Raymond 2011; Goebel-Goody et al. 2009). Ambas fosforilaciones son sustratos de la kinasa de la familia Src llamada Fyn (Schumann et al. 2009; Xu et al. 2006). El estado de fosforilación de los NMDARs también puede ser controlados por fosfatasas, una de ellas es STEP₆₁, que modula el estado de fosforilación a través de dos vías paralelas: por desfosforilación directa del residuo de tirosina de la subunidad GluN2B 1472 (Braithwaite et al. 2006; Goebel-Goody et al. 2009), e indirectamente vía desfosforilación e inactivación de la kinasa Fyn (Nguyen et al. 2002). Además, la fosfatasa STEP es diferencialmente regulada por los NMDARs sinápticos y extrasinápticos. En condiciones de actividad sináptica, STEP₆₁ es ubiquitinada y degradada vía proteosoma, eliminándola de la zona sináptica y por el contrario, la disminución de los estímulos sinápticos contribuye al aumento de esta fosfatasa (Paul et al. 2003; Pelkey et al. 2002; Saavedra et al. 2018; Xu et al. 2009). Por otro lado, la estimulación extrasináptica de los NMDARs activa calpaínas que hidrolizan a STEP₆₁ dejando como subproducto de

degradación la isoforma de 33 KDa (STEP₃₃) (Goebel-Goody et al. 2012a). La actividad de STEP₆₁ es regulada mediante fosforilaciones. Fosforilación en la serina 221, realizada mediante PKA, conforma la forma inactiva de STEP₆₁, mientras que su forma desfosforilada, realizada mediante la proteína fosfatasa 1 (PP1) es la forma activa. Por lo que queda en evidencia que el aumento de la actividad de STEP₆₁ se incrementa por la disminución de la actividad neuronal STEP₆₁ (Braithwaite et al. 2006; Goebel-Goody et al. 2012a). Además, esta fosfatasa bajo condiciones de daño oxidativo, como fue realizado en neuronas en cultivo utilizando peróxido de hidrogeno, han demostrado agregación de esta proteína. Esta agregación impide su ubiquitinación y la degradación, por lo cual aumenta sus niveles. En cuanto a su actividad, oligómeros pequeño aumentan su actividad, mientras que con los oligómeros más complejo, se ha observado una pérdida de su actividad (Deb et al. 2011). Este mecanismo de oligomerización, junto con la activación de la fosfatasa STEP modulada a través de la actividad sináptica son claves en la desregulación de STEP en diversas patologías. La desfosforilación de la tirosina 1472 de la subunidad GluN2B de los NMDARs también puede ser realizada por la fosfatasa PTEN. Esta fosfatasa está envuelta de manera directa en los procesos de depresión a largo plazo NMDARs-dependientes (Arendt et al. 2014; Jurado et al. 2010; Qin et al. 2016) y ha sido implicada en el mecanismo patológico de la migraña recurrente a través la desforforilación de este residuo de tirosina 1472 (Qin et al. 2016). Además, PTEN ha sido asociada con otras neuropatologías como la enfermedad de Alzheimer, daños por isquemia e infartos cerebrales a través de mecanismos similares que dependen de la actividad fosfatasa sobre los NMDARs (Chang et al. 2007; Knafo et al. 2016; Liu et al. 2010; Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2013). PTEN, es un altamente conocido protooncogén debido a su efecto sobre la vía de señalización PIP₃/Akt. En la mayoría de los tipos de cáncer se genera un fuerte incremento de ROS (Chalhoub and Baker 2009). Bajo

condiciones de estrés oxidativo, PTEN es capaz de translocar al núcleo he inducir la síntesis de componentes del sistema antioxidante, como son Nrf2 y NQO1 (Luo et al. 2018; Petersen et al. 2018; Yamadori et al. 2012)

En el último tiempo se ha dedicado un gran esfuerzo en comprender como la desregulación de la fosfatasa STEP contribuye a la fisiopatología de diversos trastornos neurológicos como EA, la enfermedad de Huntington, la esquizofrenia, síndrome X-frágil y en los cambios patológicos asociados al envejecimiento (Carty et al. 2012; Cases et al. 2018; Castonguay et al. 2018; Gladding et al. 2012; Goebel-Goody et al. 2012a; Goebel-Goody et al. 2012b; Xu et al. 2014). En base a estos antecedentes y a otros estudios epidemiológicos se ha considerado al daño producido tras trauma cerebral como un evento fisiopatológico crónico que posee diversos marcadores y signos común con otras enfermedades neuropatológicas (Davis 2000b; Mollayeva et al. 2018). Entre los marcadores y signos en común con otras neuropatologías se encuentran estados de demencia, cuadros psicóticos, depresión y una fuerte incidencia de otras patologías que proponen al trauma cerebral como un factor de riesgo (Jordan 2014; Kabadi and Faden 2014). Además, a nivel de modelos se han encontrado agregados anormales de proteínas como los que se encuentran presentes en la EA (ovillos neurofibrilares y depósitos amiloides) (Chen et al. 2009; Nakagawa et al. 1999; Smith et al. 2003; Yang et al. 2015), falla en el sistema de degradación de proteínas (Wolf et al. 2018), neuroinflamación y daño oxidativo en el hipocampo de estos animales (DeWalt et al. 2018; Hall et al. 2012; Witcher et al. 2018; Zhang et al. 2012), zona de fuerte interés debido a que la memoria y el aprendizaje dependen de esta zona la cual es una de las más afectadas en este tipo de condiciones patológicas (Brun et al. 2002; Langston and Wood 2010; Tsien et al. 1996). En cuanto a modelos animales de trauma cerebral, existe una gran

variedad de estos, dentro de los que se incluyen traumas encefálicos abiertos, con pérdida de masa cortical y traumas cerrados, provocados por ondas de expansión (Nakagawa et al. 2008), impactos corticales e impactos frontales (Kilbourne et al. 2009; Xiong et al. 2013). A pesar de existir una gran variedad de modelos la mayoría de ellos se ha limitado a informes descriptivos de distintos tipos de daño como daño estructural (Gao et al. 2011), daño cognitivo y sináptico y neuroinflamación (Chen et al. 1996; Davis 2000a; DeWalt et al. 2018; Witcher et al. 2018; Zhang et al. 2012), pero pocos trabajos han demostrado un posible mecanismo del daño a largo/mediano plazo producido tras el trauma cerebral. Por este motivo hemos decidido utilizar un modelo de trauma frontal, el cual no genera daño tisular ni estructural para estudiar los efectos en el hipocampo y sus implicancias funcionales, teniendo como blanco de estudio la modulación de receptores sinápticos mediante diversas vías de señalización, teniendo al estrés oxidativo como signo en común con otras patologías. Para poder dilucidar un posible mecanismo de daño hemos usado una combinación de herramientas bioquímicas, histológicas, electrofisiológicas y conductuales hemos identificado una señalización río abajo a la activación de los NMDARs que regulan su localización en sitios sinápticos o extrasinápticos bajo distintas condiciones de daño. Primero, hemos demostrado algunos efectos dañinos, como el estrés oxidativo, afectan la distribución de los NMDARs y la señalización que conlleva a este fenómeno. Inicialmente comenzamos evaluando el efecto de la generación de ROS a diferentes tiempos en ratones WT y con capacidad antioxidante reducida debido a la baja expresión de la enzima SOD2. En este modelo se observa un incremento en marcadores de daño oxidativo en ratones WT a los 6 meses de edad. En cuanto a los animales SOD2^{+/-}, los niveles de los marcadores de daño oxidativo se encuentran elevados, siendo el incremento mayor a los 6 meses de edad. Sin embargo, el daño cognitivo solo es observable a los 6 meses de edad, sugiriendo que este

