



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Rol protector de S-Alil-Cisteína contra los  
Oligómeros Solubles del Péptido  $\beta$ -Amiloide  
mediante la modulación de los niveles de  
IP<sub>3</sub>R y VDAC1**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas para optar al  
grado académico de Magíster en Neurobiología

Concepción, Chile

2023

Por: Robinson Ignacio Durán Arcos

Profesor guía: Jorge Fuentealba Arcos

## Índice

RESUMEN.....	10
Abstract.....	12
RESUMEN GRAFICO .....	14
1- INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Hipótesis amiloidogénica .....	20
1.2. Estrés del retículo endoplásmico en EA .....	25
1.3. Disfunción mitocondrial en la EA.....	32
1.4. S-Alil-cisteína como agente protector en la EA .....	36
2. Hipótesis .....	45
2.1. Objetivo general .....	45
2.2. Objetivos específicos .....	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
3.1 Cultivo de células PC-12 .....	47
3.2 Oligomerización de A $\beta$ .....	47
3.3 Ensayo de MTT.....	48
3.4 Viabilidad por LIVE/DEAD kit.....	49
3.5 Western Blot .....	50
3.6 Inmunocitoquímica .....	51

3.7	Medición del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	52
3.8	Análisis estadístico .....	53
4.	RESULTADOS .....	54
4.1.	Estudiar el efecto de SAC sobre la viabilidad celular, en modelos de toxicidad inducida por oligómeros solubles de A $\beta$ .....	54
4.2.	Efecto de SAC y A $\beta$ Os sobre los niveles de expresión de las proteínas IP $_3$ R y VDAC1 en células PC-12. ....	64
4.3.	Evaluar los efectos de SAC y A $\beta$ Os sobre los niveles de VDAC1 y el tamaño relativo de las mitocondrias .....	<del>69</del> 68
4.4	Evaluar potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	<del>74</del> 73
5.	DISCUSIÓN.....	<del>76</del> 75
6.	CONCLUSIONES.....	<del>89</del> 88
7.	AGRADECIMIENTOS (no personales, solo académicos).....	<del>90</del> 89
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	<del>91</del> 90

## Índice Figuras

Figura 1. Resumen gráfico .....	14
Figura 2. Procesamiento de APP.....	22
Figura 3. Origen del estrés del retículo endoplásmico y sus posibles efectos.....	31
Figura 4. Estructura química S-alil-cisteína.....	39
Figura 5. Efecto de S-alil-cisteína en la viabilidad celular en tratamientos de 24 horas.....	56
Figura 6. Efecto protector del cotratamiento de S-alil-cisteína sobre la toxicidad inducida por los A $\beta$ O $s$ .....	57
Figura 7. Efecto de S-alil-cisteína en la viabilidad celular en tratamientos de 48 horas.....	60
Figura 8 Efecto protector preventivo del pretratamiento de S-alil-cisteína sobre la toxicidad inducida por los A $\beta$ O $s$ .....	61

Figura 9. Efecto protector de S-alil-cisteína por Live/Dead Kit.....	63
Figura 10. Variaciones en la expresión de IP <sub>3</sub> R por tratamientos con S-alil-cisteína y AβOs.....	66
Figura 11. Variaciones en la expresión de VDAC1 por Western Blot debido a los tratamientos con S-alil-cisteína y AβOs.....	67
Figura 12. Variaciones en la expresión de VDAC1 por Inmunocitoquímica debido a los tratamientos con S-alil-cisteína y AβOs.....	70
Figura 13. Efectos de los tratamientos con S-alil-cisteína y AβOs sobre el tamaño relativo de las mitocondrias.....	72
Figura 14. Efecto de los tratamientos con S-alil-cisteína y AβOs sobre el potencial de membrana mitocondrial.....	74

## **ABREVIATURAS**

**EA:** Enfermedad de Alzheimer

**A $\beta$ Os:** Oligómeros solubles del péptido beta amiloide

**SAC:** S-alil-cisteína

**AGE:** Extracto de ajo envejecido

**IP<sub>3</sub>R:** Receptor de Inositol 1,4,5 Trifosfato

**VDAC1:** Canal de Aniones Dependiente de Voltaje 1

**LTP:** Potenciación a largo plazo

**A $\beta$ :** Péptido beta amiloide

**APP:** Proteína precursora amiloide

**NFT:** Ovillo neurofibrilares

**APP<sub>swe</sub>:** Proteína precursora amiloide mutante K670/M671

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**ATP:** Adenosina trifosfato

**SNC:** Sistema nervioso central

**Mnf1:** Mitofusina 1

**DRP1:** Proteína 1 relacionado con la dinamina

**SIRT1:** Sirtuina 1

**PGC-1 $\alpha$ :** Coactivador 1 $\alpha$  del receptor  $\gamma$  activado de proliferación de peroxisomas

**RE:** Retículo endoplásmico

**UPR:** Respuesta a proteínas mal plegadas

**APPs $\alpha$ :** Fragmento soluble de APP producido por  $\alpha$  secretasa

**AICD:** Dominio intracelular de proteína precursora amiloide

**BACE1:**  $\beta$ -secretasa

**APPs $\beta$ :** Fragmento soluble de APP producido por  $\beta$  secretasa

**A $\beta$ <sub>40</sub>:** Péptido beta amiloide de 40 aminoácidos

**A $\beta$ <sub>42</sub>:** Péptido beta amiloide de 42 aminoácidos

**DA:** Dopamina

**EGCG:** Galato de epigallocatequina

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**AMPA:** Acido  $\alpha$ .amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropionico

**MAMs:** Membranas de retículo endoplasmático asociadas a mitocondrias

**PERK:** Proteína quinasa activada por ARN (PRK) de doble función similar a la quinasa del retículo endoplásmico

**Bip:** Proteína de unión a inmunoglobulina

**IRE1 $\alpha$ :** Quinasa transmembrana/endoribonucleasa 1 $\alpha$  que requiere inositol

**VDACs:** Canales de aniones dependientes de voltaje

**STZ:** Estreptomicina

**SAM:** Ratones de senescencia acelerada

**BRL-3A:** Célula tipo fibroblasto aislada de hígado de rata

**SOD:** Superóxido dismutasa

**CAT:** Catalasa



**GPx:** Glutación peroxidasa

**GRx:** Glutaredoxina

**MCAO:** Oclusión de la arteria cerebral media

**FBS:** Suero bovino fetal

**HS:** Suero de caballo

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**PBS:** Buffer de fosfatos

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

**FCCP:** Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona

**TBS:** Solución salina tamponada con Tris

**mPTP:** Poro de transición mitocondrial

## RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, y para la cual no existe tratamiento efectivo. Se caracteriza por la muerte neuronal, y se ha postulado como principal agente neurotóxico a los oligómeros solubles del péptido beta amiloide ( $A\beta$ Os).

Esta tesis nos centramos en el estudio y evaluación del efecto protector de la S-alil-cisteína (SAC); una molécula de origen natural encontrada en el denominado ajo envejecido (AGE), para la cual se han descrito múltiples propiedades.

Se evaluó el efecto protector de SAC a la toxicidad amiloide. En primer lugar, evaluamos la pérdida de viabilidad en células PC-12 inducida por los  $A\beta$ Os ( $0,5\mu\text{M}$ , 24hrs), mediante la técnica de MTT y un kit denominado Live/Dead. Utilizando esta aproximación observamos que el pretratamiento de SAC por 24 horas ejerció un efecto protector frente a los  $A\beta$ Os en las concentraciones entre  $0,1\mu\text{M}$  y  $1\mu\text{M}$ . Posteriormente, se evaluaron los niveles de IP<sub>3</sub>R (Receptor de Inositol 1,4,5 Trifosfato) y VDAC1 (Canal de Aniones Dependiente de Voltaje 1) por medio de Western Blot e inmunocitoquímica, ya que estos canales se han involucrado en la dishomeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular

(Atakpa-Adaji and Ivanova 2023). Los resultados obtenidos para IP<sub>3</sub>R no fueron concluyentes, sin embargo, al evaluar VDAC1, pudimos determinar que SAC fue capaz de evitar el incremento de los niveles de esta proteína. Finalmente, se evaluó mediante inmunocitoquímica el tamaño de las mitocondrias utilizando como marcador de este organelo TOM20. Observamos que SAC logró prevenir el cambio estructural mitocondrial por los A $\beta$ Os, a las concentraciones de 0,5 y 1  $\mu$ M. Por último, se estudió la capacidad de SAC para evitar la disminución del potencial de membrana mitocondrial producto de A $\beta$ Os, por medio de la sonda comercial JC-1 se determinó que SAC fue efectivo para evitar la disminución del potencial de membrana mitocondrial.

Estos resultados sugieren que el pretratamiento con SAC ejerció un efecto protector contra los A $\beta$ Os, mediado por la modulación de los niveles de VDAC1. Además, previno el cambio en la morfología mitocondrial y la disminución del potencial de membrana mitocondrial, por lo tanto, es viable seguir explorando los efectos protectores de SAC frente a la toxicidad amiloide.

## **Abstract**

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder for which there is currently no effective treatment. It is characterized by neuronal death, and soluble beta-amyloid peptide oligomers (A $\beta$ O<sub>s</sub>) are postulated as the primary neurotoxic agents.

This thesis will focus on evaluating the protective effect of S-allyl cysteine (SAC), a naturally occurring molecule found in aged garlic extract (AGE), which has been described to possess multiple properties.

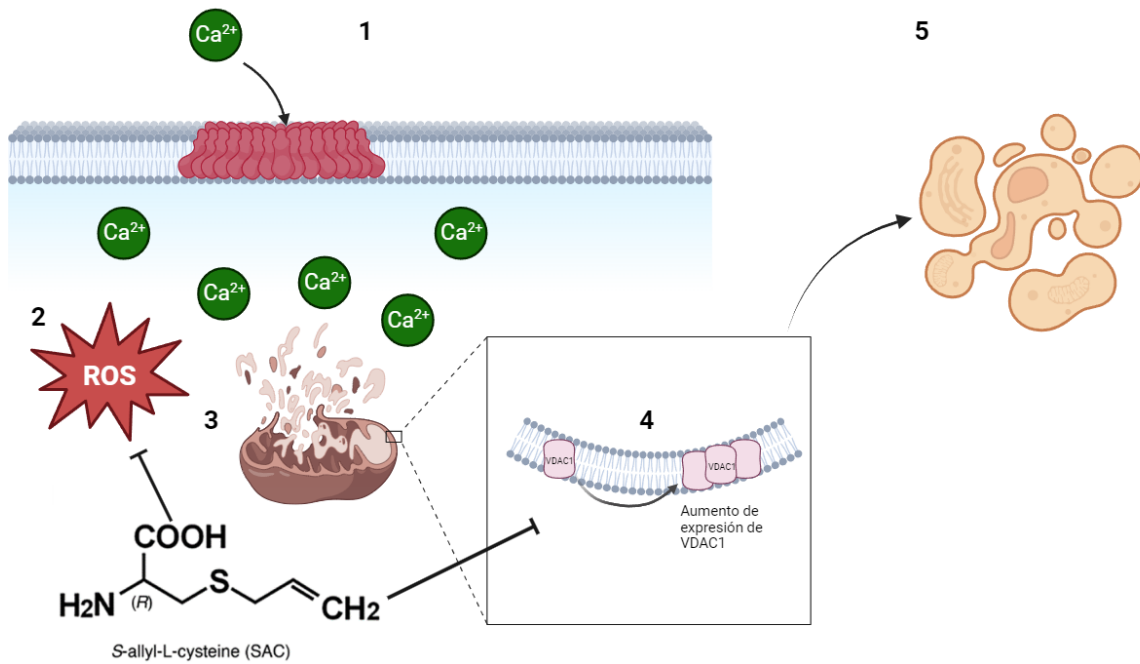
The protective effect of SAC against amyloid toxicity was assessed. Firstly, we evaluated the loss of viability in PC-12 cells induced by A $\beta$ O<sub>s</sub> (0.5  $\mu$ M, 24 hrs) using the MTT technique and a kit known as Live/Dead. Using this approach, we observed that pre-treatment with SAC for 24 hours exerted a protective effect against A $\beta$ O<sub>s</sub> at concentrations between 0.1  $\mu$ M and 1  $\mu$ M. Subsequently, the levels of IP3R (Inositol 1,4,5 Trisphosphate Receptor) and VDAC1 (Voltage-Dependent Anion Channel 1) were evaluated through Western Blot and immunocytochemistry, as these channels have been implicated in intracellular Ca<sup>2+</sup> dyshomeostasis (Atakpa-Adaji and Ivanova 2023). The results obtained for IP3R were inconclusive; however, when evaluating

VDAC1, we determined that SAC was capable of preventing the increase in the levels of this protein. Finally, mitochondrial size was assessed via immunocytochemistry using TOM20 as a marker for this organelle. We observed that SAC prevented the mitochondrial structural change induced by A $\beta$ O<sub>s</sub> at concentrations of 0.5 and 1  $\mu$ M.

Lastly, the ability of SAC to prevent the reduction in mitochondrial membrane potential induced by A $\beta$ O<sub>s</sub> was studied. Using the commercial probe JC-1, it was determined that SAC was effective in preventing the decrease in mitochondrial membrane potential.

These results suggest that pre-treatment with SAC exerted a protective effect against A $\beta$ O<sub>s</sub>, mediated by the modulation of VDAC1 levels. Furthermore, it prevented the change in mitochondrial morphology and the reduction in mitochondrial membrane potential. Therefore, it is feasible to continue exploring the protective effects of SAC against amyloid toxicity.

## RESUMEN GRAFICO



**Figura 1.** Modelo planteado del efecto de S-alil-cisteína protector preventivo contra la toxicidad inducida por los oligómeros solubles del péptido beta amiloide. **1)** Los AβO inducen un poro en la membrana plasmática de las células, que permite el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio intracelular, **2)** Se produce un incremento de las especies reactivas del oxígeno, **3)** Las mitocondrias son dañadas por el estrés oxidativo, desencadenando en mitocondrias disfuncionales, **4)** Aumento en la expresión de VDAC1, **5)** Muerte de las células. Se propone que SAC es capaz de evitar este incremento en las especies reactivas del oxígeno y de esta forma protegiendo a las mitocondrias, lo que desencadena en una disminución en la muerte celular.

## 1- INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, y se encuentra clasificada dentro del grupo de las demencias, siendo la que tiene la mayor incidencia en todo el mundo, representando aproximadamente el 70% de los casos ('2021 Alzheimer's disease facts and figures' 2021). El número de personas diagnosticadas con demencia continúa creciendo, y se espera que para el año 2050 (Scheltens et al. 2016), la cifra de pacientes con EA sea aproximadamente de 152 millones de personas (Collaborators 2022). En la actualidad no se dispone de un tratamiento efectivo para esta patología, por esta razón resultan fundamentales las investigaciones que buscan una posible alternativa terapéutica.

El envejecimiento es un proceso fisiológico multifactorial complejo, caracterizado por un desgaste del funcionamiento fisiológico, en conjunto con un incremento en la vulnerabilidad del cuerpo contra organismos patógenos y factores ambientales (Dabravolski et al. 2022). Esto es relevante en el caso de la EA, porque precisamente el riesgo de padecer esta enfermedad incrementa con la edad (Reitz et al. 2023).

Entre las principales características de esta enfermedad se presentan cambios en el comportamiento, afasia y una pérdida de memoria de forma

progresiva que genera dependencia en los pacientes (Ai et al. 2021). Estos síntomas derivan de una pérdida de la plasticidad sináptica focalizada en el hipocampo (Fukumoto et al. 2014), lo que luego evoluciona y afecta otras áreas del cerebro, como la corteza entorrinal lateral y motora (Young 2020). El daño en la corteza y en el hipocampo conllevan una disminución en la potenciación a largo plazo (LTP) y un deterioro cognitivo progresivo (Ferreira et al. 2015; Ricciarelli and Fedele 2017).

Existen diversos eventos característicos en la fisiopatología de la EA, como la pérdida de la función mitocondrial (Jeong et al. 2022), la disminución de la autofagia y el clearance lisosomal (Xu et al. 2022), la neuroinflamación, hipoxia (Hambali et al. 2021) y daño oxidativo (Yoshida et al. 2022). Sin embargo, el eje más estudiado son los agregados proteicos extracelulares e intracelulares, biomarcadores de la EA (Koopman, Ferrari, and Rudiger 2022). Específicamente, la acumulación de péptido beta amiloide ( $A\beta$ ) en placas seniles y los agregados intracelulares de la proteína Tau hiperfosforilada, en forma de ovillos neurofibrilares (NFT) (Mukherjee et al. 2021). Cabe destacar que los NFT y las placas amiloides son los marcadores histopatológicos clásicos utilizados para el diagnóstico *post mortem* en cerebros de pacientes con EA (Winder et al. 2022).



A $\beta$  se ha estudiado como el principal agente patológico de la EA, bajo la denominada hipótesis amiloidogénica. Este péptido proviene del clivaje de la proteína precursora amiloide (APP); proteína transmembrana que se expresa en diversos tejidos, principalmente el sistema nervioso central (Haass et al. 2012), pero de igual manera lo hace en el sistema nervioso periférico y en otros órganos (van der Kant and Goldstein 2015). Si bien esta proteína se identificó hace más de 40 años su función fisiológica no está totalmente clara, pero si se ha demostrado se ha relacionado su importancia en las etapas de desarrollo (Dunot et al. 2023). Se ha descrito el caso de un infante de 20 meses de edad con una mutación homocigota en el N-terminal de APP, lo que hace que esta proteína no se exprese y el paciente presenta problemas en el desarrollo, microcefalia, convulsiones y malformación del cuerpo calloso en el cerebro (Klein et al. 2016), lo cual refuerza que, aunque no se sepa claramente su función fisiológica, claramente parece ser fundamental para un correcto desarrollo del sistema nervioso central.

APP es una glicoproteína (Muller, Deller, and Korte 2017) que forma parte de una familia compuesta por otras 2 proteínas con una alta homología de secuencia, se presentan 3 isoformas de APP en mamíferos, siendo APP695 la más estudiada y la que principalmente se expresa en neuronas (Dunot et al.