daño es producido por una larga exposición y al daño acumulativo de ROS. En cuanto a los animales sometidos al modelo de trauma cerebral, se usaron animales jóvenes, de 2 meses de edad, edad en la cual los animales SOD2^{+/-} aun no presentan alteraciones significativas. En los animales sometidos a trauma existe la generación de ROS y neuroinflamación, ambos fenómenos presentes en el hipocampo, en donde también hemos podido observar falla a nivel cognitivo y sináptico. Algunos de estos efectos observados tras el trauma son similares o a veces más severos a los observados en los animales de mayor edad (6 meses). En cuanto a las alteraciones en la transmisión sináptica, principalmente aquellas relacionadas con los NMDARs, presentes a los ratones SOD2^{+/-} de 6 meses o a los animales sometidos al modelo de trauma pueden tener su origen en una disminución de la forma sináptica de los NMDARs (medido por la fosforilación en tirosina 1472 de la subunidad GluN2B) y/o aumento en la población de NMDARs extrasinápticos (medido por la fosforilación en tirosina 1336 de la subunidad GluN2B). El incremento en esta población puede ser gatillado por las fosfatasa STEP y PTEN como resultado de la inactivación del sistema de degradación de proteínas vía proteosoma y contribuir a la disminución de la forma sináptica de los NMDARs. (Gladding et al. 2012; Hegde 2010; Xu et al. 2009; Zhang et al. 2013). Cabe destacar que, en el caso de los animales sometidos al modelo de trauma cerebral, las consecuencias funcionales y cognitivas se relacionan principalmente a STEP, ya que los niveles de PTEN en este caso no se ven alterados de manera evidente. La baja actividad relacionada a los NMDARs sinápticos induce un descenso en los niveles de la fosforilación en CREB, blanco de la vía ERK, reduciendo la sobrevivencia neuronal (Hardingham et al. 2001; Hardingham and Bading 2002; Hardingham et al. 2002). En nuestro caso, hemos encontrado una reducción drástica de los niveles de p-CREB en los animales SOD2^{+/-} de 6 meses de edad y en los animales sometidos a trauma cerebral, demostrando que la señalización río abajo a la activación de los NMDARs

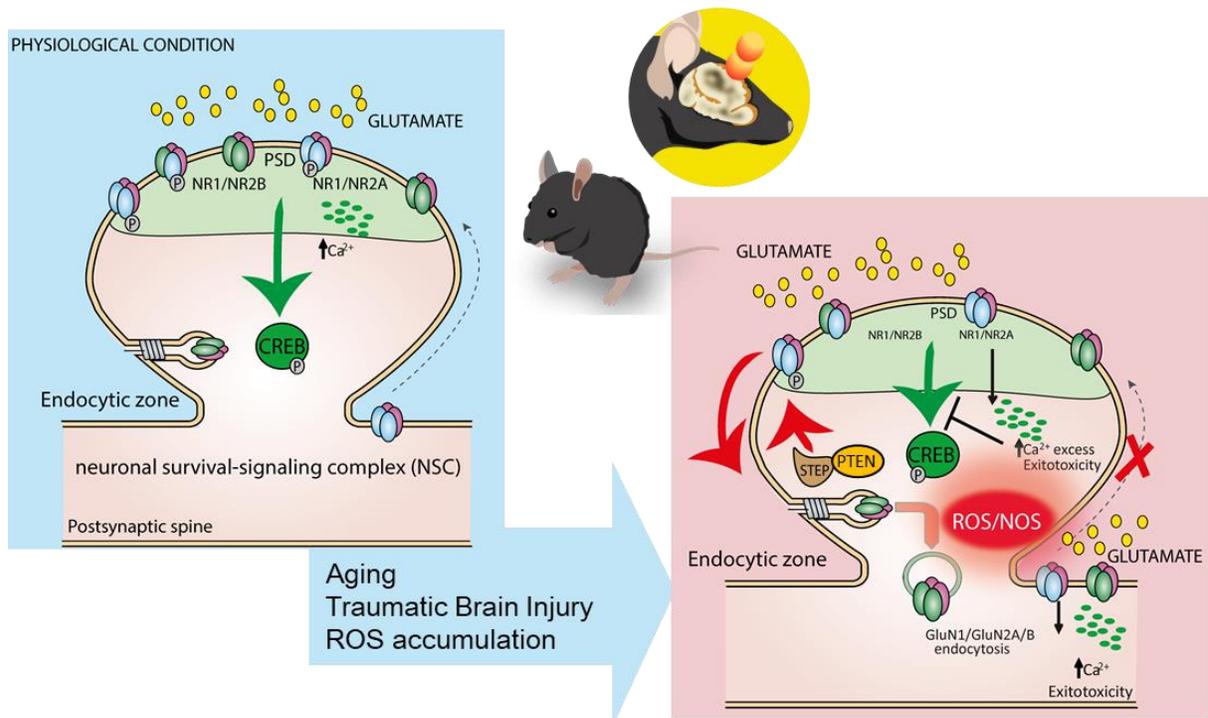


Figura 30. Efectos del daño del crónico y agudo evaluados en este trabajo sobre los NMDARs y su regulación a través de las fosfatasas STEP y PTEN. Esquema ilustrativo donde se representan los cambios a nivel sináptico bajo los modelos de daño observados; envejecimiento, trauma cerebral y acumulación de ROS. Estos diferentes tipos de daño provocan alteraciones en dos fosfatasas, STEP y PTEN, la cuales generan un desbalance en el estado de fosforilación de los NMDARs. Ambas fosfatasas tienen como la fosforilación en la tirosina 1472 de la subunidad GluN2B de los NMDARs, la encargada de prevenir la endocitosis del receptor y mantenerlo en la zona sináptica. El aumento de ambas fosfatasas provoca la disminución de la fosforilación, lo que conlleva a alteraciones a nivel de respuesta sináptica y de desempeño cognitivo. Además, como consecuencia del trauma cerebral, también se observa un aumento de la fosforilación en la tirosina 1336 de la subunidad GluN2B de los NMDARs, la cual enriquece a los receptores en zonas extrasinápticas. La activación de estos receptores conlleva a la activación de cascadas intracelulares pro-apoptóticas que contribuyen al daño neuronal.

está alterada, estos fenómenos observados se encuentran resumidos en forma de mecanismo en la figura 30. Variados desordenes neuropatológicos como la EA, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington presentan disfunción en la señalización río debajo de los receptores NMDARs y una desregulación del estado oxidativo, sugiriendo que un evento común como el estrés oxidativo puede afectar el mantenimiento sináptico y su función (Carvajal et al. 2016; Kim et al. 2015b). El papel del estado oxidativo en el control de la distribución de los NMDARs y la señalización río abajo ofrece un mecanismo que proporciona una mejor comprensión de las neuropatologías en las que la transmisión glutamatérgica está comprometida. Este mecanismo descrito es uno de los principales contribuyentes en las alteraciones intracelulares de la neurona, sin embargo, existen otras vías de señalización además de la activación de ERK y sus moléculas río arriba que poseen vías de señalización con funciones similares que pueden impactar en el desempeño neuronal. Es posible asociar los daños agudos y patologías crónicas a la modificación de los canales de potasio ya que su forma oxidada ha sido relacionada en la disfunción celular en diferentes tejidos incluyendo, tejido vascular (Feher et al. 2014), musculo esquelético (Vergara and Ramirez 1997) y cerebro (Power et al. 2002). Por ejemplo, el canal de potasio KCNB1 (Kv2.1) en su forma oxidada causa alteraciones celulares y déficit cognitivo en modelos de trauma cerebral (Yu et al. 2016) e incrementa la excitabilidad en neuronas hipocampales en un modelos de EA (Frazzini et al. 2016). Por otro lado, la contribución de la tirosina kinasa Src (encargada de varias de las fosforilaciones de los NMDARs) fue demostrada usando el inhibidor Disatinib, el cual se encuentra río arriba de la vía de señalización de ERK y controla su activación a través de la proteína fosfatasa 2A (Hu et al. 2009). Como ya ha sido descrito, ERK controla la fosforilación y activación de CREB, que, al ser un factor de transcripción de gran importancia, su inactivación ha sido asociada a diversas patologías que tienen

asociado fallas en la plasticidad sináptica y el daño neuronal (Hardingham et al. 2001; Hardingham and Bading 2002). La señalización de los NMDARs y de los canales KCNB1 han ganado protagonismo como importantes participantes en los mecanismos de plasticidad sináptica y neurodegeneración asociados a estado de oxidación de la célula. En este caso nos hemos centrado en dos efectores de la señalización de los NMDARs (STEP y PTEN), como posibles blancos de intervención ya que las diversas vías de señalización de sobrevivida o muerte neuronal dependen en gran medida de la localización de los receptores activados sináptica o extrasinápticamente. Cabe destacar que la actividad fosfatasa de STEP también afecta a los AMPARs, actividad que también regula su función sináptica en modelos de sinapsis homeostáticas y en eventos neuropatológicos (Goebel-Goody et al. 2012a; Jang et al. 2015), por lo que aumenta su importancia como blanco terapéutico para distintas condiciones neuropatológicas.

Las neuronas son particularmente sensibles al daño oxidativo debido principalmente a su incapacidad de dividirse (Herrup and Yang 2007; Patel and Sesti 2016). Por esta razón la batería de mecanismos antioxidantes es amplia y diversa (Lewerenz and Maher 2011), y el mal funcionamiento de estos componentes puede llegar a ser catastrófico para las neuronas. Por ejemplo en las condiciones neuropatológicas que hemos mencionado, además del estrés oxidativo y la falla sináptica, existen alteraciones en otras maquinarias intracelulares como alteraciones en el sistema de degradación y autofagia (Hegde 2010; Hegde and Upadhyya 2011; Inata et al. 2018; Wolf et al. 2018), alteraciones a nivel bioenergético y mitocondrial (Bezprozvanny and Hayden 2004; Cardoso et al. 2017; Cenini and Voos 2016), neuroinflamación (DeWalt et al. 2018; Kokiko-Cochran and Godbout 2018), formación de agregados proteicos (Johnson et al. 2012; Smith et al. 1999), además de las regulaciones acá

estudiadas, donde cabe destacar el aumento de la actividad de STEP₆₁, fosfatasa que la actividad sináptica, lo que establece un mecanismo neuropatológico aun no descrito para el daño producido por trauma general, pero si descrito para otras enfermedades como la EA, el Huntington y la esquizofrenia (Carty et al. 2012; Gladding et al. 2012; Goebel-Goody et al. 2012a), lo que reafirma el concepto de que el trauma cerebral debiese ser tratado como un proceso crónico en vez de un fenómeno agudo.

Entender como los receptores de glutamato se regulan bajo condiciones de estrés oxidativo inducido de diversas formas, proporciona las bases para entender la regulación de procesos tales como formación de sinapsis, aprendizaje memoria y entender diversas neuropatologías, abriendo oportunidades para el desarrollo de tratamientos para enfermedades en las que la distribución y señalización de los NMDARs están comprometidos.

6.- Conclusiones

El estrés oxidativo y el daño sináptico son dos procesos fisiológicos muy comunes en diversas enfermedades neurodegenerativas, en este trabajo hemos establecido el papel de dos fosfatasas, STEP y PTEN en la regulación del estado de fosforilación y de la ubicación sináptica/extrasináptica de los NMDARs bajo dos modelos de estrés oxidativo, estrés oxidativo crónico, evaluado a través del envejecimiento de un modelo transgénico con baja capacidad antioxidante, y a través del daño oxidativo agudo, evaluado a través de un modelo de trauma cerebral moderado. En ambos casos se observaron una desregulación de estas fosfatasas, que contribuyó en el incremento de la población extrasináptica de los NMDARs, los cuales son responsables de gran parte del deterioro neuronal. Estos datos sugieren un importante papel de STEP y PTEN en la neurodegeneración provocada por trauma cerebral, los que podrían ser utilizados como biomarcador o blanco farmacológico para combatirlo.

7.- Referencias

- Aizenman E.** Modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by hydroxyl radicals in rat cortical neurons in vitro. *Neuroscience letters* 189: 57-59, 1995.
- Aizenman E, Hartnett KA, and Reynolds IJ.** Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site. *Neuron* 5: 841-846, 1990.
- Aizenman E, Lipton SA, and Loring RH.** Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2: 1257-1263, 1989.
- Anderson WW, and Collingridge GL.** Capabilities of the WinLTP data acquisition program extending beyond basic LTP experimental functions. *Journal of neuroscience methods* 162: 346-356, 2007.
- Arendt KL, Benoist M, Lario A, Draffin JE, Munoz M, and Esteban JA.** PTEN counteracts PIP3 upregulation in spines during NMDA-receptor-dependent long-term depression. *Journal of cell science* 127: 5253-5260, 2014.
- Bagetta V, Ghiglieri V, Sgobio C, Calabresi P, and Picconi B.** Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans* 38: 493-497, 2010.
- Bakhit C, Koda L, Benoit R, Morrison JH, and Bloom FE.** Evidence for selective release of somatostatin-14 and somatostatin-28(1-12) from rat hypothalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4: 411-419, 1984.
- Barria A, and Malinow R.** NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 48: 289-301, 2005.
- Barria A, and Malinow R.** Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 35: 345-353, 2002.
- Becuwe P, Ennen M, Klotz R, Barbieux C, and Grandemange S.** Manganese superoxide dismutase in breast cancer: from molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance. *Free radical biology & medicine* 77: 139-151, 2014.
- Bezprozvanny I, and Hayden MR.** Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochemical and biophysical research communications* 322: 1310-1317, 2004.
- Boulanger LM, Lombroso PJ, Raghunathan A, During MJ, Wahle P, and Naegele JR.** Cellular and molecular characterization of a brain-enriched protein tyrosine phosphatase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15: 1532-1544, 1995.
- Braithwaite SP, Adkisson M, Leung J, Nava A, Masterson B, Urfer R, Oksenberg D, and Nikolic K.** Regulation of NMDA receptor trafficking and function by striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP). *The European journal of neuroscience* 23: 2847-2856, 2006.
- Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, and Clark RE.** Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & memory* 17: 5-11, 2010.
- Brooks SP, Janghra N, Higgs GV, Bayram-Weston Z, Heuer A, Jones L, and Dunnett SB.** Selective cognitive impairment in the YAC128 Huntington's disease mouse. *Brain research bulletin* 88: 121-129, 2012.
- Brun VH, Otnass MK, Molden S, Steffenach HA, Witter MP, Moser MB, and Moser EI.** Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science* 296: 2243-2246, 2002.
- Cahill-Smith S, and Li JM.** Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2. *Br J Clin Pharmacol* 78: 441-453, 2014.
- Cardoso S, Seica RM, and Moreira PI.** Mitochondria as a target for neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Expert review of neurotherapeutics* 17: 77-91, 2017.
- Carroll RC, and Zukin RS.** NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in neurosciences* 25: 571-577, 2002.