2023), además está incrementada tanto en las sinapsis excitatorias como inhibitorias (Klein et al. 2016). El dominio C-terminal de APP (AICD) se ha descrito que puede interactuar con diversas proteínas transductoras de señales, por otra parte, este dominio es importante para el transporte y endocitosis de APP (Muller, Deller, and Korte 2017). Como APP no posee actividad enzimática y, tanto los dominios extra e intracelulares están involucrados en funciones biológicas, se ha propuesto que APP vincula señales extracelulares, como pueden ser unión de ligandos, a diversos tipos de señalización intracelular, como a través de interacción con proteínas de andamiaje, regulación del  $\text{Ca}^{+2}$ , interacción con el citoesqueleto y con proteínas quinasas (Muller, Deller, and Korte 2017).

Se ha descrito que la sobreexpresión de una mutante de APP ( $\text{APP}_{\text{swe}}$ ) en células PC-12 produce un incremento en los niveles de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, elevando los niveles de ROS y disminuyendo la producción de ATP (Mohamed Asik et al. 2021). La sobreproducción de ROS observada en pacientes con EA resulta en pérdida de función mitocondrial, pérdida de la homeostasis celular, incremento de liberación de factores inflamatorios y un incremento en la acumulación de péptido  $\text{A}\beta$  y p-Tau (Zhou et al. 2023). Se estableció el sistema nervioso central (SNC) como el sistema

con mayor susceptibilidad a este fenómeno, debido a su alta demanda de oxígeno para su funcionamiento (Ebrahimi and Golestani 2022). Por lo anterior, se ha postulado el desbalance de la homeostasis del péptido A $\beta$  como una de las hipótesis etiológicas que contribuye a explicar el inicio de la enfermedad (Lloret et al. 2021).

En la teoría amiloidogénica se responsabiliza al péptido A $\beta$  como el inductor del estrés oxidativo mitocondrial, por ser causante de cambios morfológicos en las mitocondrias, afectando los niveles de proteínas claves en la dinámica mitocondrial como Mfn1, DRP1, SIRT1 y PGC-1 $\alpha$ , lo cual conduce a la pérdida de la función mitocondrial (Panes et al. 2020). En línea con esta perspectiva, la terapia antioxidante ha emergido como una estrategia prometedora en el tratamiento de la EA. La aplicación de terapias antioxidantes busca contrarrestar los efectos nocivos del estrés oxidativo en las mitocondrias y otras estructuras celulares. Al reducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica, se espera preservar la función mitocondrial y, por ende, mantener la viabilidad neuronal y cognitiva. (Yin et al. 2022).

Por otra parte, se ha descrito que los depósitos de A $\beta$  y tau inducen un fenómeno denominado estrés del retículo endoplásmico (estrés RE) y la respuesta adaptativa llamada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

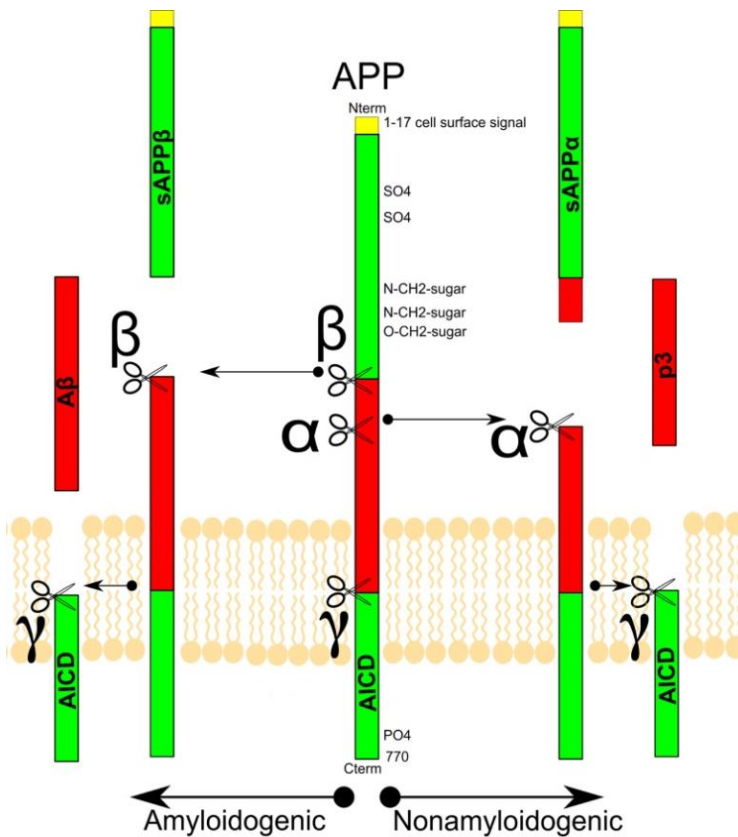
(Ajooolabady et al. 2022). Se ha asociado una sobreactuación de la UPR con los eventos de muerte neuronal (Ajooolabady et al. 2021). Se ha establecido que compuestos derivados de origen natural que sean capaces de aliviar los fenómenos de estrés RE podrían servir para potenciales acciones terapéuticas enfocadas en la respuesta UPR en la EA (Ajooolabady et al. 2022). Como Berberina, que es un alcaloide natural presente en las plantas del género *Berberis* que mostro ser capaz de aliviar déficits de memoria, daño neuronal, y fue capaz de reprimir la transcripción de genes asociados con el estrés del RE en un modelo murino de diabetes tipo 2 y Alzheimer (Xuan et al. 2020).

### **1.1. Hipótesis amiloidogénica**

La etiología de la EA aún no se comprende completamente; sin embargo, la evidencia sugiere que los eventos patológicos característicos de la EA son el mal plegamiento, agregación y deposición patológica del péptido A $\beta$  y de Tau en el cerebro (Moreno-Gonzalez et al. 2021). No obstante, varios estudios afirman que el principal causante de la fisiopatología de la EA son los oligómeros solubles del péptido beta amiloide (A $\beta$ Os), que han sido catalogados como el principal agente tóxico (Habiba et al. 2020).

A $\beta$  pasa por varios estados de agregación hasta alcanzar las denominadas placas seniles, desde los pequeños monómeros, los A $\beta$ O, protofibrillas, y las fibrillas que forman finalmente las placas neuríticas (Ono 2018). A $\beta$  se origina desde la proteína precursora amiloide (APP), que participa en la regulación de la sinapsis, la plasticidad neuronal y la exportación de hierro (Chen et al. 2013). APP puede ser procesada por dos vías, una vía no amiloidogénica que ocurre principalmente en la membrana de las células, en la cual participan las enzimas  $\alpha$  y  $\gamma$  secretasa para producir el fragmento APP soluble alfa (APP $\alpha$ ), el dominio intracelular amiloide (AICD) y el péptido p3. Mientras que la vía amiloidogénica (productora del péptido A $\beta$ ), se lleva a cabo principalmente en endosomas tempranos (Small and Gandy 2006), donde se ve favorecida su reacción debido a que se encuentra un pH más ácido que el citoplasmático (Long and Holtzman 2019). APP sufre un clivaje por dos enzimas, primero por  $\beta$ -secretasa (BACE1) y luego por  $\gamma$ -secretasa, para generar el fragmento APP soluble beta (APP $\beta$ ), AICD y A $\beta$ . La enzima  $\gamma$ -secretasa produce A $\beta$  de distintas longitudes, siendo las especies más comunes las de 40 y 42 aminoácidos (A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>, respectivamente) (Dunys, Valverde, and Checler 2018). A $\beta$ <sub>40</sub> es generada en mayor proporción por las neuronas, pero A $\beta$ <sub>42</sub>, gracias a 2 residuos hidrofóbicos en el C-terminal, presenta una mayor

tendencia a estados de agregación superior (Walker 2020; Holtzman, Morris, and Goate 2011). En la figura 1 se puede observar un esquema que resumen el procesamiento de la proteína APP.



**Figura 2.** Procesamiento de APP (amiloidogénico y no amiloidogénico). Modificado (Arbor, LaFontaine, and Cumbay 2016). vía amiloidogénica (a la izquierda), clivaje de la proteína APP por  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, conduce a la formación del péptido  $A\beta$ , AICD y  $sAPP\beta$ . vía no amiloidogénica (a la derecha), la escisión de la proteína APP por la  $\alpha$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, no forma al péptido  $A\beta$ , pero si lleva a cabo la formación del péptido p3, AICD y  $sAPP\alpha$ .

A $\beta$ O<sub>s</sub> se acumulan de forma temprana en la EA y se ha determinado de forma experimental que pueden causar disfunción cognitiva y pérdida de memoria en la EA (Cline et al. 2019). Se ha estudiado la capacidad de diferentes compuestos para desagregar las placas amiloides, enfocándose en las fibrillas y de esta forma disminuir la citotoxicidad de A $\beta$  (Kaku, Tsukakoshi, and Ikebukuro 2021). Entre los compuestos utilizados se encuentran dopamina (DA) y epigallocatequina-3-galato (EGCG); sin embargo, pese a que estas moléculas desagregan las fibrillas, se observó un incremento en la citotoxicidad de A $\beta$ . Esto refuerza la idea de que los oligómeros solubles presentan un nivel mayor de toxicidad (Kaku, Tsukakoshi, and Ikebukuro 2021), dado que al desagregar las fibrillas y producir A $\beta$ O<sub>s</sub> se observó una potenciación del efecto tóxico.

Específicamente los A $\beta$ O<sub>s</sub> se han caracterizados por su pequeño tamaño y solubilidad, y exhiben una mayor concentración en las proximidades de las placas amiloides. Estos A $\beta$ O<sub>s</sub> han sido señalados como los principales agentes responsables del impacto tóxico atribuido a este péptido (Walker 2020), debido a que, entre otros efectos, tienen la particularidad de establecer estructuras tipo poro en las membranas de las neuronas, conduciendo a una pérdida de homeostasis del Ca<sup>+2</sup> (Pannuzzo 2022). Se ha descrito que los A $\beta$ O<sub>s</sub> producen

un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, lo que activa las respuestas de estrés mitocondrial y del retículo endoplásmico, conduciendo finalmente a la apoptosis (Arbor, LaFontaine, and Cumbay 2016).

Los poros formados por los A $\beta$ O $s$  pueden estar compuestos por 4 a 5 oligómeros de A $\beta$  (Jang et al. 2010). Por medio de simulaciones computacionales se sugirió que el diámetro interno de este poro es de aproximadamente 1.6nm (Jang et al. 2010), donde se ha descrito que presenta una permeabilidad preferente de  $\text{Ca}^{+2}$  y potasio sobre la de sodio (Matthes and de Groot 2023). Otro posible mecanismo de los A $\beta$ O $s$  es su capacidad de interactuar con diferentes proteínas de membrana encargadas del transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  como los receptores de NMDA, PrPc y AMPA entre otros (Chami and Checler 2020).

Por lo tanto, la formación de poros y la alteración del equilibrio del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular por los A $\beta$ O $s$  desencadenan eventos moleculares que contribuyen al estrés mitocondrial y del retículo endoplasmático, desencadenando finalmente el proceso apoptótico en las neuronas afectadas por la EA.



## 1.2. Estrés del retículo endoplásmico en EA

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo que regula la síntesis y el tráfico de proteínas, la respuesta de las células a estrés, los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  y los cambios en la glicosilación proteica (Gao and Xu 2021). Si bien el retículo endoplásmico es el mayor reservorio de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, este presenta contactos con otros organelos entre los que destacan las mitocondrias (Callens, Loncke, and Bultynck 2022). El retículo endoplásmico y las mitocondrias son organelos móviles que pueden localizarse para facilitar la interacción entre ellos (Lackner and Voeltz 2017), esta interacción se denomina MAMs (del inglés *mitochondria associated membranes*) y se encargan de regular procesos como el metabolismo mitocondrial, la producción de energía, la respuesta al estrés del RE, síntesis de lípidos y señalización apoptótica (Pinton 2018).

El estrés del RE produce una desregulación funcional, cambios estructurales en los circuitos nerviosos en la etapa de desarrollo y en los sistemas nerviosos maduros, apoptosis neuronal y excitotoxicidad, por lo cual tiene un papel importante en las enfermedades neurodegenerativas, como la EA (Mattson et al. 2000). Este fenómeno interfiere con funciones centrales como lo

es el plegamiento y síntesis de nuevas proteínas de membrana y secretoras (Paschen and Mengesdorf 2005).

Han sido descritos distintos desencadenantes de estrés del RE, entre los que reportan mutaciones genéticas, como en el gen SOD1, que se relaciona con esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Ghemrawi and Khair 2020), también se ha relacionado la mutación de Alzheimer familiar PS1 con una mayor vulnerabilidad en contra del estrés del RE (Katayama et al. 2004), envejecimiento neuronal, estrés oxidativo y desregulación del  $\text{Ca}^{+2}$  (Ghemrawi and Khair 2020). En este contexto, se ha documentado que el  $\text{IP}_3\text{R}$  (Receptor de Inositol 1,4,5 Trifosfato) desempeña un papel crucial, actuando como el principal mediador entre el estrés del RE y el péptido  $\text{A}\beta$  (Uddin et al. 2020).

En estudios realizados en tejidos cerebrales post mortem de pacientes con EA y en modelos animales de la enfermedad, se ha observado un aumento en la fosforilación de PERK y Bip (Buchanan et al. 2020; Wu et al. 2021), que son dos proteínas del RE, por su parte PERK (Proteína quinasa activada por ARN PRK de doble función similar a la quinasa del retículo endoplásmico es una enzima que juega un papel crucial en la respuesta del estrés del RE (Buchanan et al. 2020), mientras que Bip (Proteína de Unión a Inmunoglobulina) es una chaperona molecular también conocida como GRP78 que participa en el

plegamiento y la homeostasis de las proteínas en el RE (Wu et al. 2021). Lo que nos indica que cuando existe la EA se relaciona en algún punto con la aparición de estrés del RE, por ende, estos hallazgos refuerzan la noción previamente mencionada de una estrecha relación entre el péptido A $\beta$  y el estrés del RE, ya que en los modelos del estudio mencionado existe un incremento tanto de PERK como de Bip, respaldando la idea de que la presencia de esta proteína característica de la EA puede estar íntimamente vinculada a la perturbación en la homeostasis del RE (Wu et al. 2021; Buchanan et al. 2020).

En un intento de las células para contrarrestar el estrés del RE, se desencadena un mecanismo de protección denominado respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés), las cuales son un mecanismo de limpieza de proteínas no-lisosomal, que tiene el potencial para inducir la muerte celular en caso de no reestablecer la homeostasis (Viana, Nunes, and Rodrigues 2012). Por otra parte, al comenzar el estrés del retículo endoplásmico hay un incremento de las interacciones entre el RE y las mitocondrias como un mecanismo adaptativo en busca de la supervivencia celular (Bravo-Sagua et al. 2019), esto debido a que estas interacciones permiten el intercambio de Ca<sup>+2</sup>, lo cual regula la síntesis energética que ocurre en las mitocondrias (Bravo-Sagua

et al. 2019), sin embargo, también puede participar en iniciar la apoptosis (Boehning, Patterson, and Snyder 2004).

El estrés del retículo endoplásmico participa en una gran variedad de funciones fisiológicas normales como el plegamiento de proteínas, el control de calidad de estas y el correcto balance de calcio en las células, pero una variedad de diferentes moléculas puede interferir con el correcto funcionamiento del RE y conducir a un estrés descontrolado (Nagar et al. 2023). Bajo condiciones fisiológicas al iniciarse el estrés RE conlleva a la activación de un conjunto de señales denominadas UPR, que buscan reparar las proteínas mal plegadas, sin embargo, si el estrés RE está activo de forma crónica la vía UPR falla y se ha visto que puede conducir a diferentes enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, esclerosis múltiple y EA (Teli et al. 2023).

La progresión de la EA se categoriza de acuerdo con el avance de los ovillos neurofibrilares en diferentes regiones del cerebro bajo lo que se denomina estadios de Braak (Duran-Aniotz et al. 2017). Se ha observado que en los estadios de Braak más avanzados de la enfermedad, existe un mayor nivel de activación de IRE1 $\alpha$ , lo que se ve reflejado en un aumento de su fosforilación. IRE1 $\alpha$  es una proteína censora y efectora de la señal del estrés RE (Ajoalabady et al. 2022).