- Carty NC, Xu J, Kurup P, Brouillette J, Goebel-Goody SM, Austin DR, Yuan P, Chen G, Correa PR, Haroutunian V, Pittenger C, and Lombroso PJ.** The tyrosine phosphatase STEP: implications in schizophrenia and the molecular mechanism underlying antipsychotic medications. *Translational psychiatry* 2: e137, 2012.
- Carvajal FJ, Mattison HA, and Cerpa W.** Role of NMDA Receptor-Mediated Glutamatergic Signaling in Chronic and Acute Neuropathologies. *Neural plasticity* 2016: 2701526, 2016.
- Carvajal FJ, Mira RG, Rovegno M, Minniti AN, and Cerpa W.** Age-related NMDA signaling alterations in SOD2 deficient mice. *Biochimica et biophysica acta* 1864: 2010-2020, 2018.
- Carvajal FJ, Zolezzi JM, Tapia-Rojas C, Godoy JA, and Inestrosa NC.** Tetrahydroperforin decreases cholinergic markers associated with amyloid-beta plaques, 4-hydroxynonenal formation, and caspase-3 activation in AbetaPP/PS1 mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 36: 99-118, 2013.
- Cases S, Saavedra A, Tyebji S, Giralt A, Alberch J, and Perez-Navarro E.** Age-related changes in STriatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase levels: Regulation by BDNF. *Molecular and cellular neurosciences* 86: 41-49, 2018.
- Castonguay D, Dufort-Gervais J, Menard C, Chatterjee M, Quirion R, Bontempi B, Schneider JS, Arnsten AFT, Nairn AC, Norris CM, Ferland G, Bezard E, Gaudreau P, Lombroso PJ, and Brouillette J.** The Tyrosine Phosphatase STEP Is Involved in Age-Related Memory Decline. *Current biology : CB* 28: 1079-1089 e1074, 2018.
- Genini G, and Voos W.** Role of Mitochondrial Protein Quality Control in Oxidative Stress-induced Neurodegenerative Diseases. *Curr Alzheimer Res* 13: 164-173, 2016.
- Cerpa W, Ramos-Fernandez E, and Inestrosa NC.** Modulation of the NMDA Receptor Through Secreted Soluble Factors. *Molecular neurobiology* 53: 299-309, 2016.
- Cull-Candy S, Brickley S, and Farrant M.** NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current opinion in neurobiology* 11: 327-335, 2001.
- Chalhoub N, and Baker SJ.** PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual review of pathology* 4: 127-150, 2009.
- Chang N, El-Hayek YH, Gomez E, and Wan Q.** Phosphatase PTEN in neuronal injury and brain disorders. *Trends in neurosciences* 30: 581-586, 2007.
- Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, and Morris RG.** A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 975-979, 2000.
- Chen XH, Johnson VE, Uryu K, Trojanowski JQ, and Smith DH.** A lack of amyloid beta plaques despite persistent accumulation of amyloid beta in axons of long-term survivors of traumatic brain injury. *Brain pathology* 19: 214-223, 2009.
- Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, and Shohami E.** An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *Journal of neurotrauma* 13: 557-568, 1996.
- Davis AE.** Cognitive impairments following traumatic brain injury. Etiologies and interventions. *Critical care nursing clinics of North America* 12: 447-456, 2000a.
- Davis AE.** Mechanisms of traumatic brain injury: biomechanical, structural and cellular considerations. *Critical care nursing quarterly* 23: 1-13, 2000b.
- Davis CG.** Injury threshold: whiplash-associated disorders. *Journal of manipulative and physiological therapeutics* 23: 420-427, 2000c.
- Deb I, Poddar R, and Paul S.** Oxidative stress-induced oligomerization inhibits the activity of the non-receptor tyrosine phosphatase STEP61. *Journal of neurochemistry* 116: 1097-1111, 2011.
- DeWalt GJ, Mahajan B, Foster AR, Thompson LDE, Martini AA, Schmidt EV, Mansuri S, D'Souza D, Patel SB, Tenenbaum M, Brandao-Viruet KI, Thompson D, Duong B, Smith DH, Blute TA, and Eldred**

- WD.** Region-specific alterations in astrocyte and microglia morphology following exposure to blasts in the mouse hippocampus. *Neuroscience letters* 664: 160-166, 2018.
- Dosemeci A, Tao-Cheng JH, Vinade L, and Jaffe H.** Preparation of postsynaptic density fraction from hippocampal slices and proteomic analysis. *Biochemical and biophysical research communications* 339: 687-694, 2006.
- Ennaceur A.** One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural brain research* 215: 244-254, 2010.
- Fan J, Gladding CM, Wang L, Zhang LY, Kaufman AM, Milnerwood AJ, and Raymond LA.** P38 MAPK is involved in enhanced NMDA receptor-dependent excitotoxicity in YAC transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiology of disease* 45: 999-1009, 2012.
- Fehér A, Broskova Z, and Bagi Z.** Age-related impairment of conducted dilation in human coronary arterioles. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 306: H1595-1601, 2014.
- Ferrante RJ, Shinobu LA, Schulz JB, Matthews RT, Thomas CE, Kowall NW, Gurney ME, and Beal MF.** Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Annals of neurology* 42: 326-334, 1997.
- Foster KA, McLaughlin N, Edbauer D, Phillips M, Bolton A, Constantine-Paton M, and Sheng M.** Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 2676-2685, 2010.
- Frazzini V, Guarnieri S, Bomba M, Navarra R, Morabito C, Mariggio MA, and Sensi SL.** Altered Kv2.1 functioning promotes increased excitability in hippocampal neurons of an Alzheimer's disease mouse model. *Cell death & disease* 7: e2100, 2016.
- Gao X, Deng P, Xu ZC, and Chen J.** Moderate traumatic brain injury causes acute dendritic and synaptic degeneration in the hippocampal dentate gyrus. *PloS one* 6: e24566, 2011.
- Gary DS, and Mattson MP.** PTEN regulates Akt kinase activity in hippocampal neurons and increases their sensitivity to glutamate and apoptosis. *Neuromolecular medicine* 2: 261-269, 2002.
- Ghosh N, Ghosh R, and Mandal SC.** Antioxidant protection: A promising therapeutic intervention in neurodegenerative disease. *Free radical research* 45: 888-905, 2011.
- Gladding CM, and Raymond LA.** Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Molecular and cellular neurosciences* 48: 308-320, 2011.
- Gladding CM, Sepers MD, Xu J, Zhang LY, Milnerwood AJ, Lombroso PJ, and Raymond LA.** Calpain and STriatal-Enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) activation contribute to extrasynaptic NMDA receptor localization in a Huntington's disease mouse model. *Human molecular genetics* 21: 3739-3752, 2012.
- Goebel-Goody SM, Baum M, Paspalas CD, Fernandez SM, Carty NC, Kurup P, and Lombroso PJ.** Therapeutic implications for striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) in neuropsychiatric disorders. *Pharmacological reviews* 64: 65-87, 2012a.
- Goebel-Goody SM, Davies KD, Alvestad Linger RM, Freund RK, and Browning MD.** Phosphoregulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-d-aspartate receptors in adult hippocampal slices. *Neuroscience* 158: 1446-1459, 2009.
- Goebel-Goody SM, Wilson-Wallis ED, Royston S, Tagliatela SM, Naegele JR, and Lombroso PJ.** Genetic manipulation of STEP reverses behavioral abnormalities in a fragile X syndrome mouse model. *Genes Brain Behav* 11: 586-600, 2012b.
- Goebel SM, Alvestad RM, Coultrap SJ, and Browning MD.** Tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor is enhanced in synaptic membrane fractions of the adult rat hippocampus. *Brain research Molecular brain research* 142: 65-79, 2005.
- Greger IH, Watson JF, and Cull-Candy SG.** Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* 94: 713-730, 2017.

- Groc L, Bard L, and Choquet D.** Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158: 4-18, 2009.
- Groc L, and Choquet D.** AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell and tissue research* 326: 423-438, 2006.
- Groc L, and Choquet D.** [The neuronal surface: a new land to regulate neuronal communication]. *Medecine sciences : M/S* 25: 895-897, 2009.
- Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L, and Choquet D.** NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18769-18774, 2006.
- Grosshans DR, Clayton DA, Coultrap SJ, and Browning MD.** LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nature neuroscience* 5: 27-33, 2002.
- Hall ED, Wang JA, and Miller DM.** Relationship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury. *Experimental neurology* 238: 176-182, 2012.
- Hallett PJ, Spoelgen R, Hyman BT, Standaert DG, and Dunah AW.** Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 4690-4700, 2006.
- Hardingham GE, Arnold FJ, and Bading H.** Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nature neuroscience* 4: 261-267, 2001.
- Hardingham GE, and Bading H.** Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochimica et biophysica acta* 1600: 148-153, 2002.
- Hardingham GE, and Bading H.** Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature reviews Neuroscience* 11: 682-696, 2010.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, and Bading H.** Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature neuroscience* 5: 405-414, 2002.
- He S, Shao LR, Wang Y, and Bausch SB.** Synaptic and extrasynaptic plasticity in glutamatergic circuits involving dentate granule cells following chronic N-methyl-D-aspartate receptor inhibition. *Journal of neurophysiology* 109: 1535-1547, 2013.
- Hegde AN.** The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. *Learning & memory* 17: 314-327, 2010.
- Hegde AN, and Upadhyaya SC.** Role of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in nervous system disease. *Biochimica et biophysica acta* 1809: 128-140, 2011.
- Hermel E, Gafni J, Propp SS, Leavitt BR, Wellington CL, Young JE, Hackam AS, Logvinova AV, Peel AL, Chen SF, Hook V, Singaraja R, Krajewski S, Goldsmith PC, Ellerby HM, Hayden MR, Bredesen DE, and Ellerby LM.** Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ* 11: 424-438, 2004.
- Herrup K, and Yang Y.** Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nature reviews Neuroscience* 8: 368-378, 2007.
- Hicklin TR, Wu PH, Radcliffe RA, Freund RK, Goebel-Goody SM, Correa PR, Proctor WR, Lombroso PJ, and Browning MD.** Alcohol inhibition of the NMDA receptor function, long-term potentiation, and fear learning requires striatal-enriched protein tyrosine phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 6650-6655, 2011.
- Hosoki A, Yonekura S, Zhao QL, Wei ZL, Takasaki I, Tabuchi Y, Wang LL, Hasuike S, Nomura T, Tachibana A, Hashiguchi K, Yonei S, Kondo T, and Zhang-Akiyama QM.** Mitochondria-targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells. *Journal of radiation research* 53: 58-71, 2012.
- Hu X, Wu X, Xu J, Zhou J, Han X, and Guo J.** Src kinase up-regulates the ERK cascade through inactivation of protein phosphatase 2A following cerebral ischemia. *BMC neuroscience* 10: 74, 2009.

- Huang CC, and Hsu KS.** The role of NMDA receptors in regulating group II metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression in rat medial prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 54: 1071-1078, 2008.
- Huang YH, Lin Y, Brown TE, Han MH, Saal DB, Neve RL, Zukin RS, Sorg BA, Nestler EJ, Malenka RC, and Dong Y.** CREB modulates the functional output of nucleus accumbens neurons: a critical role of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDAR) receptors. *The Journal of biological chemistry* 283: 2751-2760, 2008.
- Hynd MR, Scott HL, and Dodd PR.** Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international* 45: 583-595, 2004.
- Inata Y, Kikuchi S, Samraj RS, Hake PW, O'Connor M, Ledford JR, O'Connor J, Lahni P, Wolfe V, Piraino G, and Zingarelli B.** Autophagy and mitochondrial biogenesis impairment contribute to age-dependent liver injury in experimental sepsis: dysregulation of AMP-activated protein kinase pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32: 728-741, 2018.
- Inestrosa NC, Carvajal FJ, Zolezzi JM, Tapia-Rojas C, Serrano F, Karmelic D, Toledo EM, Toro A, Toro J, and Santos MJ.** Peroxisome proliferators reduce spatial memory impairment, synaptic failure, and neurodegeneration in brains of a double transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 33: 941-959, 2013.
- Inestrosa NC, Tapia-Rojas C, Griffith TN, Carvajal FJ, Benito MJ, Rivera-Dictter A, Alvarez AR, Serrano FG, Hancke JL, Burgos PV, Parodi J, and Varela-Nallar L.** Tetrahydroperforin prevents cognitive deficit, A β deposition, tau phosphorylation and synaptotoxicity in the APP^{swe}/PSEN1 Δ E9 model of Alzheimer's disease: a possible effect on APP processing. *Translational psychiatry* 1: e20, 2011.
- Ishihara Y, Takemoto T, Itoh K, Ishida A, and Yamazaki T.** Dual role of superoxide dismutase 2 induced in activated microglia: oxidative stress tolerance and convergence of inflammatory responses. *The Journal of biological chemistry* 290: 22805-22817, 2015.
- Jang SS, Royston SE, Xu J, Cavaretta JP, Vest MO, Lee KY, Lee S, Jeong HG, Lombroso PJ, and Chung HJ.** Regulation of STEP61 and tyrosine-phosphorylation of NMDA and AMPA receptors during homeostatic synaptic plasticity. *Molecular brain* 8: 55, 2015.
- Jellinger KA.** Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *Journal of cellular and molecular medicine* 14: 457-487, 2010.
- Ji C, Amarnath V, Pietenpol JA, and Marnett LJ.** 4-hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release. *Chemical research in toxicology* 14: 1090-1096, 2001.
- Johnson VE, Stewart W, and Smith DH.** Widespread tau and amyloid-beta pathology many years after a single traumatic brain injury in humans. *Brain pathology* 22: 142-149, 2012.
- Jordan BD.** Chronic traumatic encephalopathy and other long-term sequelae. *Continuum* 20: 1588-1604, 2014.
- Jung JE, Kim GS, Narasimhan P, Song YS, and Chan PH.** Regulation of Mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by STAT3 in mice after cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 7003-7014, 2009.
- Jurado S, Benoist M, Lario A, Knafo S, Petrok CN, and Esteban JA.** PTEN is recruited to the postsynaptic terminal for NMDA receptor-dependent long-term depression. *The EMBO journal* 29: 2827-2840, 2010.
- Kabadi SV, and Faden AI.** Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation. *International journal of molecular sciences* 15: 1216-1236, 2014.
- Kilbourne M, Kuehn R, Tosun C, Caridi J, Keledjian K, Bochicchio G, Scalea T, Gerzanich V, and Simard JM.** Novel model of frontal impact closed head injury in the rat. *Journal of neurotrauma* 26: 2233-2243, 2009.