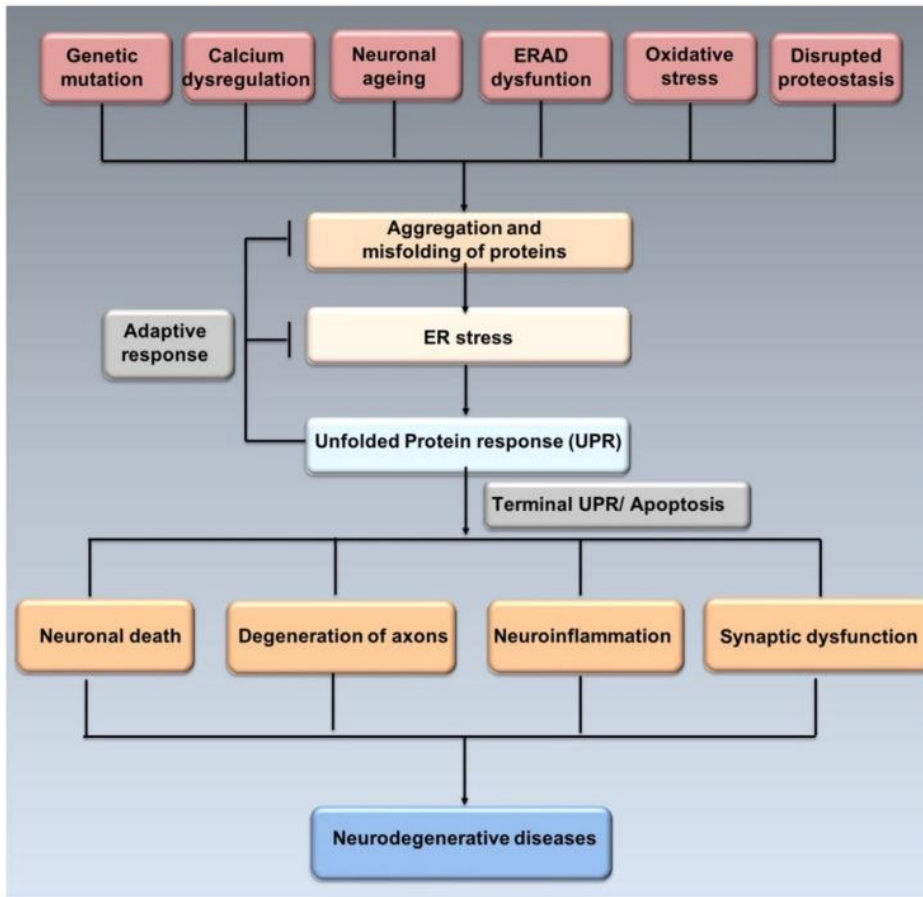
Se ha descrito que  $A\beta$  es capaz de interactuar con proteínas relacionadas con la homeostasis del  $Ca^{+2}$ , específicamente proteínas encargadas del transporte de este ion en la membrana plasmática y en otros organelos como el retículo endoplásmico, el cual es el principal reservorio de  $Ca^{+2}$  intracelular. Dentro de estas proteínas se encuentran los  $IP_3R$ , que además de su interacción directa, aumenta su expresión cuando se induce la sobreexpresión de APP, lo que favorece el fenómeno de hiperexcitabilidad y progresión de la EA (Shao et al. 2022).

Como se mencionó anteriormente, la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  es una de las causas del estrés del retículo endoplásmico (Zhao and Ackerman 2006) y se ha explorado la alternativa de inhibir al receptor  $IP_3$  y de esta forma evitar el incremento de  $Ca^{+2}$  citoplasmático. Para esto se utilizó un antagonista del receptor  $IP_3$ , denominado Xestospongin C, administrada mediante inyección intracerebroventricular a ratones APP/PS1, que consiguió efectos neuroprotectores y mejoró los comportamientos cognitivos de estos animales (Wang et al. 2019), lo que muestra lo efectivo que podría llegar a ser el mantener inhibido este canal o disminuir su expresión.

El  $Ca^{+2}$  intracelular tiene un rol muy importante actuando como segundo mensajero y regulando múltiples funciones, entre las que destaca la liberación

de neurotransmisores (Adeoye et al. 2022) y plasticidad a corto plazo (Zucker and Regehr 2002). Por lo tanto, se espera que cambios locales o a nivel sistémico en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  puedan afectar la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal (Zucker and Regehr 2002).

La evidencia presentada esclarece cómo la inducción del estrés en el RE puede originarse tanto por una excesiva acumulación de iones de calcio como por la presencia de los A $\beta$ Os. Esta interacción puede potenciar la instigación del estrés del RE mediante el aumento en la concentración de calcio en el interior celular y, por ende, la sobreexpresión de los receptores de inositol trisfosfato (IP<sub>3</sub>Rs), junto con otras proteínas que mantienen una conexión directa con los A $\beta$ Os. En la figura 3, se presenta un cuadro de cómo se puede originar el estrés del RE y como puede conducir a diversas enfermedades neurodegenerativas.



**Figura 3.** Como se origina el estrés del retículo endoplásmico y en que se desencadena (Ghemrawi and Khair 2020). El estrés del RE puede originarse a partir de diferentes factores como pueden ser mutaciones genéticas, desregulación del  $\text{Ca}^{+2}$ , incremento del estrés oxidativo entre otras, lo cual provoca un mal plegamiento de proteínas en el lumen del retículo que si no es corregido a tiempo por las células, estas sufren de degeneración axonal, neuroinflamación y finalmente la muerte de las neuronas, conduciendo finalmente a diversas enfermedades neurodegenerativas (Ghemrawi and Khair 2020).

### 1.3. Disfunción mitocondrial en la EA

La señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental para el correcto funcionamiento de las neuronas y la correcta comunicación por medio de las sinapsis, debido a la evidencia de que este ion es fundamental para regular tanto las sinapsis excitatorias como inhibitorias (Chapman, Nuwer, and Jacob 2022). La desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se ha implicado en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA (Ryan, Ashkavand, and Norman 2020).

Estudios anteriores han evidenciado que las alteraciones en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  pueden comprometer la homeostasis mitocondrial, precipitando una cascada de eventos moleculares que contribuyen a la neurodegeneración característica de esta enfermedad (Ryan, Ashkavand, and Norman 2020). Las fallas en el funcionamiento de las mitocondrias se han descrito como un evento temprano dentro de la patología de la EA, que se puede estudiar por una disminución del metabolismo energético, la falla en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  y el incremento de ROS (Shoshan-Barmatz et al. 2018). La mayor parte del ATP neuronal es producida en las mitocondrias y las neuronas ocupan esta importante molécula energética para generar los gradientes iónicos necesarios para la transmisión sináptica y mediante bombas de iones (Harris, Jolivet, and Attwell 2012). Las mitocondrias se localizan predominantemente en las sinapsis



para satisfacer la alta demanda energética (Harris, Jolivet, and Attwell 2012), por ende, son necesarias para el mantenimiento de la homeostasis intracelular.

Nuestro grupo de investigación demostró que el tratamiento con A $\beta$ Os induce una disfunción mitocondrial en neuronas hipocampales, ya que se observa una disminución del ATP disponible en el citoplasma y una disminución del potencial de membrana de las mitocondrias (Fuentealba et al. 2011). De igual manera, nuestro grupo de investigación demostró que los tratamientos con A $\beta$ Os producen cambios en el tamaño y distribución de las mitocondrias, lo cual se relaciona con alteraciones en la proteína encargada de la dinámica mitocondrial de fisión DRP1 (Panes et al. 2020), lo cual se puede relacionar tanto con un incremento de ROS como el desequilibrio del Ca<sup>+2</sup>.

En este contexto, nuestro grupo de investigación y otros grupos han postulado el rol de la comunicación RE-mitocondria en el mantenimiento de la homeostasis del Ca<sup>+2</sup> mediante las MAMs (Ryan, Ashkavand, and Norman 2020), como se mencionó anteriormente las MAMs son zonas de mayor cercanía entre el RE y las mitocondrias menores a 25nm, que existen con el fin de ayudar a regular el metabolismo mitocondrial, la transferencia de Ca<sup>+2</sup>, la producción de energía, la respuesta al estrés del RE, síntesis de lípidos y señalización apoptótica (Pinton 2018). IP<sub>3</sub>R , la proteína regulada por glucosa

75 (GRP75) y VDAC1 en la membrana externa de las mitocondrias, son componentes canónicos en la transferencia de calcio en las interacciones retículo/mitocondrias (Atakpa-Adaji and Ivanova 2023).

Existen 3 isoformas de VDACS, siendo VDAC1 la más abundante a nivel del SNC, y la de mayor participación en la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  (Verma et al. 2022). VDAC1 regula las funciones energéticas actuando como un mediador entre la mitocondria y el resto de la célula, además de estar involucrado en procesos como el estado redox de las mitocondrias y el transporte de colesterol (Shoshan-Barmatz et al. 2018). Estos canales regulan la entrada y salida de una variedad de iones y metabolitos en las mitocondrias, además de ser responsables de la recaptura de  $\text{Ca}^{+2}$  en estos organelos (Ham et al. 2020).

En condiciones de estrés, VDAC1 puede aumentar su expresión y oligomerización a nivel mitocondrial, formando un canal no selectivo en la membrana de las mitocondrias que posibilitan la salida de proteínas proapoptóticas hacia el citosol (Shoshan-Barmatz, De, and Meir 2017). Tratamientos con A $\beta$ Os en cultivos de neuronas corticales generan una sobreexpresión de VDAC1, favoreciendo la muerte neuronal (Verma et al. 2022) y produciendo una sobrecarga de  $\text{Ca}^{+2}$  en las mitocondrias (Abeti et al. 2016), lo que conduce a una despolarización de este organelo que se relaciona

con una señalización temprana de muerte celular (Abramov, Canevari, and Duchen 2004).

Se ha observado un incremento en los niveles de VDAC1 en cerebro post-mortem de pacientes con EA (Manczak and Reddy 2012), en modelos animales de la EA (Cuadrado-Tejedor et al. 2011) y otros modelos de enfermedades neurodegenerativas (Bueno et al. 2015). Los altos niveles de VDAC1 que se han determinado en muestras de cerebros post-mortem de pacientes con EA y en ratones transgénicos para APP, apoyan la hipótesis de la relación de esta proteína con la muerte de las neuronas en la EA (Shoshan-Barmatz et al. 2018). Por esta razón, es posible explorar una alternativa farmacológica para la EA, a través de la disminución en la expresión de VDAC1, con el fin de contrarrestar el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  y así evitar la disfunción mitocondrial y la consecuente muerte neuronal.

#### **1.4. S-Alil-cisteína como agente protector en la EA**

En la actualidad, la EA aún no tiene cura, por lo cual, es de suma importancia explorar nuevas alternativas terapéuticas. En este contexto, los compuestos de origen natural han demostrado tener propiedades interesantes para disminuir el avance de esta enfermedad. Se han estudiado mezclas y extractos de diferente origen, demostrando su capacidad neuroprotectora en estudios preclínicos y/o clínicos de EA (Chen et al. 2021).

Las fuentes naturales de moléculas, como plantas, animales y microorganismos terrestres o marinos pueden otorgar una amplia variedad de compuestos bioactivos con complejas estructuras y novedosas propiedades farmacológicas (Yuan et al. 2016). Dos de los principales fármacos usados en pacientes con EA tienen origen natural, el inhibidor de colinesterasa galantamina, que es un alcaloide (Scott and Goa 2000) y la rivastigmina, que es un derivado semisintético de un producto natural denominado fisostigmina (Kumar 2006).

Se ha demostrado que los compuestos naturales pueden ejercer una actividad neuroprotectora a través de diferentes mecanismos, como antioxidantes, antiinflamatorios, antiagregación de A $\beta$ , y pueden potenciar la neurotransmisión colinérgica (Chen et al. 2021). Por lo que se especula que el

inicio y la progresión de la EA podría ralentizarse o incluso prevenirse con el consumo de productos naturales que actúen sobre múltiples dianas patológicas (Venkatesan, Ji, and Kim 2015).

Un compuesto natural con interesantes propiedades bioactivas es la S-alil-cisteína (SAC). SAC es el principal compuesto organosulfurado o tiólico del ajo negro o envejecido (AGE) (Kosuge 2020). El ajo negro es un ajo común de la especie *Allium sativum* sometido a un proceso de envejecimiento denominado reacción de Millard (Ahmed and Wang 2021). Este proceso consiste en mantener el ajo con temperaturas entre 60-90°C y con una humedad relativa entre el 80-95% (78), por un periodo de 14 a 30 días (Onozato et al. 2023). En la Figura 4 se puede observar la estructura química de SAC, que muestra el característico átomo de azufre que lo define como un compuesto organosulfurado y al que se responsabiliza de las propiedades antioxidantes.

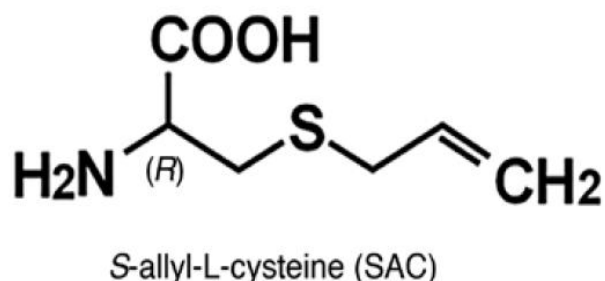
El desagradable olor particular del ajo fresco se convierte en un olor suavemente dulce, con suave textura y sabor dulce durante esta reacción (Amagase et al. 2001). Además, no solo se modifica los nutrientes y atributos sensoriales del ajo, sino que también mejora su bioactividad (Ahmed and Wang 2021). Este incremento en la bioactividad del ajo envejecido en comparación

con el ajo fresco se atribuye a cambios en sus propiedades fisicoquímicas (Kimura et al. 2017).

Compuestos inestables como la alicina desaparecen y se transforman en una variedad de compuestos organosulfurados ('Recent Advances on the Nutritional Effects Associated with the Use of Garlic as a Supplement. November 15-17, 1998. Newport Beach, California, USA. Proceedings' 2001). El efecto beneficioso del ajo envejecido se asocia en gran medida a la presencia de sustancias bioactivas como estos compuestos organosulfurados y polifenoles (Ahmed and Wang 2021). Varios estudios han reportado que AGE ejerce actividad antioxidante, antialérgica, antiinflamatoria, anticancerígena (Kimura et al. 2017) y neuroprotectora (Ahmed and Wang 2021). Estos efectos se atribuyen a una variedad de compuestos obtenidos durante la reacción, entre los que destaca SAC.

SAC ha mostrado poseer diversas propiedades bioactivas, tanto en modelos celulares como *in vivo*, que involucran un amplio espectro de efectos como agente antioxidante, modulador de la actividad redox, antiinflamatorio, antiapoptótico (Abramov, Canevari, and Duchon 2004), anticancerígeno (Cuadrado-Tejedor et al. 2011) y antihepatotóxicos (Bueno et al. 2015), además de combatir la diabetes en un modelo animal de esta patología inducida por

estreptozocina (STZ) (Smilansky et al. 2015) y tratar la hipercolesterolemia (Manczak and Reddy 2012).



**Figura 4.** Estructura química de SAC (Kosuge 2020).

Se demostró previamente que SAC podía ejercer una protección contra la muerte celular inducida por A $\beta$  en células PC-12 diferenciadas, a una concentración de 1  $\mu$ M de A $\beta$ 1-40 sin oligomerizar (Ito et al. 2003). Este efecto se atribuyó a la inhibición de las calpaínas, ya que al evaluar su actividad, se observó que disminuía en presencia de SAC (Imai et al. 2014), se postula que podría deberse a la posible unión de SAC al sitio de unión a Ca<sup>+2</sup> de las calpaínas, bloqueando así su sitio de activación (Kosuge 2020).

Además, se ha reportado que el consumo dietético diario en bajas dosis de SAC (40 mg/kg), disminuye los déficits de aprendizaje y los problemas relacionados con la consolidación de la memoria en un modelo *in vivo* de ratones de senescencia acelerada (SAM) (Nishiyama et al. 2001). También se

ha demostrado que el incremento de actividad de la caspasa-12 inducido por A $\beta$  es revertido cuando se administra SAC 1 $\mu$ M (Scott and Goa 2000). Al administrar en la dieta un 2% de un extracto de AGE o SAC (20 mg/kg) por 4 meses a los ratones transgénicos de EA Tg2576, se observó una disminución en la inmunoreactividad de las placas amiloides y de p-Tau (Chauhan 2006).

Se ha estudiado el efecto que tiene SAC como un represor del estrés del retículo endoplásmico y por consiguiente su capacidad para recuperar la viabilidad en células BRL-3A, una línea celular de hígado de rata. Se probó que un pretratamiento con SAC (50 $\mu$ M) antes de la exposición a indometacina, un antiinflamatorio no esterooidal, relacionado con el aumento de ROS e inducción del estrés reticular, provocó una disminución en la pérdida de viabilidad celular en comparación con las células sin el pretratamiento. Interesantemente, SAC fue capaz de inhibir el estrés reticular inducido por indometacina, al medir la activación de una vía UPR denominada PERK (Venkatesan, Ji, and Kim 2015). Lo que nos indica que SAC podría evitar la muerte celular inducida por A $\beta$ Os por diferentes mecanismos, pero de los cuales ninguno está completamente claro.



De igual manera una investigación sobre los efectos de pretratamientos con diferentes fitocomponentes, es decir, compuestos que se encuentran en diferentes tipos de vegetales, entre los que se encontraba SAC, se describió que fue capaz de evitar parte de la pérdida de viabilidad celular en cultivos de neuronas hipocampales, ante tratamientos con alta concentración de glucosa y  $A\beta_{1-42}$  0,5 $\mu$ M por 24 horas. Además, se encontró que los pretratamientos provocaban una disminución de ROS y del incremento de la actividad de diferentes proteínas de respuesta antioxidante como los son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRx), lo cual muestra un posible mecanismo por el cual SAC puede evitar la toxicidad amiloide inducida por  $A\beta_{1-42}$  (Elmazoglu et al. 2021).

En otro estudio se investigaron los parámetros farmacocinéticos de SAC en ratas y en perros, y se observó que SAC presentó una alta biodisponibilidad en estos animales (Amano et al. 2015). Además, se demostró que SAC se absorbe en el tracto gastrointestinal después de la administración oral, por lo que se ha usado para el tratamiento de pacientes con hipertensión, y no ha presentado signos de toxicidad (Ried, Frank, and Stocks 2010).

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que SAC puede evitar la muerte neuronal en un modelo de neurotoxicidad inducido por estrés

del RE con el uso de tunicamicina, en cultivos de neuronas hipocampales de ratón. Este efecto fue mediado por la inhibición directa de la actividad de las calpaínas, donde SAC demostró interaccionar con el sitio de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  de las calpaínas (Imai et al. 2014).

En un modelo de toxicidad inducida por ácidos grasos libres, donde la presencia de SAC fue capaz de disminuir la producción de ROS, la activación de las caspasas y la posterior muerte celular (Hwang et al. 2013), lo cual muestra el potencial antioxidante y antiapoptótico que presenta esta molécula. Por otro lado, se investigó el efecto de SAC sobre la función mitocondrial en un modelo de isquemia cerebral transitoria de oclusión de la arteria cerebral media en rata (MCAO), en este modelo, una inyección intraperitoneal de SAC evitó parcialmente la pérdida de ATP, la disminución de la actividad mitocondrial y la liberación del citocromo c (Atif, Yousuf, and Agrawal 2009). Este hecho es relevante, ya que como se mencionó previamente, la disfunción mitocondrial es un factor desencadenante en la progresión de la EA y SAC (300 mg/kg) fue capaz de evitar la producción de estos fenómenos al ser administrado 15 minutos antes de la oclusión de la arteria y 2 horas posterior a la oclusión por medio de una inyección intraperitoneal.