- Kim DH, Kwack SJ, Yoon KS, Choi JS, and Lee BM.** 4-Hydroxynonenal: A Superior Oxidative Biomarker Compared to Malondialdehyde and Carbonyl Content Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. *J Toxicol Environ Health A* 78: 1051-1062, 2015a.
- Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, and Yoon S.** The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol* 24: 325-340, 2015b.
- Knafo S, and Esteban JA.** PTEN: Local and Global Modulation of Neuronal Function in Health and Disease. *Trends in neurosciences* 40: 83-91, 2017.
- Knafo S, Sanchez-Puelles C, Palomer E, Delgado I, Draffin JE, Mingo J, Wahle T, Kaleka K, Mou L, Pereda-Perez I, Klosi E, Faber EB, Chapman HM, Lozano-Montes L, Ortega-Molina A, Ordonez-Gutierrez L, Wandosell F, Vina J, Dotti CG, Hall RA, Pulido R, Gerges NZ, Chan AM, Spaller MR, Serrano M, Venero C, and Esteban JA.** PTEN recruitment controls synaptic and cognitive function in Alzheimer's models. *Nature neuroscience* 19: 443-453, 2016.
- Kokiko-Cochran ON, and Godbout JP.** The Inflammatory Continuum of Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease. *Frontiers in immunology* 9: 672, 2018.
- Kurup P, Zhang Y, Xu J, Venkitaramani DV, Haroutunian V, Greengard P, Nairn AC, and Lombroso PJ.** Abeta-mediated NMDA receptor endocytosis in Alzheimer's disease involves ubiquitination of the tyrosine phosphatase STEP61. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 5948-5957, 2010.
- Kwak HB, Lee Y, Kim JH, Van Remmen H, Richardson AG, and Lawler JM.** MnSOD overexpression reduces fibrosis and pro-apoptotic signaling in the aging mouse heart. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 70: 533-544, 2015.
- Kwon J, Lee SR, Yang KS, Ahn Y, Kim YJ, Stadtman ER, and Rhee SG.** Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 16419-16424, 2004.
- Lai TW, Shyu WC, and Wang YT.** Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends in molecular medicine* 17: 266-275, 2011.
- Langlois JA, Rutland-Brown W, and Wald MM.** The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *The Journal of head trauma rehabilitation* 21: 375-378, 2006.
- Langston RF, Stevenson CH, Wilson CL, Saunders I, and Wood ER.** The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. *Behavioural brain research* 215: 275-291, 2010.
- Langston RF, and Wood ER.** Associative recognition and the hippocampus: differential effects of hippocampal lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. *Hippocampus* 20: 1139-1153, 2010.
- Lau CG, Takeuchi K, Rodenas-Ruano A, Takayasu Y, Murphy J, Bennett MV, and Zukin RS.** Regulation of NMDA receptor Ca²⁺ signalling and synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans* 37: 1369-1374, 2009.
- Lavezzari G, McCallum J, Dewey CM, and Roche KW.** Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 6383-6391, 2004.
- Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, and Rhee SG.** Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *The Journal of biological chemistry* 277: 20336-20342, 2002.
- Lewerenz J, and Maher P.** Control of redox state and redox signaling by neural antioxidant systems. *Antioxidants & redox signaling* 14: 1449-1465, 2011.
- Li J, Wang H, Zhong Q, Zhu X, Chen SJ, Qian Y, Costakis J, Bunney G, Beiser DG, Leff AR, Lewandowski ED, JM OD, and Vanden Hoek TL.** A novel pharmacological strategy by PTEN inhibition for improving metabolic resuscitation and survival after mouse cardiac arrest. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 308: H1414-1422, 2015.