Debido a lo mencionado anteriormente, SAC parece ser una alternativa viable para continuar realizando experimentos para esclarecer los efectos protectores que puede llevar a cabo frente a la toxicidad inducida por A $\beta$ Os y explorar otras vías de acción, como lo podría ser la función de SAC sobre la homeostasis del Ca<sup>+2</sup> intracelular, que se ha detectado desbalanceado producto de los tratamientos con los A $\beta$ Os, específicamente en los niveles de IP<sub>3</sub>R y VDAC1, ya que ambas son proteínas que permiten el paso de este ion desde el retículo endoplásmico al citoplasma y desde el citoplasma a la mitocondrias.

Tanto las mitocondrias como el retículo endoplásmico experimentan estrés y daño como consecuencia de la toxicidad provocada por los A $\beta$ Os, lo que subraya la pertinencia de explorar esta vía de investigación. En este contexto, resulta imperativo investigar el potencial impacto de (SAC) en las alteraciones estructurales que sufren las mitocondrias debido a la influencia de los A $\beta$ Os. Es por este motivo que se llevó a cabo una investigación centrada en el estudio del efecto protector de la S-alil-cisteína (SAC) con relación a los A $\beta$ Os, con especial énfasis en la evaluación de los niveles de las proteínas IP<sub>3</sub>R y VDAC1. Además, se explorará cómo SAC incide en la estructura mitocondrial, realizando un análisis detallado del tamaño de estos organelos. Este enfoque integral busca arrojar luz sobre los mecanismos subyacentes y los posibles

beneficios de SAC en la preservación de la función mitocondrial y en la atenuación de los efectos perjudiciales desencadenados por los A $\beta$ O<sub>s</sub> en el contexto de la enfermedad de Alzheimer.

## **2. Hipótesis**

S-alil-cisteína previene la pérdida de la viabilidad celular y cambios en la morfología mitocondrial, además evitar el incremento de los niveles proteicos de IP<sub>3</sub>R y VDAC1, en un modelo celular de toxicidad inducida por los oligómeros solubles del péptido beta-amiloide.

### **2.1. Objetivo general**

Analizar el efecto de S-alil-cisteína sobre la viabilidad celular, morfología mitocondrial y los niveles de las proteínas IP<sub>3</sub>R y VDAC1, en células PC-12 tratadas crónicamente con oligómeros solubles del péptido A $\beta$ .

### **2.2. Objetivos específicos**

- 1 Estudiar el efecto de SAC sobre la viabilidad celular, en modelos de toxicidad inducida por oligómeros solubles de A $\beta$ .
- 2 Estudiar el efecto de SAC y los oligómeros solubles de A $\beta$  sobre los niveles de las proteínas de IP<sub>3</sub>R y VDAC1.
- 3 Evaluar el efecto de SAC y los oligómeros solubles de A $\beta$  sobre los niveles de VDAC1 y el tamaño de las mitocondrias.

- 4 Estudiar el efecto de SAC y los oligómeros solubles de A $\beta$  sobre el potencial de membrana mitocondrial.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Cultivo de células PC-12**

Las células fueron sembradas a una densidad de 10.000 células/ml y cultivadas en medio suplementado con suero bovino fetal (FBS) (5%), suero de caballo (HS) (5%), penicilina y estreptomicina (1%). Posteriormente, las células se mantuvieron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y se utilizaron cuando alcanzaron aproximadamente un 80% de confluencia.

#### **3.2 Oligomerización de A $\beta$**

El péptido A $\beta$ 1-40 (GenicBio, Shanghai, China) fue reconstituido en DMSO a una concentración de 2,3 mM. De ese stock se tomó una alícuota de 2  $\mu$ L y se disolvió en PBS 1X estéril pH 7,4 (Phosphate-Buffered Saline, Corning, Manassas, VA, USA) hasta alcanzar una concentración de 80  $\mu$ M. Esta solución fue sometida a agitación vertical, por 2h a 500 rpm y 37°C, luego 2h a 500 rpm y temperatura ambiente. Para finalizar, se sometió a un shock térmico de 30 minutos, a 4°C, para la formación de oligómeros. La formación de oligómeros

mediante esta metodología se ha demostrado previamente en nuestro grupo (Panés et al. 2020).

### **3.3 Ensayo de MTT**

La viabilidad celular se midió de acuerdo a la capacidad metabólica reductora de enzimas mitocondriales en las células, a través del ensayo colorimétrico de reducción de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro; SIGMA, USA), de color amarillo y soluble en agua, a una sal de formazan, de color púrpura y soluble en solventes orgánicos. El formazan producido se consideró proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas y viables. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos por 24 h (tratamientos crónicos), bajo distintas condiciones experimentales que incluyeron controles sin tratamiento, SAC (0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 1mM) en presencia y ausencia de A $\beta$  (0.5  $\mu$ M), FCCP 10  $\mu$ M y DMSO como control positivo de toxicidad. El medio de cultivo se retiró de cada pocillo y se reemplazó por 100  $\mu$ L de MTT (1mg/mL) en PBS, incubándose por 120 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego, se retiró el sobrenadante y se incubó con 100  $\mu$ L de isopropanol durante 15 minutos, a 37°C, para solubilizar las sales de



formazan precipitadas. La medición se llevó a cabo por medio de la técnica de absorciometría, a 560 nm y 620 nm de longitud de onda, en el lector de multiplacas NOVOstar (BGM, Alemania).

### **3.4 Viabilidad por LIVE/DEAD kit**

La viabilidad celular de células PC-12 tratadas con SAC y A $\beta$ Os se evaluó adicionalmente por medio de LIVE/DEAD kit (Invitrogen, CA, USA) en placas de 96 pocillos. Este kit consiste en el uso de 2 sondas: Calceína (2 $\mu$ M, ex: 495 nm; em: 525nm) como marcador de células vivas, debido a su interacción con esterasas intracelulares, y el Homodímero de Etidio (5 $\mu$ M; ex: 530 nm; em: 617 nm) que marca células muertas, por su interacción con los ácidos nucleicos. Las células fueron incubadas por 30 minutos, a 37°C, con ambas sondas y posteriormente la medición de la fluorescencia se llevó a cabo en el lector de multiplacas NOVOstar (BGM, Alemania), una vez obtenidas ambas fluorescencias se calculó la razón Calceína/Homodímero de Etidio para determinar el % de células vivas por condición.

### 3.5 Western Blot

Las células PC-12 sometidas a diferentes tratamientos fueron lisadas con un buffer que está compuesto por [mM]: Tris 10, EDTA 10, NaCl 100, Tritón 0,5%, inhibidor de proteasas (complete Mini EDTA free, Sigma Aldrich, USA) y Glicerol 10%, pH 7.4. El lisado celular fue mezclado con buffer de carga 4X. Para la desnaturalización, las muestras fueron incubadas a 96°C por 5 minutos, y luego se cargaron en un gel de poliacrilamida (10%). La electroforesis se realizó a 100 V, por 100 minutos. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, a 250 mA, por 120 minutos. La membrana se bloqueó con leche descremada (Svelty) al 5% en TBS Tween 1X por 1 hora y se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: IP<sub>3</sub>R-I (mouse 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), VDAC1 (rabbit 1:1000, Abclonal) y β-actina (mouse 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) como control de carga. Se realizaron 5 lavados de 3 minutos con TBS Tween 1X, y cada membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente: anti-IgG de conejo-HRP (1:5000) o anti-IgG de ratón-HRP (1:5000) (Santa Cruz, Biotechnology, TX, USA). Finalmente, se realizaron 5 lavados de 3 minutos con TBS Tween 1X y

las membranas se revelaron utilizando el kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, CA, USA) y el sistema de detección Odyssey (Li-COR, NE, USA). Las imágenes fueron cuantificadas utilizando la herramienta Image Studio (Image Studio Inc., WI, USA).

### **3.6 Inmunocitoquímica**

Luego de cada tratamiento, las células PC-12 fueron lavadas con PBS 1X y se fijaron con PFA 4% por 15min. Posteriormente, se bloquearon y permeabilizaron con una solución de PBS 1X, Triton X-100 0,1% y suero de caballo (HS) 10% por 40min. Luego se incubó con los anticuerpos primarios VDAC1 (mouse 1:300, Santa Cruz Biotechnology; rabbit 1:300, Abclonal), Tom20 (mouse 1:300, Santa Cruz Biotechnology; rabbit 1:300, Santa Cruz Biotechnology) por toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubó con los anticuerpos secundarios Cy3, Alexa Fluor 488 y DAPI 300µM por 2 horas a temperatura ambiente. Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio confocal espectral LSM780 NLO, Zeiss, con objetivo de inmersión 40X. El análisis se realizó en el programa Image J con el paquete de procesamiento de imágenes Fiji, y luego se cuantificó la inmunoreactividad de las proteínas en células control y con tratamientos con todos los tratamientos usados. Para la cuantificación se tomaron tres puntos aleatorios para cada célula, guardando

cada punto en el plugin ROI Manager, y posteriormente se cuantificaron los promedios de las intensidades para cada caso. Para la determinación de los tamaños relativos de las mitocondrias se midieron con el paquete de procesamiento de imágenes Fiji un total de 10 mitocondrias para cada célula y luego se realizaron los histogramas para cada uno de los tratamientos realizados.

### **3.7 Medición del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

Luego de los respectivos tratamientos, las células fueron incubadas con la sonda JC-1 (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) 1  $\mu\text{M}$  en DPBS, durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con DPBS y se comenzó inmediatamente la medición del  $\Delta\Psi_m$ , se ocupó FCCP (10  $\mu\text{M}$ ) como control de la disminución del  $\Delta\Psi_m$ . JC-1 exhibe una acumulación en la mitocondria dependiente del potencial de membrana, indicada por su estado polimerizado de emisión en rojo (590 nm; excitación:520 nm). En el citoplasma, los monómeros de JC-1 poseen emisión en verde (520 nm; excitación:485 nm). En consecuencia, la despolarización mitocondrial está indicada por una disminución en la relación de intensidad de fluorescencia roja/verde (Marcondes et al. 2019). Ambas longitudes de onda fueron capturadas de forma simultánea en el lector de multiplacas NOVOstar durante 3 h a 37°C, utilizando

una placa negra con fondo transparente de 96 pocillos. La razón 590/520 indica las variaciones en el potencial de membrana para cada tratamiento.

### **3.8 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de las pruebas T-Student y ANOVA de una vía, según corresponda. Todos los análisis se efectuaron con el software GraphPad Prism, y se consideraron diferencias estadísticamente significativas valores de  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudiar el efecto de SAC sobre la viabilidad celular, en modelos de toxicidad inducida por oligómeros solubles de A $\beta$ .

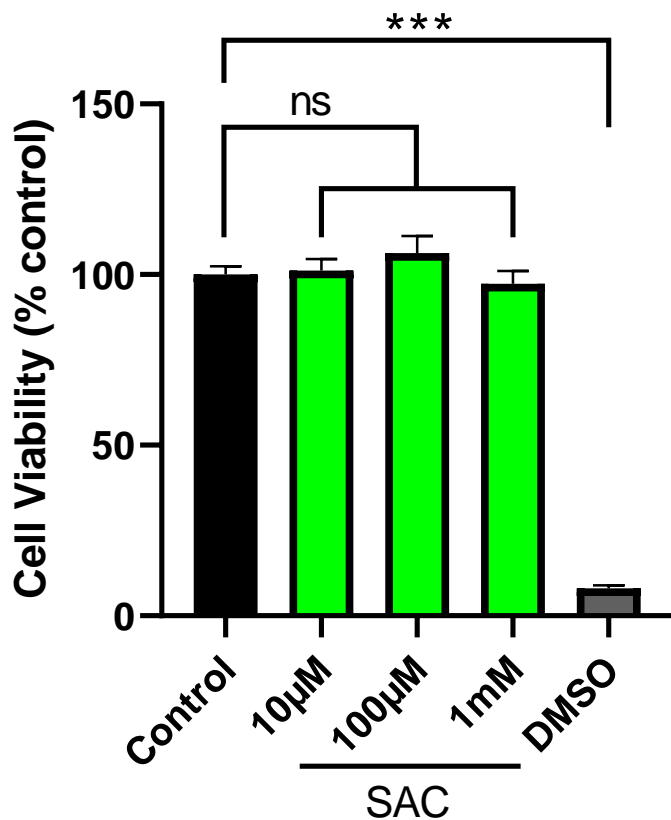
Con estos experimentos, buscamos evaluar los cambios en la viabilidad de las células PC-12 producidos por SAC y A $\beta$ Os, para lo cual se usó el ensayo de MTT (ver materiales y métodos), con un medio sin tratamiento como control, y DMSO (50%) como control positivo de toxicidad celular.

Primero, se trataron las células con diferentes concentraciones de SAC, con el fin de evaluar un posible efecto tóxico de esta molécula (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 1mM). En la Figura 5 se observa que SAC no ejerce un efecto tóxico en el rango de concentraciones utilizadas, ya que los valores de viabilidad celular se mantuvieron cercanos a la condición control, sin diferencias significativas (C:100 $\pm$ 2%; 10  $\mu$ M:101 $\pm$ 3%; 100  $\mu$ M:106 $\pm$ 5%; 1000 $\mu$ M:97 $\pm$ 4%).

Posteriormente, evaluamos el posible efecto protector de SAC sobre la toxicidad producida por A $\beta$ Os en células PC-12. Para esto, se usó nuevamente el ensayo de MTT. Incubamos las células solo con A $\beta$ Os (0,5  $\mu$ M) para demostrar su efecto tóxico, además se co-incubó SAC con A $\beta$ Os (0,5  $\mu$ M) por 24 h. La Figura 6 muestra que solo la concentración de SAC 1mM fue capaz de

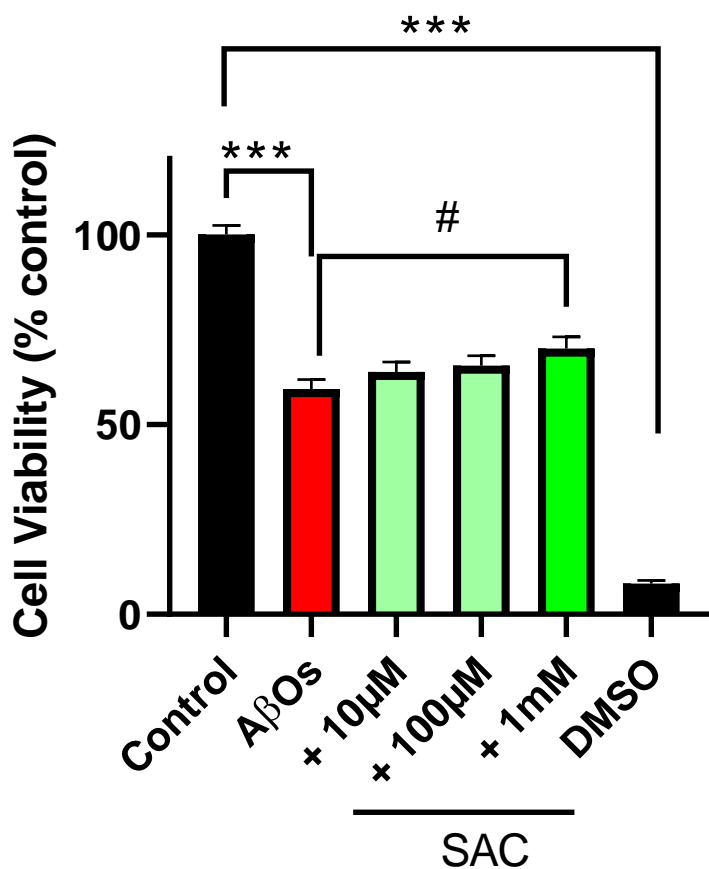
evitar de manera estadísticamente significativa la pérdida de viabilidad celular producida por los A $\beta$ Os en células PC-12, al compararlas con las células que solo fueron tratadas con A $\beta$ Os (C: 100 $\pm$ 2%; A $\beta$ Os:59 $\pm$ 2%; A $\beta$ Os + SAC (10 $\mu$ M):63 $\pm$ 2%; A $\beta$ Os + SAC (100 $\mu$ M):65 $\pm$ 2%; A $\beta$ Os + SAC (1mM):70 $\pm$ 3%; DMSO:8 $\pm$ 1%).

Estos resultados nos sugieren que SAC no ejerce un efecto tóxico a las concentraciones que se evaluaron en estos experimentos por 24 horas y que a la concentración de 1mM sí ejerce un efecto protector en contra de la toxicidad inducida por los A $\beta$ Os.



**Figura 5. Análisis de la toxicidad de SAC sobre células PC-12.** Viabilidad celular de células PC-12 tratadas con diferentes concentraciones de SAC (10µM, 100 µM y 1mM) por 24 horas a 37°C. DMSO fue utilizado como control positivo de toxicidad celular. Los valores son expresados como porcentaje del control sin tratamiento (n=4; N=32). ns= no significativo; \*\*\*\*p<0.0001 versus control.





**Figura 6. Efecto protector de SAC en cotratamientos con AβOs.** Células PC-12 fueron tratadas con AβOs (0,5 μM), y AβOs en conjunto con diferentes concentraciones de SAC (10μM, 100 μM y 1mM) por 24 h. DMSO se utilizó como un control positivo de toxicidad celular. Los valores son expresados como porcentaje del control sin tratamiento (n=4; N=32).  
 \*\*\*\*p<0.0001 versus el control y #p<0.05 versus AβOs.

## **Pretratamientos con SAC evitan la disminución de la viabilidad celular inducida por A $\beta$ Os.**

Evaluamos los cambios en la viabilidad celular en pretratamientos con SAC y una posterior incubación con A $\beta$ Os, a través de la técnica de MTT. Para esto nuevamente, utilizamos un medio sin tratamiento como control y DMSO como control positivo de toxicidad celular.

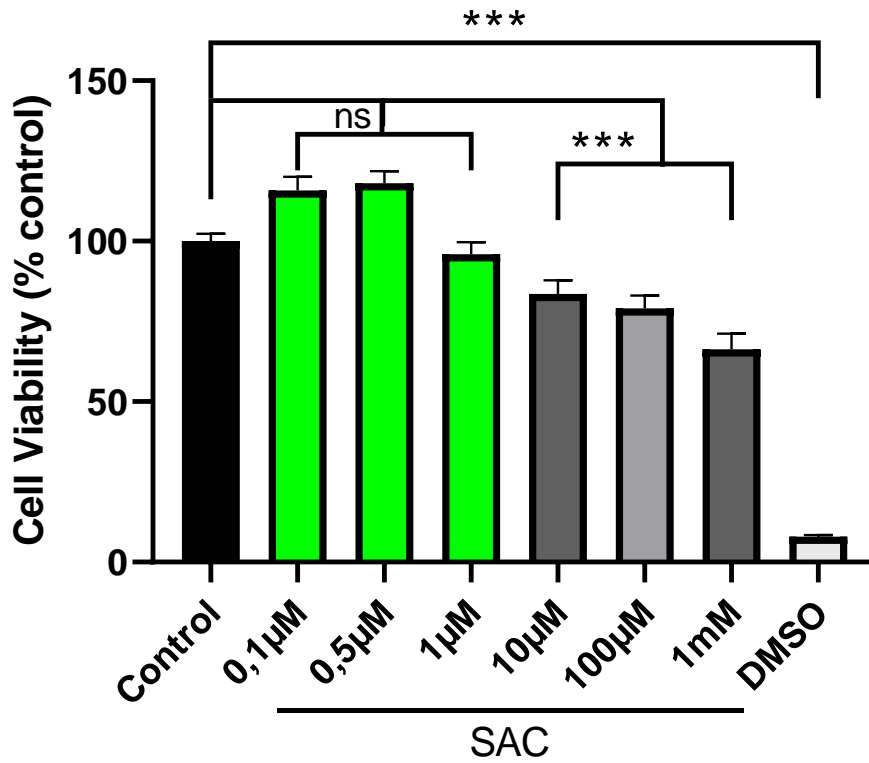
Primero, se trataron las células con concentraciones crecientes de SAC (0,1 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 1mM) por 48 horas. Como se muestra en la Figura 7, luego de 48 horas de tratamiento, SAC no indujo efectos tóxicos en las células en el rango de concentraciones de 0,1 a 1 $\mu$ M (C:100 $\pm$ 2%; 0,1 $\mu$ M:115 $\pm$ 4%; 0,5 $\mu$ M:118 $\pm$ 3%; 1 $\mu$ M:95 $\pm$ 3; DMSO:8 $\pm$ 1). Sin embargo, con concentraciones más altas, de 10  $\mu$ M a 1mM, SAC disminuyó la viabilidad de células PC-12 (10 $\mu$ M:83 $\pm$ 4%; 100 $\mu$ M:79 $\pm$ 4%; 1mM:66 $\pm$ 5%).

Luego, se realizó un pretratamiento de 24 horas con SAC en células PC-12, utilizando las concentraciones mencionadas previamente (0,1 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 1mM), con el objetivo de buscar incrementar el efecto protector visto en los experimentos anteriores. Después del período de

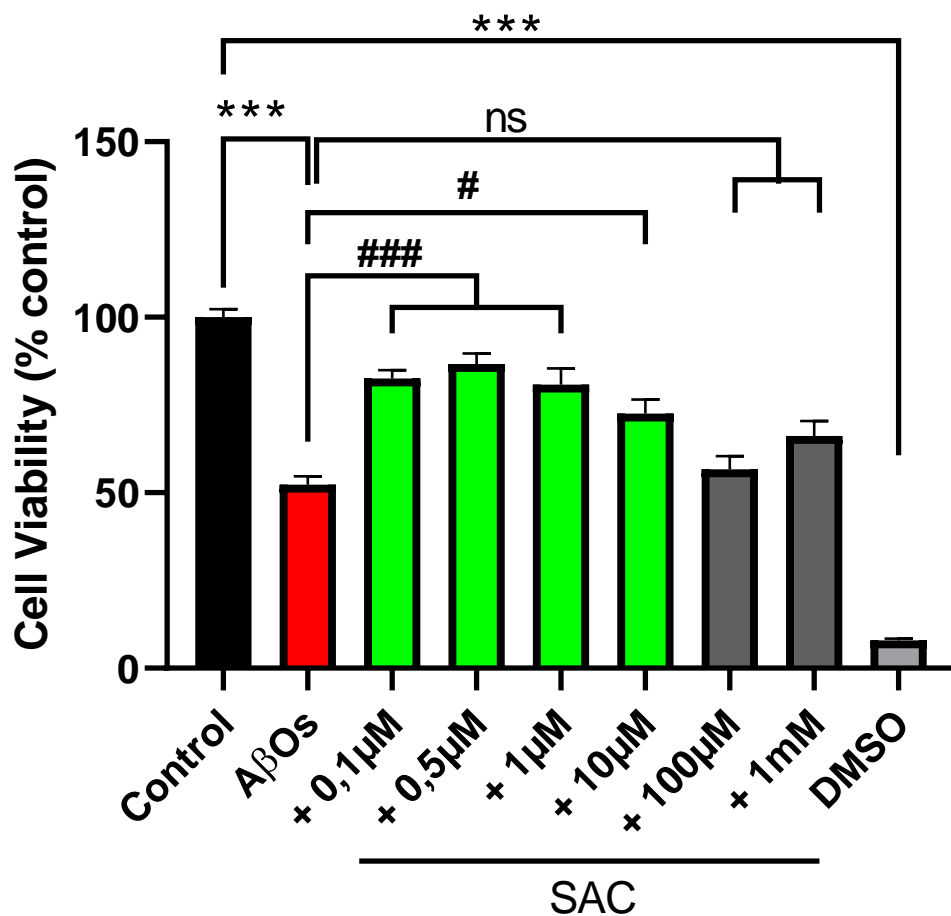
pretratamiento de 24 horas con SAC, las células fueron sometidas a una incubación adicional de 24 horas con A $\beta$ O<sub>s</sub>.

En la Figura 8 podemos observar que SAC ejerció un efecto protector contra la toxicidad de A $\beta$ O<sub>s</sub> en el rango de concentraciones de 0,1 a 10 $\mu$ M (C:100 $\pm$ 2%; A $\beta$ O<sub>s</sub>:52 $\pm$ 2%; A $\beta$ O<sub>s</sub> + SAC 0,1 $\mu$ M:82 $\pm$ 2%; A $\beta$ O<sub>s</sub> + SAC 0,5 $\mu$ M:86 $\pm$ 3%; A $\beta$ O<sub>s</sub> + SAC 1 $\mu$ M:80 $\pm$ 5%; A $\beta$ O<sub>s</sub> + SAC 10 $\mu$ M:72 $\pm$ 4%), mientras que las concentraciones de SAC de 100  $\mu$ M y 1mM no fueron capaces de prevenir la disminución de la viabilidad celular inducida por A $\beta$ O<sub>s</sub> (A $\beta$ O<sub>s</sub> + SAC100 $\mu$ M:56 $\pm$ 3%; A $\beta$ O<sub>s</sub> + SAC 1 $\mu$ M:66 $\pm$ 4%).

Con los resultados obtenidos demostramos que cuando las células están expuestas 48 horas a SAC no se induce un efecto tóxico en el rango de concentraciones entre 0,1 y 1  $\mu$ M, además, el pretratamiento sí ejerce un efecto protector frente a la toxicidad inducida por los A $\beta$ O<sub>s</sub> en el rango de concentraciones entre 0,1 y 10 $\mu$ M.



**Figura 7. Análisis de la toxicidad de SAC sobre células PC-12 en tratamientos de 48 horas.** Viabilidad celular de cultivos de células PC-12 con tratamientos de 48 horas con concentraciones crecientes de SAC 0,1 μM entre 1mM, a través de la técnica de MTT. DMSO se utilizó como un control positivo de toxicidad celular. Los valores son expresados como porcentaje del control sin tratamiento (n=3; N=24). \*\*\*\*p<0.0001 y ns= no significativo.



**Figura 8. Efecto protector del pretratamiento con SAC sobre la toxicidad de AβOs en células PC-12.** Se trataron células PC-12 por 24 horas con las diferentes concentraciones de SAC (0,1μM, 0,5μM, 1μM, 10μM, 100 μM y 1mM), posteriormente las células se incubaron con AβOs (0,5 μM) por 24 h, para medir la viabilidad celular a través de la técnica de MTT. DMSO se utilizó como un control positivo de toxicidad celular (n=3; N=24). \*\*\*\*p<0.0001 versus control y #p<0.05, #####p<0.0001 versus AβOs.

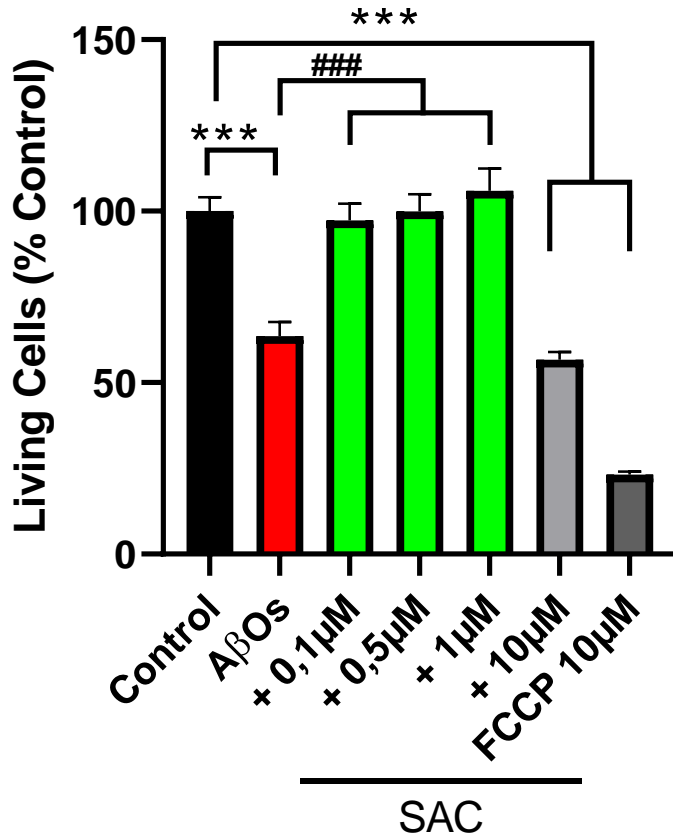
## **Ensayo LIVE/DEAD para evaluar el efecto protector del pretratamiento con SAC sobre la toxicidad de A $\beta$ Os.**

Para reforzar los resultados expuestos y demostrar claramente el efecto protector de SAC frente a la toxicidad inducida por los A $\beta$ Os, se utilizó la metodología LIVE/DEAD como técnica complementaria. De igual manera, utilizamos un medio sin tratamiento como control, y DMSO como un control positivo de toxicidad celular.

Primero, se pretrataron células PC-12 con SAC (1 $\mu$ M; 24 h), para posteriormente incubar A $\beta$ Os (0,5  $\mu$ M) por 24 horas más. La Figura 9 muestra el porcentaje de células vivas presentes en cada condición, donde se pudo observar que SAC previene de manera significativa la muerte celular inducida por A $\beta$ Os (C:100 $\pm$ 4%; A $\beta$ Os:63 $\pm$ 4%; A $\beta$ Os + SAC 0,1 $\mu$ M:97 $\pm$ 5; A $\beta$ Os + SAC 0,5 $\mu$ M:100 $\pm$ 5%; A $\beta$ Os + SAC 1 $\mu$ M:106 $\pm$ 6%; A $\beta$ Os + SAC 10 $\mu$ M:56 $\pm$ 2; DMSO:23 $\pm$ 1%).

Los resultados expuestos indican que SAC efectivamente ejerce un efecto protector preventivo frente a la toxicidad inducida por los A $\beta$ Os en el rango de

concentraciones entre 0,1 y 1  $\mu\text{M}$ , debido a esto es que para los experimentos posteriores se continuaron usando estas concentraciones obtenidas.



**Figura 9. Efecto protector del pretratamiento de SAC sobre la muerte celular inducida por A $\beta$ Os.** Las células PC-12 se trataron con SAC (1  $\mu\text{M}$ ) por 24 h y posteriormente se incubaron A $\beta$ Os (0,5 $\mu\text{M}$ ) por 24 h más. Se utilizó DMSO como control de toxicidad celular. Para este experimento se usó la metodología de LIVE/DEAD y se evaluó la fluorescencia de ambas sondas, para finalmente calcular la razón Calceína/EHD que indica el porcentaje de células vivas. (n=3; N=24). \*\*\*\*p<0.0001 versus control y #####p<0.0001 versus A $\beta$ Os.

#### **4.2. Efecto de SAC y A $\beta$ O<sub>s</sub> sobre los niveles de expresión de las proteínas IP<sub>3</sub>R y VDAC1 en células PC-12.**

Para estudiar las variaciones en la expresión de IP<sub>3</sub>R y VDAC1 en los cultivos celulares, células PC-12 fueron tratadas por 24 horas con SAC (0,5 y 1  $\mu$ M) y luego, las células se incubaron con A $\beta$ O<sub>s</sub> (0,5 $\mu$ M) por 24 horas más. Posteriormente, las células se lisaron y se llevó a cabo un ensayo de Western Blot utilizando los anticuerpos correspondientes para cada proteína.

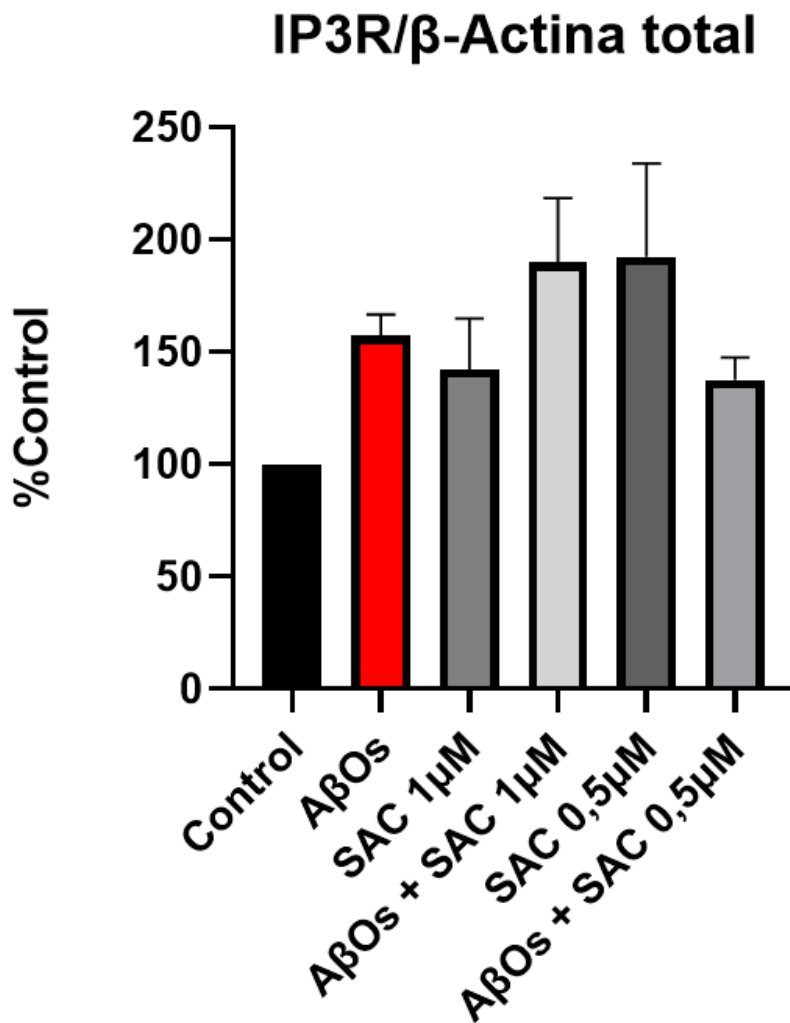
Primero, evaluamos los niveles de IP<sub>3</sub>R luego de los tratamientos antes mencionados, y observamos que SAC y A $\beta$ O<sub>s</sub> tuvieron una tendencia a incrementar los niveles de IP<sub>3</sub>R en células PC-12, sin embargo, este efecto no fue estadísticamente significativo. (C:100%, A $\beta$ O<sub>s</sub>:150 $\pm$ 10%, SAC 1 $\mu$ M:155 $\pm$ 24%, A $\beta$ O<sub>s</sub> +SAC 1 $\mu$ M:188 $\pm$ 28%, SAC 0,5  $\mu$ M:194 $\pm$ 42%, A $\beta$ O<sub>s</sub> +SAC 0,5 $\mu$ M:141 $\pm$ 6%).