- Li R, Xie DD, Dong JH, Li H, Li KS, Su J, Chen LZ, Xu YF, Wang HM, Gong Z, Cui GY, Yu X, Wang K, Yao W, Xin T, Li MY, Xiao KH, An XF, Huo Y, Xu ZG, Sun JP, and Pang Q.** Molecular mechanism of ERK dephosphorylation by striatal-enriched protein tyrosine phosphatase. *Journal of neurochemistry* 128: 315-329, 2014.
- Liu C, Wu J, Xu K, Cai F, Gu J, Ma L, and Chen J.** Neuroprotection by baicalein in ischemic brain injury involves PTEN/AKT pathway. *Journal of neurochemistry* 112: 1500-1512, 2010.
- Luo S, Lei K, Xiang D, and Ye K.** NQO1 Is Regulated by PTEN in Glioblastoma, Mediating Cell Proliferation and Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018: 9146528, 2018.
- Maas AI, Stocchetti N, and Bullock R.** Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet Neurology* 7: 728-741, 2008.
- Maehama T, and Dixon JE.** The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 273: 13375-13378, 1998.
- Mak LH, Vilar R, and Woscholski R.** Characterisation of the PTEN inhibitor VO-OHpic. *Journal of chemical biology* 3: 157-163, 2010.
- Masel BE, and DeWitt DS.** Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *Journal of neurotrauma* 27: 1529-1540, 2010.
- Mehta SL, Lin Y, Chen W, Yu F, Cao L, He Q, Chan PH, and Li PA.** Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates ischemic brain damage under hyperglycemic conditions by altering autophagy. *Translational stroke research* 2: 42-50, 2011.
- Meyer DA, Torres-Altora MI, Tan Z, Tozzi A, Di Filippo M, DiNapoli V, Plattner F, Kansy JW, Benkovic SA, Huber JD, Miller DB, Greengard P, Calabresi P, Rosen CL, and Bibb JA.** Ischemic stroke injury is mediated by aberrant Cdk5. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 8259-8267, 2014.
- Milnerwood AJ, Gladding CM, Pouladi MA, Kaufman AM, Hines RM, Boyd JD, Ko RW, Vasuta OC, Graham RK, Hayden MR, Murphy TH, and Raymond LA.** Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. *Neuron* 65: 178-190, 2010.
- Mollayeva T, Mollayeva S, and Colantonio A.** Traumatic brain injury: sex, gender and intersecting vulnerabilities. *Nature reviews Neurology* 14: 711-722, 2018.
- Montgomery JM, Selcher JC, Hanson JE, and Madison DV.** Dynamin-dependent NMDAR endocytosis during LTD and its dependence on synaptic state. *BMC neuroscience* 6: 48, 2005.
- Morris R.** Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* 11: 47-60, 1984.
- Munoz JJ, Tarrega C, Blanco-Aparicio C, and Pulido R.** Differential interaction of the tyrosine phosphatases PTP-SL, STEP and HePTP with the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and p38alpha is determined by a kinase specificity sequence and influenced by reducing agents. *The Biochemical journal* 372: 193-201, 2003.
- Murakami K, Kondo T, Kawase M, Li Y, Sato S, Chen SF, and Chan PH.** Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 205-213, 1998.
- Nakagawa A, Fujimura M, Kato K, Okuyama H, Hashimoto T, Takayama K, and Tominaga T.** Shock wave-induced brain injury in rat: novel traumatic brain injury animal model. *Acta neurochirurgica Supplement* 102: 421-424, 2008.
- Nakagawa Y, Nakamura M, McIntosh TK, Rodriguez A, Berlin JA, Smith DH, Saatman KE, Raghupathi R, Clemens J, Saido TC, Schmidt ML, Lee VM, and Trojanowski JQ.** Traumatic brain injury in young, amyloid-beta peptide overexpressing transgenic mice induces marked ipsilateral

hippocampal atrophy and diminished Abeta deposition during aging. *The Journal of comparative neurology* 411: 390-398, 1999.

Nguyen TH, Liu J, and Lombroso PJ. Striatal enriched phosphatase 61 dephosphorylates Fyn at phosphotyrosine 420. *The Journal of biological chemistry* 277: 24274-24279, 2002.

Ning K, Pei L, Liao M, Liu B, Zhang Y, Jiang W, Mielke JG, Li L, Chen Y, El-Hayek YH, Fehlings MG, Zhang X, Liu F, Eubanks J, and Wan Q. Dual neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 4052-4060, 2004.

Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, and Smith MA. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 1959-1964, 1999.

Patel R, and Sesti F. Oxidation of ion channels in the aging nervous system. *Brain research* 2016.

Paul S, Nairn AC, Wang P, and Lombroso PJ. NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling. *Nature neuroscience* 6: 34-42, 2003.

Paul S, Snyder GL, Yokakura H, Picciotto MR, Nairn AC, and Lombroso PJ. The Dopamine/D1 receptor mediates the phosphorylation and inactivation of the protein tyrosine phosphatase STEP via a PKA-dependent pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 5630-5638, 2000.

Paula-Lima AC, Adasme T, and Hidalgo C. Contribution of Ca²⁺ release channels to hippocampal synaptic plasticity and spatial memory: potential redox modulation. *Antioxidants & redox signaling* 21: 892-914, 2014.

Pelkey KA, Askalan R, Paul S, Kalia LV, Nguyen TH, Pitcher GM, Salter MW, and Lombroso PJ. Tyrosine phosphatase STEP is a tonic brake on induction of long-term potentiation. *Neuron* 34: 127-138, 2002.

Peng Y, Zhao J, Gu QH, Chen RQ, Xu Z, Yan JZ, Wang SH, Liu SY, Chen Z, and Lu W. Distinct trafficking and expression mechanisms underlie LTP and LTD of NMDA receptor-mediated synaptic responses. *Hippocampus* 20: 646-658, 2010.

Perry JJ, Hearn AS, Cabelli DE, Nick HS, Tainer JA, and Silverman DN. Contribution of human manganese superoxide dismutase tyrosine 34 to structure and catalysis. *Biochemistry* 48: 3417-3424, 2009.

Petersen DR, Saba LM, Sayin VI, Papagiannakopoulos T, Schmidt EE, Merrill GF, Orlicky DJ, and Shearn CT. Elevated Nrf-2 responses are insufficient to mitigate protein carbonylation in hepatospecific PTEN deletion mice. *PLoS one* 13: e0198139, 2018.

Pias EK, Ekshyyan OY, Rhoads CA, Fuseler J, Harrison L, and Aw TY. Differential effects of superoxide dismutase isoform expression on hydroperoxide-induced apoptosis in PC-12 cells. *The Journal of biological chemistry* 278: 13294-13301, 2003.

Plattner F, Hernandez A, Kistler TM, Pozo K, Zhong P, Yuen EY, Tan C, Hawasli AH, Cooke SF, Nishi A, Guo A, Wiederhold T, Yan Z, and Bibb JA. Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of NR2B. *Neuron* 81: 1070-1083, 2014.

Power JM, Wu WW, Sametsky E, Oh MM, and Disterhoft JF. Age-related enhancement of the slow outward calcium-activated potassium current in hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 7234-7243, 2002.

Qin G, Xie J, Chen L, Wu B, Gui B, and Zhou J. PTEN inhibition preserves trigeminal nucleus caudalis neuron activation through tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit at Tyr1472 of the NMDA receptor in a rat model of recurrent migraine. *Neurological research* 38: 320-326, 2016.

Rosivatz E, Matthews JG, McDonald NQ, Mulet X, Ho KK, Lossi N, Schmid AC, Mirabelli M, Pomeranz KM, Erneux C, Lam EW, Vilar R, and Woscholski R. A small molecule inhibitor for

phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN). *ACS chemical biology* 1: 780-790, 2006.

Rutland-Brown W, Langlois JA, Thomas KE, and Xi YL. Incidence of traumatic brain injury in the United States, 2003. *The Journal of head trauma rehabilitation* 21: 544-548, 2006.

Saavedra A, Ballesteros JJ, Tyebji S, Martinez-Torres S, Blazquez G, Lopez-Hidalgo R, Azkona G, Alberch J, Martin ED, and Perez-Navarro E. Proteolytic Degradation of Hippocampal STEP61 in LTP and Learning. *Molecular neurobiology* 2018.

Salter DM, Wright MO, and Millward-Sadler SJ. NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Biorheology* 41: 273-281, 2004.

Salter MW, and Kalia LV. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nature reviews Neuroscience* 5: 317-328, 2004.

Schouten JW. Neuroprotection in traumatic brain injury: a complex struggle against the biology of nature. *Current opinion in critical care* 13: 134-142, 2007.

Schumann J, Michaeli A, and Yaka R. Src-protein tyrosine kinases are required for cocaine-induced increase in the expression and function of the NMDA receptor in the ventral tegmental area. *Journal of neurochemistry* 108: 697-706, 2009.

Schwarzbach E, Bonislawski DP, Xiong G, and Cohen AS. Mechanisms underlying the inability to induce area CA1 LTP in the mouse after traumatic brain injury. *Hippocampus* 16: 541-550, 2006.