Luego se analizó el nivel de proteína del canal VDAC1, luego de los tratamientos antes mencionados y, como se esperaba se observó que tras los tratamientos con A $\beta$ O<sub>s</sub> aumentan los niveles de VDAC1, mientras que, el pretratamiento con SAC previene este aumento (C:99 $\pm$ 1%, A $\beta$ O<sub>s</sub>:117 $\pm$ 2%,

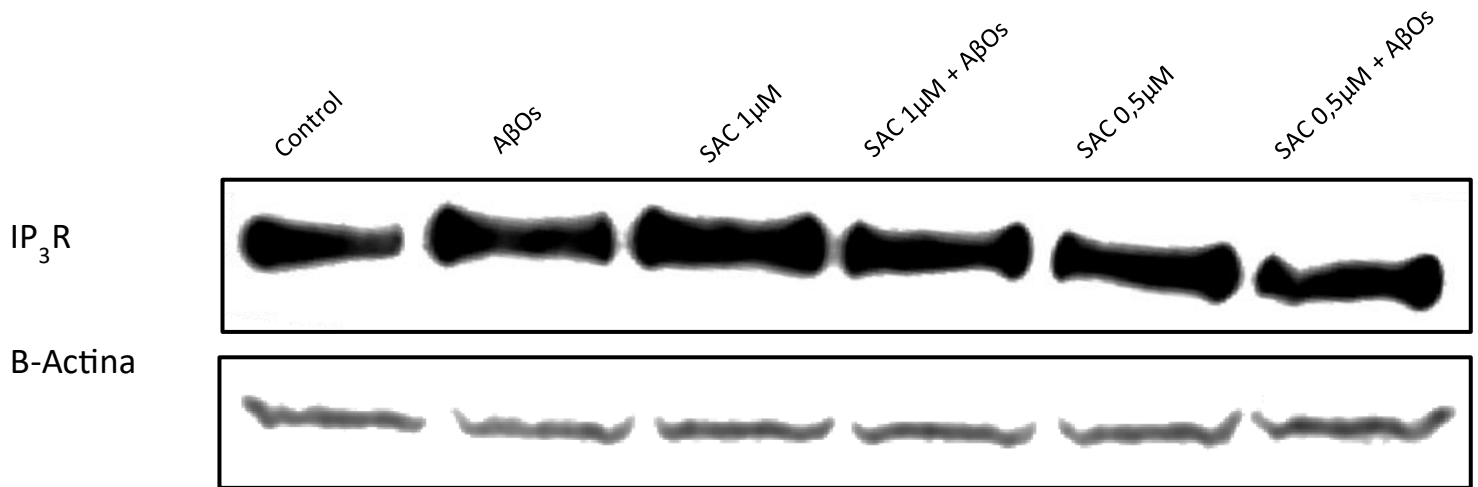


SAC 1 $\mu$ M:86 $\pm$ 3%, A $\beta$ Os + SAC 1 $\mu$ M:93 $\pm$ 3%, SAC 0,5  $\mu$ M:101 $\pm$ 3%, A $\beta$ Os + SAC 0,5 $\mu$ M:89 $\pm$ 5%).

A)

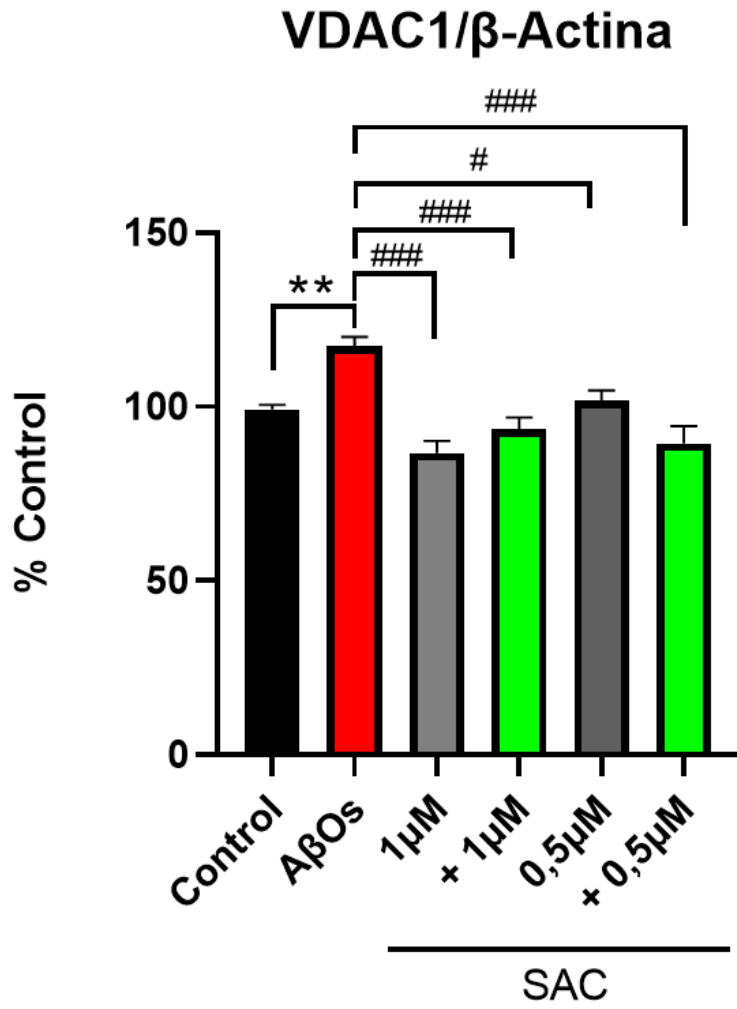


**B)**

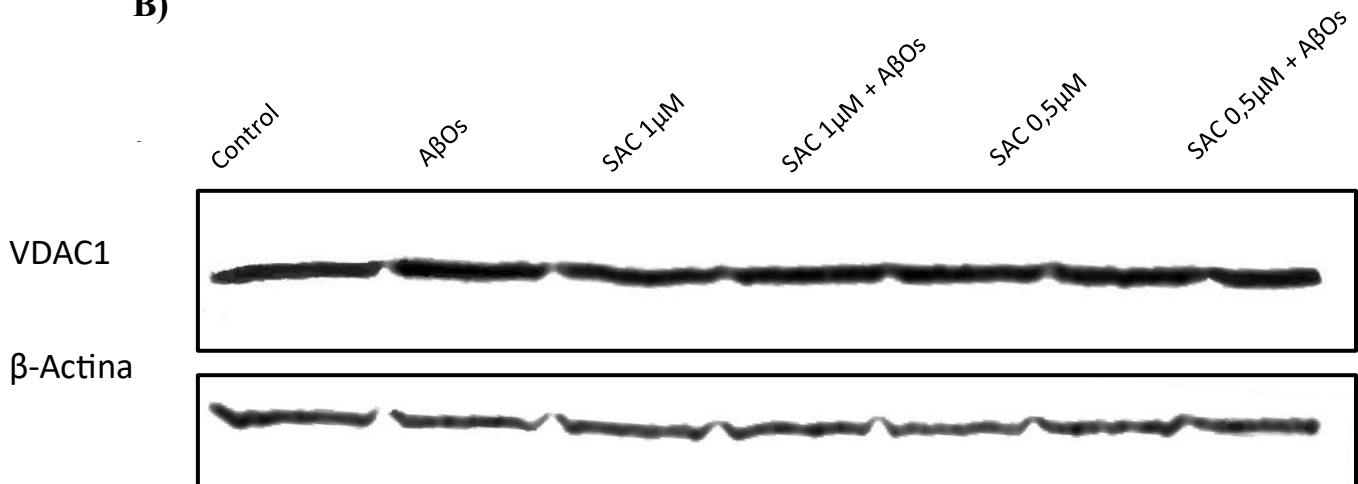


**Figura 10. Cambios en los niveles de IP<sub>3</sub>R en tratamientos con SAC y AβOs.** Se realizó 3 repeticiones independientes de Western Blot. **A)** Se presenta la cuantificación de las bandas obtenidas. **B)** Se muestra un gel representativo de los experimentos realizados. Células PC-12 fueron pretratadas con SAC (0,5μM y 1μM) por 24 h, posteriormente se les agregó AβOs (0,5μM) por 24 h más. (n=3; N=3). No se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos.

A)



B)



**Figura 11. Cambios en los niveles de VDAC1 en tratamientos con SAC y A $\beta$ O<sub>s</sub>.** Se realizó 3 repeticiones independientes de Western Blot. Células PC-12 fueron pretratadas con SAC (0,5 $\mu$ M y 1 $\mu$ M) por 24 h, posteriormente se les agregó A $\beta$ O<sub>s</sub> (0,5 $\mu$ M) por 24 h más. **A)** Se presenta la cuantificación de las bandas obtenidas. **B)** Se muestra un gel representativo de los experimentos realizados. (n=5; N=5). \*\*p<0.01 y #####p<0.0001 versus A $\beta$ O<sub>s</sub>.

### **4.3. Evaluar los efectos de SAC y A $\beta$ O<sub>s</sub> sobre los niveles de VDAC1 y el tamaño relativo de las mitocondrias**

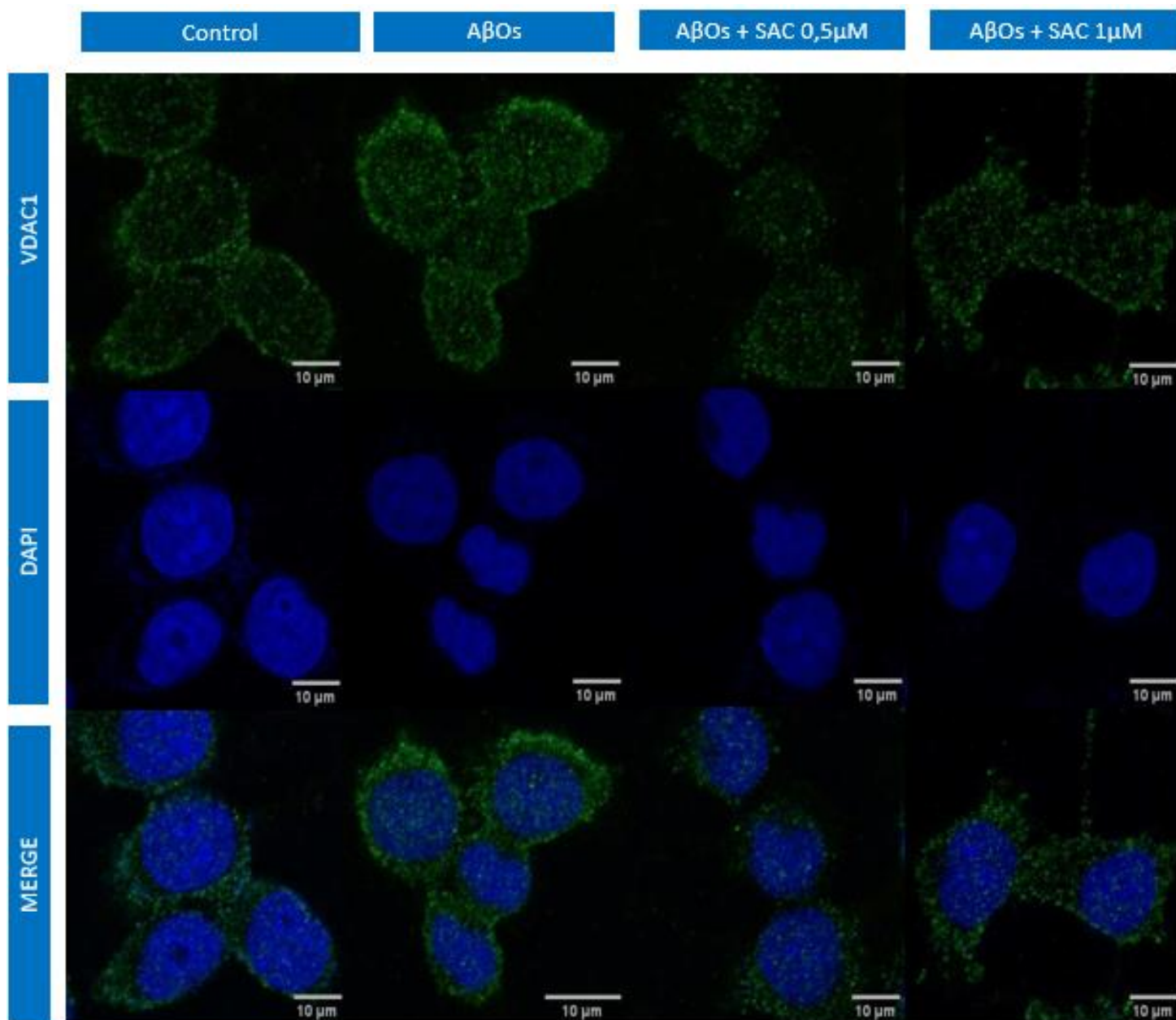
Para corroborar los resultados anteriores sobre los niveles de proteína de VDAC1, se evaluó los niveles de esta proteína por medio de la técnica de inmunofluorescencia luego del pretratamiento con SAC por 24 horas con SAC (0,5 y 1  $\mu$ M) y la posterior exposición a A $\beta$ O<sub>s</sub> (0,5 $\mu$ M) por 24 horas. Finalmente, las imágenes se obtuvieron en el microscopio confocal espectral LSM780 NLO, Zeiss, con objetivo de inmersión 40X. El análisis se realizó en el programa Image J con el paquete de procesamiento de imágenes Fiji, y luego se cuantificó la inmunoreactividad de las proteínas en células control y en todos los tratamientos usados.

De lo anterior, se observó un resultado concordante con lo visto mediante western blot, donde el tratamiento con los A $\beta$ O<sub>s</sub> induce un aumento de VDAC1, que se podría relacionar con la inducción de la muerte celular, por otro lado, los pretratamientos con SAC fueron capaces de evitar este aumento (C:98 $\pm$ 5%, A $\beta$ O<sub>s</sub>:204 $\pm$ 9%, SAC 1 $\mu$ M:130 $\pm$ 6%, A $\beta$ O<sub>s</sub> + SAC 1 $\mu$ M:132 $\pm$ 5%, SAC 0,5  $\mu$ M:114 $\pm$ 8%, A $\beta$ O<sub>s</sub> + SAC 0,5 $\mu$ M:143 $\pm$ 5%).

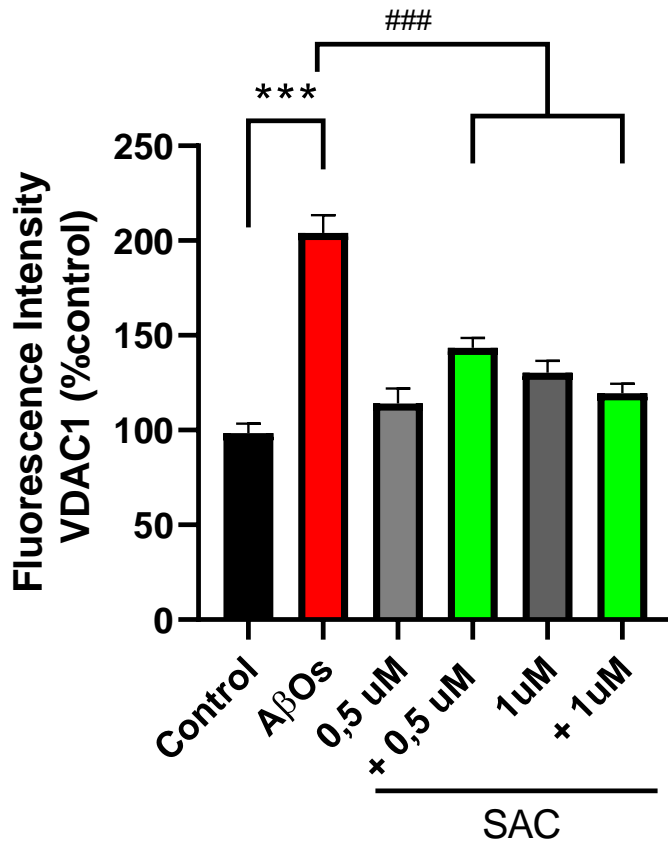
Además, mediante la misma técnica de inmunocitoquímica se determinó el tamaño relativo de las mitocondrias, usando TOM20 como marcador mitocondrial de acuerdo con lo descrito en literatura. Utilizando esto fue posible determinar que el tratamiento con A $\beta$ O<sub>s</sub> produjo el fenotipo mitocondrial fisionado previamente descrito, mientras que los pretratamientos con SAC

fueron capaces de evitar que esto ocurriera. Esto podría indicarnos que SAC es capaz de evitar la pérdida de viabilidad celular, ya que es capaz de mantener las mitocondrias funcionales en las células a pesar de la exposición a A $\beta$ O $_s$ .

A)



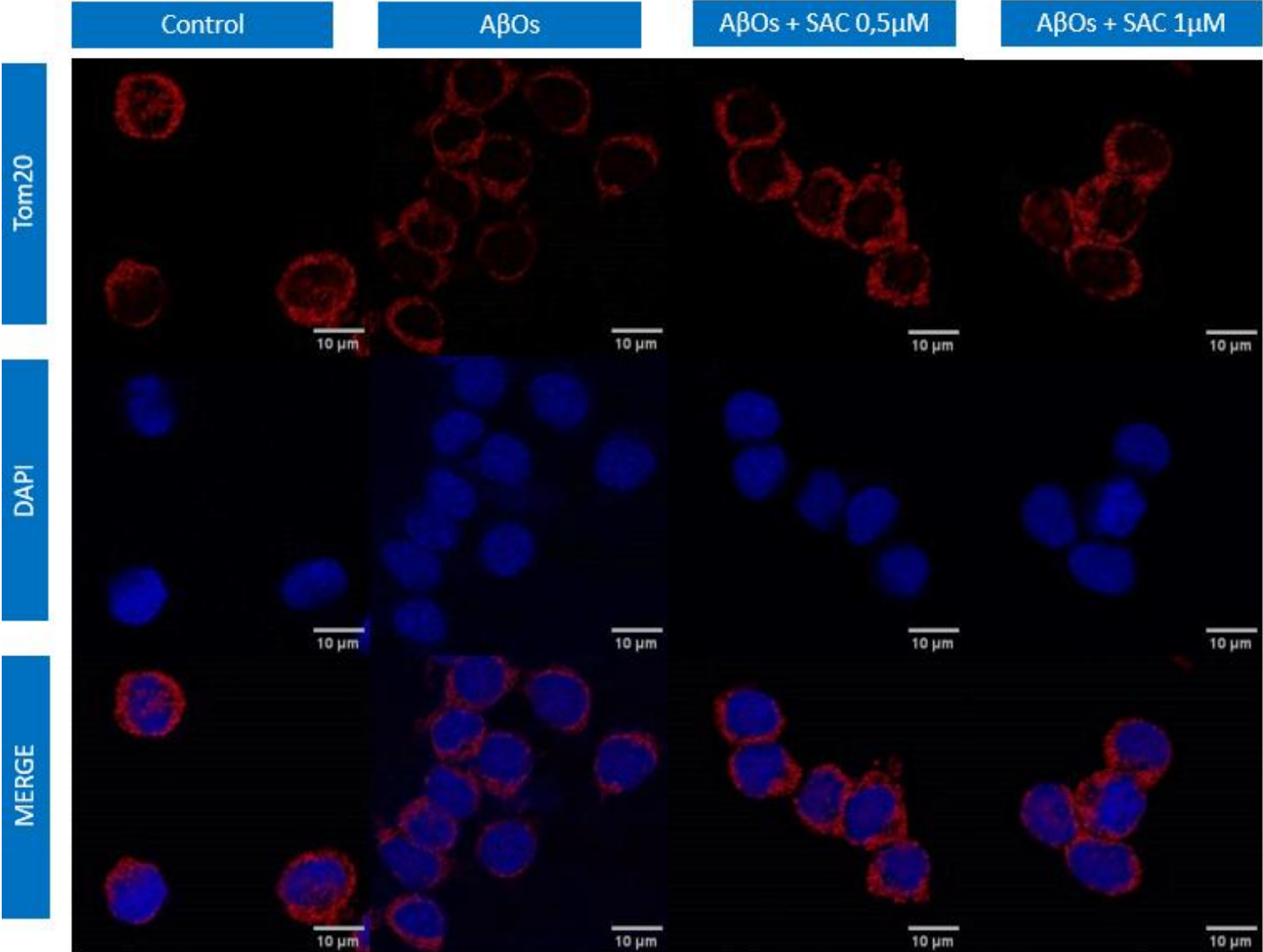
B)



**Figura 12. Cambios en la inmunofluorescencia de VDAC1 en tratamientos con SAC y AβOs.** Imágenes representativas de microscopia confocal de línea celular PC-12 tratadas con SAC (0,5μM y 1μM) por 24 h, posteriormente se les agregó AβOs (0,5μM) por 24 h más. En las imágenes se observa el marcador para la proteína VDAC1 en verde y el marcador nuclear DAPI en azul. **A)** Se presenta una imagen representativa de las obtenidas **B)** Cuantificación de las señales de fluorescencia obtenidas para VDAC1. (n=3; N=9). \*\*\*\*p<0.0001 versus control y #####p<0.0001 versus AβOs.

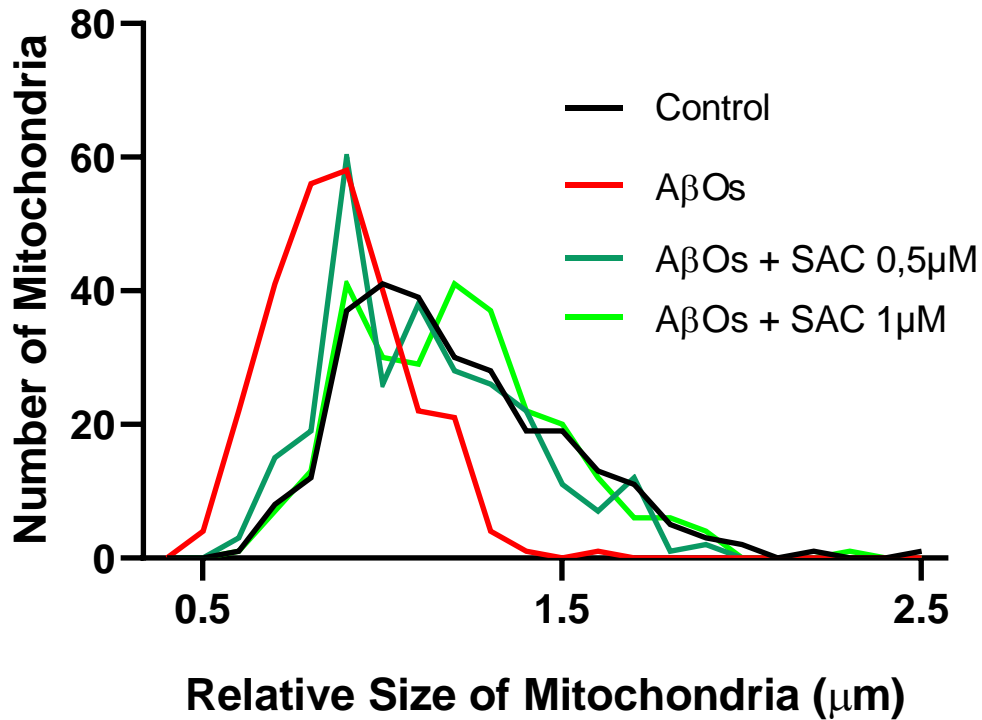
# Evaluación del tamaño relativo de las mitocondrias por TOM20

A)





B)



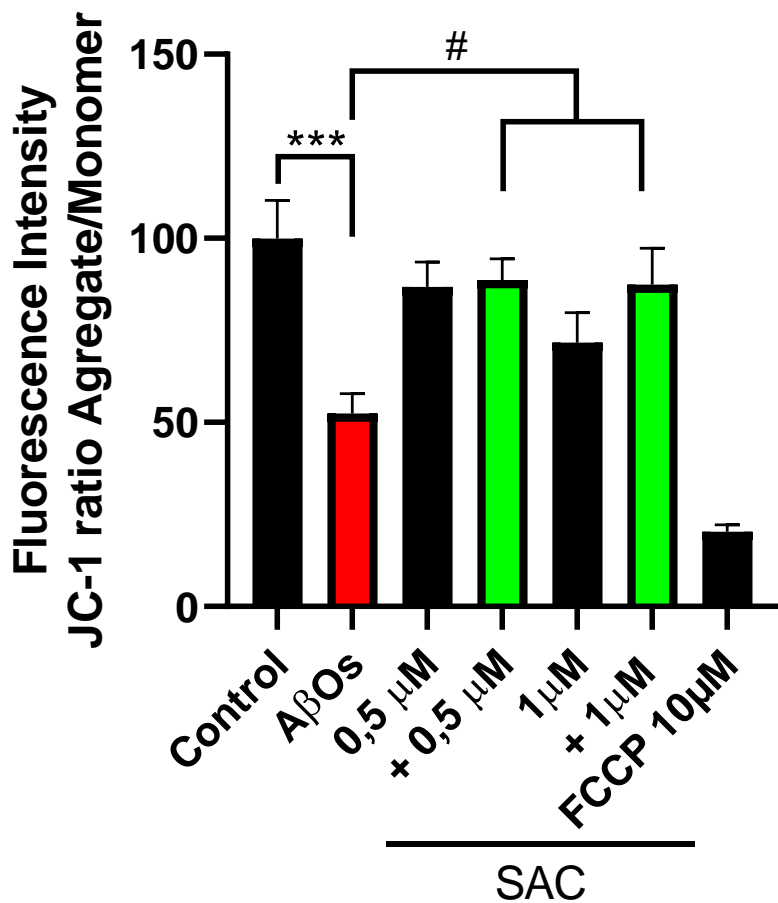
**Figura 13. Cambios en el tamaño relativo de mitocondrias en tratamientos con SAC y A $\beta$ Os.** Línea celular PC-12 tratadas con SAC (0,5 $\mu\text{M}$  y 1 $\mu\text{M}$ ) por 24 h, posteriormente se les agregó A $\beta$ Os (0,5 $\mu\text{M}$ ) por 24 h más. En las imágenes se observa el marcador para la proteína Tom20 en rojo y el marcador nuclear DAPI en azul. **A)** Se presenta una imagen representativa de las obtenidas. **B)** Se presenta un histograma de frecuencia del número de mitocondrias con su respectivo tamaño relativo. (n=3; N=9). \*\*p<0.01 y #####p<0.0001 versus A $\beta$ Os.

#### 4.4 Evaluar potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Con la finalidad de unir la información que relaciona SAC con el incremento en la viabilidad celular y su capacidad para mantener las mitocondrias de un tamaño relativo similar al control, es que se planteó la metodología de evaluar el ( $\Delta\Psi_m$ ), ya que sirve como un indicador temprano de muerte celular y a su vez nos da una aproximación de la actividad mitocondrial.

La sonda JC-1 ocupada forma agregados de emisión en rojo (590 nm) en las mitocondrias de acuerdo con su ( $\Delta\Psi_m$ ), cuando estas se despolarizan y pierden su ( $\Delta\Psi_m$ ) característico se acumulan monómeros de JC-1 en el citoplasma con una emisión en verde (520), por lo cual, se puede estimar la despolarización mitocondrial al graficar la relación entre la intensidad de fluorescencia 590/520 nm.

Para esto se usó el protocolo de pretratamiento ocupado anteriormente, con las concentraciones de SAC (0,5 y 1  $\mu\text{M}$ ) y la posterior exposición a A $\beta$ Os (0,5 $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. Donde se obtuvo que el tratamiento con A $\beta$ Os si produjo la disminución del ( $\Delta\Psi_m$ ) esperado (Control: 100 $\pm$ 10%; A $\beta$ Os:52 $\pm$ 5%), mientras que SAC fue capaz de evitar de forma significativa dicha disminución en las concentraciones utilizadas (0,5 y 1  $\mu\text{M}$ ) (SAC 0,5  $\mu\text{M}$  + A $\beta$ Os: 87 $\pm$ 10%; SAC 1  $\mu\text{M}$  + A $\beta$ Os: 88 $\pm$ 5%).



**Figura 14. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial en tratamientos con SAC y AβOs.** Línea celular PC-12 tratadas con SAC (0,5μM y 1μM) por 24 h, posteriormente se les agregó AβOs (0,5μM) por 24 h más, se usó FCCP 10μM como control positivo de la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Se midió la relación de fluorescencia a las longitudes de onda 590/520nm como una relación entre los agregados y monómeros de JC-1 para determinar el  $\Delta\Psi_m$ . (n=3; N=18). \*\*p<0.01 y #####p<0.0001 versus AβOs.

## 5. DISCUSIÓN

A pesar de los constantes esfuerzos de grupos de investigación provenientes de todo el mundo para comprender la etiología y los mecanismos detrás de la EA, no existe un tratamiento definitivo para esta enfermedad, inclusive no tenemos una teoría que describa completamente la fisiopatología de la EA. En la actualidad contamos con diferentes teorías que se buscan unir para comprender de mejor manera los mecanismos detrás de la EA, algunas de las hipótesis son la teoría amiloide, hipótesis de Tau, hipótesis inflamatoria y la hipótesis colinérgica (Ghazimoradi et al. 2023).

Los clásicos medicamentos usados para tratar la EA muestran una reducción en la velocidad de daño cognitivo limitada y que varía dependiendo del paciente en particular, sin afectar la progresión de la enfermedad (Craig, Hong, and McDonald 2011). Recientemente, se han comenzado a aprobar de forma acelerada otro tipo de medicamentos por la FDA, que son inmunoterapias con anticuerpos que reconocen agregados amiloides como Aducanumab y Lecanemab, entre otros (Hoiland-Carlsen et al. 2023), que si bien parecen prometedores en primera instancia ya que modifican directamente uno de los

principales agentes de la EA, como lo son las placas amiloides, es fundamental evaluarlos profunda y críticamente (Liu et al. 2023).

Particularmente 2 de estos, Donanemab y Lecanemab demostraron eficacia clínica, pero con resultados inciertos. Ya que, si bien se presenta una disminución de la señal PET posiblemente relacionada con una disminución de la carga amiloide en los cerebros, se relaciona con un aumento de ARIAs (Imágenes anormales relacionadas amiloides) y con una disminución de volumen cerebral (Hoiland-Carlsen et al. 2023). Por otro lado, los análisis estadísticos muestran que no había un efecto clínico significativo demostrado para Aducanumab (Hoiland-Carlsen et al. 2023), por lo cual, aún permanece como incierto los reales efectos que pueden tener en los pacientes.

Debido a que como se mencionó anteriormente, no existe un tratamiento efectivo para la EA, es por esto que continua la búsqueda de moléculas que puedan contrarrestar el avance y los síntomas de manera eficaz. En esta constante búsqueda se ha explorado el posible uso de extractos naturales y compuestos aislados de origen natural con capacidad neuroprotectora de acuerdo a estudios preclínicos y/o clínicos de EA (Chen et al. 2021), estos compuestos derivados de plantas presentan las ventajas de que pueden ser alternativas seguras y más eficaces (Zhang et al. 2023).

Esta tesis se enmarca en la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades que puedan ayudar a combatir la enfermedad de Alzheimer, donde la molécula seleccionada es S-alil-cisteína (SAC), un compuesto azufrado que está presente en el denominado ajo negro o envejecido. Se ha descrito que SAC presenta diversas propiedades, entre las que se encuentra su capacidad antioxidante y que además, es capaz de disminuir la inmunoreactividad tanto de las placas amiloides, como de los ovillos neurofibrilares conformados por Tau-2 en el cerebro de ratones que recibieron una alimentación suplementada con SAC (Chauhan 2006).

Es por esto, es que en la presente tesis se planteó la hipótesis de que SAC es capaz de revertir la pérdida de viabilidad celular inducida por los oligómeros solubles de A $\beta$ , además de evitar la sobreexpresión esperada de IP<sub>3</sub>R y VDAC1, lo que finalmente conllevaría en prevenir el cambio en la estructura de las mitocondrias.

En primer lugar, se analizó la viabilidad celular por ensayo de MTT tras tratamientos con SAC por 24 horas, con el fin de demostrar su inocuidad. Mediante esta metodología, se obtuvo que en el rango de concentraciones utilizadas (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 1mM) no provocó ninguna disminución de la viabilidad celular, lo cual coincide con lo que nos informa la literatura tras

tratamientos de 24 horas en células PC-12 que fueron diferenciadas a fenotipo neuronal (Imai et al. 2014). Para estudiar el efecto protector de SAC sobre la toxicidad inducida por los A $\beta$ Os, se realizó la co-incubación de los oligómeros junto a SAC en el rango de concentraciones probadas anteriormente por 24 horas, el cual es el tiempo descrito en literatura para analizar estudios de toxicidad crónica de los A $\beta$ Os. De este experimento se obtuvo que los A $\beta$ Os redujeron la viabilidad celular, mientras que solo fue capaz de ofrecer un efecto de protección estadísticamente significativa la mayor concentración utilizada de SAC (1mM), lo cual es una concentración elevada para para el nivel de protección obtenido.

Debido a que la concentración efectiva para el efecto protector era muy alta y el efecto real era bajo en comparación al daño provocado por los A $\beta$ Os, se decidió realizar el pretratamiento con SAC, el cual consta de un tratamiento a diferentes concentraciones de SAC por 24 horas, al que posteriormente se añaden los A $\beta$ Os por 24 horas más, donde por la misma metodología de MTT se analizó la viabilidad celular.

Al analizar el posible efecto tóxico de SAC sobre las células PC-12 ahora por las 48 horas que estarán las células bajo esta condición, se obtuvo que en el rango de concentraciones de 0,1 y 1 $\mu$ M no ejerció un efecto tóxico, lo cual es

similar a lo observado en literatura, donde los tratamientos con SAC no provocaron la disminución de viabilidad en una metodología de pretratamiento de 30 horas antes del tratamiento con  $A\beta_{1-42}$  por 24 horas (Elmazoglu et al. 2021). El efecto protector mostrado por los investigadores es menor al obtenido en esta tesis, lo que podría deberse a que ellos ocuparon un péptido amiloide diferente al usado por nosotros y sin un protocolo de oligomerización, además el efecto toxico provocado por el péptido que ocuparon fue menor, por lo que existe un margen más pequeño para observar una recuperación por los tratamientos (Elmazoglu et al. 2021).

A las concentraciones entre  $10\mu\text{M}$  y  $1\text{mM}$  se produjo una disminución de la viabilidad celular, por lo cual, estas concentraciones fueron descartadas para los próximos experimentos. Es posible que esto sea debido a que se le han atribuido a SAC algunas propiedades anticancerígenas (Ho et al. 2018), y las células PC-12 son una línea celular tumoral derivada de feocromocitoma, y por lo tanto, es posible que exista un efecto pro-apoptótico de SAC sobre esta línea celular con 48 horas de tratamiento a las concentraciones más altas de las utilizadas.

Por otro lado, al evaluar el efecto protector de SAC contra los A $\beta$ Os por la metodología de pretratamiento antes mencionada, se obtuvo que SAC ejerció



un efecto protector en el rango de concentraciones entre 0,1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M, mientras que en las concentraciones mayores no fue posible detectar un efecto protector, posiblemente por el propio efecto tóxico ejercido por SAC sobre las células PC-12 por el tratamiento por 48 horas.

El aumento del efecto protector entre las condiciones de cotratamiento y pretratamiento, posiblemente tengan relación con permitirle a la célula prepararse para la toxicidad inducida por los A $\beta$ O<sub>s</sub>, más que una interacción directa de SAC sobre los A $\beta$ O<sub>s</sub>, ya que se ha documentado que un pretratamiento de SAC induce un incremento de enzimas de respuesta al daño oxidativo como superóxido dismutasa, glutatión reductasa entre otras, por lo que sería capaz de evitar en parte el incremento de ROS y así disminuir la cantidad de células que disminuyen su viabilidad (Elmazoglu et al. 2021).

Para corroborar los resultados anteriormente mencionados, decidimos evaluar la viabilidad celular por otra metodología diferente, donde se usó un kit comercial denominado Live/Dead. Tanto el efecto tóxico observado para los A $\beta$ O<sub>s</sub>, como el efecto protector preventivo de SAC fue similar a lo visto en la metodología de MTT, lo cual nos permite asegurar mediante dos metodologías diferentes, que SAC ejerce un efecto protector preventivo contra la toxicidad inducida por los A $\beta$ O<sub>s</sub> en las concentraciones analizadas.

Ya que la metodología de MTT evalúa la actividad mitocondrial debido a la reducción de esta sal de formazan por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, se puede extrapolar a viabilidad celular. Por otro lado, el Live/Dead kit al contar con 2 sondas fluorescentes, por un lado, Calceína que es permeable a la membrana celular y que al interactuar con las esterasas intracelulares le permite emitir fluorescencia, mientras que el Homodimero de Etidio es impermeable a la membrana celular y emitir fluorescencia en presencia de DNA, solo se observa dicha fluorescencia cuando las células estén muertas o su membrana celular este dañada. Al evaluar la viabilidad celular por ambas metodologías se buscó demostrar por 2 mecanismos diferentes el efecto protector de SAC.