Smith DH, Chen XH, Nonaka M, Trojanowski JQ, Lee VM, Saatman KE, Leoni MJ, Xu BN, Wolf JA, and Meaney DF. Accumulation of amyloid beta and tau and the formation of neurofilament inclusions following diffuse brain injury in the pig. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58: 982-992, 1999.

Smith DH, Uryu K, Saatman KE, Trojanowski JQ, and McIntosh TK. Protein accumulation in traumatic brain injury. *Neuromolecular medicine* 4: 59-72, 2003.

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, and Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95: 29-39, 1998.

Tassin TC, Benavides DR, Plattner F, Nishi A, and Bibb JA. Regulation of ERK Kinase by MEK1 Kinase Inhibition in the Brain. *The Journal of biological chemistry* 290: 16319-16329, 2015.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, and Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62: 405-496, 2010.

Tsien JZ, Huerta PT, and Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87: 1327-1338, 1996.

Van Remmen H, Salvador C, Yang H, Huang TT, Epstein CJ, and Richardson A. Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Archives of biochemistry and biophysics* 363: 91-97, 1999.

Vergara C, and Ramirez BU. Age-dependent expression of the apamin-sensitive calcium-activated K⁺ channel in fast and slow rat skeletal muscle. *Experimental neurology* 146: 282-285, 1997.

von Bernhardt R, and Eugenin J. Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxidants & redox signaling* 16: 974-1031, 2012.

Wang Y, Briz V, Chishti A, Bi X, and Baudry M. Distinct roles for mu-calpain and m-calpain in synaptic NMDAR-mediated neuroprotection and extrasynaptic NMDAR-mediated neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33: 18880-18892, 2013.

Wang Y, Sun X, Ji K, Du L, Xu C, He N, Wang J, Liu Y, and Liu Q. Sirt3-mediated mitochondrial fission regulates the colorectal cancer stress response by modulating the Akt/PTEN signalling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 105: 1172-1182, 2018.

- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, and Bear MF.** Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313: 1093-1097, 2006.
- Witcher KG, Bray CE, Dziabis JE, McKim DB, Benner BN, Rowe RK, Kokiko-Cochran ON, Popovich PG, Lifshitz J, Eiferman DS, and Godbout JP.** Traumatic brain injury-induced neuronal damage in the somatosensory cortex causes formation of rod-shaped microglia that promote astrogliosis and persistent neuroinflammation. *Glia* 2018.
- Wolf MS, Bayir H, Kochanek PM, and Clark RSB.** The role of autophagy in acute brain injury: A state of flux? *Neurobiology of disease* 2018.
- Won S, Incontro S, Nicoll RA, and Roche KW.** PSD-95 stabilizes NMDA receptors by inducing the degradation of STEP61. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: E4736-4744, 2016.
- Xiong Y, Mahmood A, and Chopp M.** Animal models of traumatic brain injury. *Nature reviews Neuroscience* 14: 128-142, 2013.
- Xu F, Plummer MR, Len GW, Nakazawa T, Yamamoto T, Black IB, and Wu K.** Brain-derived neurotrophic factor rapidly increases NMDA receptor channel activity through Fyn-mediated phosphorylation. *Brain research* 1121: 22-34, 2006.
- Xu J, Chatterjee M, Baguley TD, Brouillette J, Kurup P, Ghosh D, Kanyo J, Zhang Y, Seyb K, Ononenyi C, Foscue E, Anderson GM, Gresack J, Cuny GD, Glicksman MA, Greengard P, Lam TT, Tautz L, Nairn AC, Ellman JA, and Lombroso PJ.** Inhibitor of the tyrosine phosphatase STEP reverses cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS biology* 12: e1001923, 2014.
- Xu J, Kurup P, Zhang Y, Goebel-Goody SM, Wu PH, Hawasli AH, Baum ML, Bibb JA, and Lombroso PJ.** Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 9330-9343, 2009.
- Xue B, Edwards MC, Mao LM, Guo ML, Jin DZ, Fibuch EE, and Wang JQ.** Rapid and sustained GluA1 S845 phosphorylation in synaptic and extrasynaptic locations in the rat forebrain following amphetamine administration. *Neurochemistry international* 64: 48-54, 2014.
- Yamadori T, Ishii Y, Homma S, Morishima Y, Kurishima K, Itoh K, Yamamoto M, Minami Y, Noguchi M, and Hizawa N.** Molecular mechanisms for the regulation of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small-cell lung cancers. *Oncogene* 31: 4768-4777, 2012.
- Yang ST, Hsiao IT, Hsieh CJ, Chiang YH, Yen TC, Chiu WT, Lin KJ, and Hu CJ.** Accumulation of amyloid in cognitive impairment after mild traumatic brain injury. *Journal of the neurological sciences* 349: 99-104, 2015.
- Yousuf MA, Tan C, Torres-Altora MI, Lu FM, Plautz E, Zhang S, Takahashi M, Hernandez A, Kernie SG, Plattner F, and Bibb JA.** Involvement of aberrant Cdk5/p25 activity in experimental traumatic brain injury. *Journal of neurochemistry* 2016.
- Yu W, Parakramaweera R, Teng S, Gowda M, Sharad Y, Thakker-Varia S, Alder J, and Sesti F.** Oxidation of KCNB1 Potassium Channels Causes Neurotoxicity and Cognitive Impairment in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36: 11084-11096, 2016.
- Zhang QG, Laird MD, Han D, Nguyen K, Scott E, Dong Y, Dhandapani KM, and Brann DW.** Critical role of NADPH oxidase in neuronal oxidative damage and microglia activation following traumatic brain injury. *PLoS one* 7: e34504, 2012.
- Zhang QG, Wu DN, Han D, and Zhang GY.** Critical role of PTEN in the coupling between PI3K/Akt and JNK1/2 signaling in ischemic brain injury. *FEBS Lett* 581: 495-505, 2007.
- Zhang S, Taghibiglou C, Girling K, Dong Z, Lin SZ, Lee W, Shyu WC, and Wang YT.** Critical role of increased PTEN nuclear translocation in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33: 7997-8008, 2013.

Zhang Y, Kurup P, Xu J, Carty N, Fernandez SM, Nygaard HB, Pittenger C, Greengard P, Strittmatter SM, Nairn AC, and Lombroso PJ. Genetic reduction of striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP) reverses cognitive and cellular deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 19014-19019, 2010.

Zhou X, da Li W, Yuan BL, Niu LJ, Yang XY, Zhou ZB, Chen XH, and Feng X. Lithium Treatment Prevents Apoptosis in Neonatal Rat Hippocampus Resulting from Sevoflurane Exposure. *Neurochemical research* 2016.

Zhou X, Ding Q, Chen Z, Yun H, and Wang H. Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function and neuronal excitotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 288: 24151-24159, 2013a.

Zhou X, Hollern D, Liao J, Andrechek E, and Wang H. NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell death & disease* 4: e560, 2013b.

Zu L, Shen Z, Wesley J, and Cai ZP. PTEN inhibitors cause a negative inotropic and chronotropic effect in mice. *European journal of pharmacology* 650: 298-302, 2011.