Por otra parte, luego de haber obtenido el efecto protector preventivo de SAC en la viabilidad celular, se exploró el posible efecto en disminuir los niveles de proteína de IP<sub>3</sub>R, el cual como se mencionó anteriormente es un receptor activado por ligando, descrito como uno de los componentes claves de las MAMs que permite el flujo de Ca<sup>2+</sup> hacia el medio intracelular, potenciando la excitotoxicidad producida por los AβOs e incrementando la recaptación de Ca<sup>2+</sup> en las mitocondrias.

Al analizar los niveles de proteína del IP<sub>3</sub>R en las células PC-12 tratadas con AβOs y con las concentraciones de SAC determinadas anteriormente, se obtuvo resultados con una alta dispersión, por lo cual no fue posible determinar diferencias significativas en los niveles de IP<sub>3</sub>R.

Como alternativa, se plantea que puede ser más efectivo medir los niveles de proteína de otra de las isoformas de IP<sub>3</sub>R, ya que hay un total de 3 y el anticuerpo utilizado reconoce de forma específica a IP<sub>3</sub>R-I (ver materiales y métodos), la cual es la más expresada en neuronas (Chami and Checler 2020), pero se desconoce si es así en las células PC-12, debido a que los niveles de expresión de las isoformas varían tanto por el tipo de tejido como con la etapa de desarrollo (Rosa et al. 2020). Otra posible alternativa sería medir los niveles de proteína de IP<sub>3</sub>R y su forma activada, para calcular la razón IP<sub>3</sub>R/p-IP<sub>3</sub>R, lo cual nos podría entregar un mejor resultado, ya que los niveles totales podrían no variar, pero si hacerlo la forma fosforilada, todo esto con el fin de permitirnos sacar conclusiones definitivas acerca del efecto de AβOs y SAC en el IP<sub>3</sub>R.

De igual manera, se exploró el efecto de SAC sobre VDAC1, el cual es un canal de Ca<sup>+2</sup> ubicado en las membranas de las mitocondrias y se ha descrito como otro componente clave en las MAMs, específicamente VDAC1 permite la captación de Ca<sup>+2</sup> por este organelo y se relaciona con una sobrecarga de este

ion en las mitocondrias y la inducción de la apoptosis. Específicamente, se ha descrito como VDAC1 puede aumentar su expresión y oligomerizar en presencia de un inductor de la apoptosis pudiendo formar un poro en las membranas mitocondrias denominado mPTP, por el cual puede salir al medio intracelular DNA mitocondrial (mtDNA) (Wu et al. 2023), relación con proteínas pro-apoptóticas como el Citocromo C, además de su relación con proteínas antiapoptóticas como los miembros de la familia Bcl-2 (de Ridder et al. 2023), es por esto, que era importante analizar si SAC podía regular a esta proteína relacionada con el transporte de  $Ca^{+2}$  que se ha visto desregulado en la EA.

Al analizar los niveles de VDAC1 en células PC-12 tratadas con A $\beta$ Os por 24 horas se obtuvo un aumento en los niveles de proteína como se esperaba, debido a la relación de esta proteína con la muerte celular inducida por los A $\beta$ Os (Verma et al. 2022). Por otro lado, con los pretratamientos de SAC se evitó el incremento de esta proteína, lo cual se puede plantear como un posible mecanismo por el cual SAC evita la muerte inducida por A $\beta$ Os, debido a la relación que existe entre ROS y VDAC1, donde se ha visto que al tratar células con Bisfenol A incrementa la producción de ROS y disminuye la viabilidad celular, pero en cambio cuando las células presentan un silenciamiento de

VDAC1, se observar una menor perdida en la viabilidad celular inducida por Bisfenol A, por lo que VDAC1 estaría actuando como un conector entre el incremento de ROS y la inducción de la muerte celular (Wang et al. 2023).

En conjunto el resultado de que el pretratamiento de SAC incremento el efecto protector versus la toxicidad por A $\beta$ Os, junto con que el pretratamiento de SAC evito el incremento en los niveles de VDAC1, es compatible con las investigaciones de que SAC es capaz de incrementar las reservas de enzimas antioxidantes (Elmazoglu et al. 2021), lo cual permitiría a las células estar más preparadas cuando entren en contacto con los A $\beta$ Os y de esta forma no se produciría la sobreexpresión de VDAC1 disminuyendo la cantidad de células muertas.

Para comparar estos resultados se analizó los niveles de proteína por la fluorescencia obtenida en la técnica de inmunocitoquímica, en células PC-12 bajo las mismas condiciones experimentales anteriores, obteniéndose resultados que apoyan los mostrados anteriormente, donde los niveles de VDAC1 se incrementaron por el tratamiento con A $\beta$ Os en comparación con el control, pero esto disminuyo significativamente cuando las células recibieron el pretratamiento con SAC. Bajo esta metodología se obtuvieron variaciones mayores entre una condición y otra, pero esto puede deberse a la afinidad de los

anticuerpos y a como estos se comportan bajo diferentes metodologías experimentales.

Cuando se aplicó SAC como pretratamiento fue capaz de evitar el incremento en la expresión de VDAC1, esto refuerza aún más el resultado anteriormente expuesto, ya que nos demuestra por dos técnicas diferentes que SAC previene la sobreexpresión de VDAC1 inducida por los A $\beta$ O $s$ . Esto refuerza la hipótesis de que el efecto protector de SAC sobre viabilidad celular, podría tener relación con la mantención de los niveles de proteína de VDAC1, debido a que este tiene una relación directa en la inducción de la apoptosis por su relación con el Citocromo C (de Ridder et al. 2023) y su capacidad de permitir el paso del mtDNA al medio intracelular (Wu et al. 2023).

Posteriormente, se analizó el efecto que podría tener SAC, sobre el fenotipo mitocondrial fisionado descrito para los tratamientos con A $\beta$ O $s$  (Panés et al. 2020), y que se asocia a mitocondrias disfuncionales. Para esto se utilizó la técnica de inmunocitoquímica, usando TOM20 como un marcador mitocondrial como se ha llevado a cabo anteriormente en literatura (Panés et al. 2020). Con la señal obtenida se midió el tamaño relativo de las mitocondrias en las células PC-12 sometidas a las diferentes condiciones experimentales, donde se obtuvo tras los tratamientos con A $\beta$ O $s$  el fenotipo mitocondrias fisionado,

con estructuras granulares esperado (Panes et al. 2020), en cambio el pretratamiento de SAC dio como resultado una morfología mitocondrial más parecidas al control en su tamaño relativo. Este resultado nos da otro indicio de que SAC puede estar protegiendo en otro eje que conlleva a la muerte celular, como podría ser la escasez energética producto de la acumulación de aquellas mitocondrias fisionadas y disfuncionales.

Para finalizar, al analizar el efecto protector de SAC frente a la toxicidad inducida por los A $\beta$ O $s$ , se obtuvo el efecto esperado con A $\beta$ O $s$  de observarse una disminución del  $\Delta\Psi_m$  (Panes-Fernandez et al. 2023), lo que se relaciona con una disfunción mitocondrial y con la inducción de muerte celular, mientras que por otro lado, el tratamiento de SAC + A $\beta$ O $s$  mostro un efecto evitando la disminución del  $\Delta\Psi_m$ , lo que puede tener una relación directa con evitar la sobreexpresión de VDAC1 y con su capacidad para incrementar la actividad de enzimas encargadas de lidiar con el estrés oxidativo (Elmazoglu et al. 2021).

Este resultado también se complementa con lo descrito en literatura, donde se observó que una dieta enriquecida con SAC en ratones C57BL/6J con 60 semanas de edad aumentaba los niveles de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial como SIRT1 y PGC-1 $\alpha$ , lo que mejoraba la respuesta

al estrés oxidativo de forma similar a lo que podría estar ocurriendo en nuestro modelo de estudio (Chen et al. 2022).



## 6. CONCLUSIONES

Finalmente, con los resultados de esta tesis se puede concluir que:

- 1- SAC posee un efecto protector frente a la toxicidad inducida por los A $\beta$ O<sub>s</sub> en células PC-12, y que los pretratamientos con SAC son más eficaces para evitar la disminución de la viabilidad celular.
- 2- Los tratamientos con SAC evitaron el incremento de proteína de VDAC1, lo que podría ser un mecanismo por el cual se evita la apoptosis celular.
- 3- El cambio fenotípico de mitocondrias fisionadas inducido por los A $\beta$ O<sub>s</sub>, fue evitado por los pretratamientos de SAC, además de evitar la disminución de la actividad mitocondrial, lo que indica cuales podrían ser posibles mecanismos de protección ejercidos por SAC frente a la toxicidad amiloide.
- 4- Se plantea que SAC es capaz de ejercer un efecto protector preventivo frente a los A $\beta$ O<sub>s</sub>, debido a su capacidad de evitar el daño que se produce en las mitocondrias producto de los A $\beta$ O<sub>s</sub>.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer:

- Al proyecto FONDECYT 1200908, que permitió el financiamiento de este trabajo.
- A mi Profesor guía Dr. Jorge Fuentealba por el apoyo entregado y por siempre disponer de tiempo para debatir ideas.
- Agradecer a todo nuestro grupo del Laboratorio de Screening de Compuestos Neuroactivos por colaborar en el desarrollo de los experimentos que se realizaron y por estar dispuestos a discutir los resultados.
- A todo el departamento de Fisiología por el apoyo entregado, en especial al personal técnico del departamento.
- Agradecer a todos los amigos que conocí durante mis años en la Universidad de Concepción por gran apoyo.
- A toda mi familia, en especial a mi madre por su cariño incondicional, a mis hermanos, Felipe que me enseñó que uno siempre puede lograr lo que desea, Matías por enseñarme el placer de estudiar y aprender, Víctor mi hermano menor quien me enseñó mucho de como expresar los sentimientos, los quiero mucho.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- '2021 Alzheimer's disease facts and figures'. 2021. *Alzheimers Dement*, 17: 327-406.
- Abeti, R., M. H. Parkinson, I. P. Hargreaves, P. R. Angelova, C. Sandi, M. A. Pook, P. Giunti, and A. Y. Abramov. 2016. "Mitochondrial energy imbalance and lipid peroxidation cause cell death in Friedreich's ataxia", *Cell Death Dis*, 7: e2237.
- Abramov, A. Y., L. Canevari, and M. R. Duchen. 2004. 'Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture', *Biochim Biophys Acta*, 1742: 81-7.
- Adeoye, T., S. I. Shah, A. Demuro, D. A. Rabson, and G. Ullah. 2022. 'Upregulated Ca(2+) Release from the Endoplasmic Reticulum Leads to Impaired Presynaptic Function in Familial Alzheimer's Disease', *Cells*, 11.
- Ahmed, T., and C. K. Wang. 2021. 'Black Garlic and Its Bioactive Compounds on Human Health Diseases: A Review', *Molecules*, 26.
- Ai, J., H. Wang, P. Chu, A. Shopit, M. Niu, N. Ahmad, T. Tesfaldet, F. H. Wang, J. N. Fang, X. Li, S. J. Tang, Han Qing Ju, G. Han, J. Peng, and Z. Tang. 2021. 'The neuroprotective effects of phosphocreatine on Amyloid Beta 25-35-induced differentiated neuronal cell death through inhibition of AKT /GSK-3beta /Tau/APP /CDK5 pathways in vivo and vitro', *Free Radic Biol Med*, 162: 181-90.
- Ajoolabady, A., D. Lindholm, J. Ren, and D. Pratico. 2022. 'ER stress and UPR in Alzheimer's disease: mechanisms, pathogenesis, treatments', *Cell Death Dis*, 13: 706.
- Ajoolabady, A., S. Wang, G. Kroemer, D. J. Klionsky, V. N. Uversky, J. R. Sowers, H. Aslkhodapasandhokmabad, Y. Bi, J. Ge, and J. Ren. 2021. 'ER Stress in Cardiometabolic Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutics', *Endocr Rev*, 42: 839-71.
- Amagase, H., B. L. Petesch, H. Matsuura, S. Kasuga, and Y. Itakura. 2001. 'Intake of garlic and its bioactive components', *J Nutr*, 131: 955S-62S.
- Amano, H., D. Kazamori, K. Itoh, and Y. Kodera. 2015. 'Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of S-allyl-L-cysteine in rats and dogs', *Drug Metab Dispos*, 43: 749-55.
- Arbor, S. C., M. LaFontaine, and M. Cumbay. 2016. 'Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores', *Yale J Biol Med*, 89: 5-21.
- Atakpa-Adaji, P., and A. Ivanova. 2023. 'IP(3)R at ER-Mitochondrial Contact Sites: Beyond the IP(3)R-GRP75-VDAC1 Ca(2+) Funnel', *Contact (Thousand Oaks)*, 6: 25152564231181020.
- Atif, F., S. Yousuf, and S. K. Agrawal. 2009. 'S-allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus', *Brain Res*, 1265: 128-37.
- Boehning, D., R. L. Patterson, and S. H. Snyder. 2004. 'Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome c and inositol 1,4,5-trisphosphate', *Cell Cycle*, 3: 252-4.
- Bravo-Sagua, R., V. Parra, C. Ortiz-Sandoval, M. Navarro-Marquez, A. E. Rodriguez, N. Diaz-Valdivia, C. Sanhueza, C. Lopez-Crisosto, N. Tahbaz, B. A. Rothermel, J. A. Hill, M. Cifuentes, T. Simmen, A. F. G. Quest, and S. Lavandero. 2019. 'Caveolin-1 impairs PKA-DRP1-mediated remodelling of ER-mitochondria communication during the early phase of ER stress', *Cell Death Differ*, 26: 1195-212.
- Buchanan, H., M. Mackay, K. Palmer, K. Tothova, M. Katsur, B. Platt, and D. J. Koss. 2020. 'Synaptic Loss, ER Stress and Neuro-Inflammation Emerge Late in the Lateral Temporal Cortex and Associate with Progressive Tau Pathology in Alzheimer's Disease', *Mol Neurobiol*, 57: 3258-72.
- Bueno, K. O., L. de Souza Resende, A. F. Ribeiro, D. M. Dos Santos, E. C. Goncalves, F. A. Vigil, I. F. de Oliveira Silva, L. F. Ferreira, A. M. de Castro Pimenta, and A. M. Ribeiro. 2015. 'Spatial cognitive deficits in an animal model of Wernicke-Korsakoff syndrome are related to changes in thalamic VDAC protein concentrations', *Neuroscience*, 294: 29-37.

- Callens, M., J. Loncke, and G. Bultynck. 2022. 'Dysregulated Ca(2+) Homeostasis as a Central Theme in Neurodegeneration: Lessons from Alzheimer's Disease and Wolfram Syndrome', *Cells*, 11.
- Chami, M., and F. Checler. 2020. 'Alterations of the Endoplasmic Reticulum (ER) Calcium Signaling Molecular Components in Alzheimer's Disease', *Cells*, 9.
- Chapman, C. A., J. L. Nuwer, and T. C. Jacob. 2022. 'The Yin and Yang of GABAergic and Glutamatergic Synaptic Plasticity: Opposites in Balance by Crosstalking Mechanisms', *Front Synaptic Neurosci*, 14: 911020.
- Chauhan, N. B. 2006. 'Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576', *J Ethnopharmacol*, 108: 385-94.
- Chen, P. H., C. H. Chang, W. S. Lin, K. Nagabhushanam, C. T. Ho, and M. H. Pan. 2022. 'S-Allylcysteine Ameliorates Aging Features via Regulating Mitochondrial Dynamics in Naturally Aged C57BL/6J Mice', *Mol Nutr Food Res*, 66: e2101077.
- Chen, S., X. Ge, Y. Chen, N. Lv, Z. Liu, and W. Yuan. 2013. 'Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research', *Drug Des Devel Ther*, 7: 117-25.
- Chen, X., J. Drew, W. Berney, and W. Lei. 2021. 'Neuroprotective Natural Products for Alzheimer's Disease', *Cells*, 10.
- Cline, E. N., A. Das, M. A. Bicca, S. N. Mohammad, L. F. Schachner, J. M. Kamel, N. DiNunno, A. Weng, J. D. Paschall, R. L. Bu, F. M. Khan, M. G. Rollins, A. N. Ives, G. Shekhawat, N. Nunes-Tavares, F. G. de Mello, P. D. Compton, N. L. Kelleher, and W. L. Klein. 2019. 'A novel crosslinking protocol stabilizes amyloid beta oligomers capable of inducing Alzheimer's-associated pathologies', *J Neurochem*, 148: 822-36.
- Collaborators, G. B. D. Dementia Forecasting. 2022. 'Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019', *Lancet Public Health*, 7: e105-e25.
- Craig, L. A., N. S. Hong, and R. J. McDonald. 2011. 'Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease', *Neurosci Biobehav Rev*, 35: 1397-409.
- Cuadrado-Tejedor, M., M. Vilarino, F. Cabodevilla, J. Del Rio, D. Frechilla, and A. Perez-Mediavilla. 2011. 'Enhanced expression of the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) in Alzheimer's disease transgenic mice: an insight into the pathogenic effects of amyloid-beta', *J Alzheimers Dis*, 23: 195-206.
- Dabravolski, S. A., N. G. Nikiforov, A. D. Zhuravlev, N. A. Orekhov, A. V. Grechko, and A. N. Orekhov. 2022. 'Role of the mtDNA Mutations and Mitophagy in Inflammaging', *Int J Mol Sci*, 23.
- de Ridder, I., M. Kerkhofs, F. O. Lemos, J. Loncke, G. Bultynck, and J. B. Parys. 2023. 'The ER-mitochondria interface, where Ca(2+) and cell death meet', *Cell Calcium*, 112: 102743.
- Dunot, J., A. Ribera, P. A. Pousinha, and H. Marie. 2023. 'Spatiotemporal insights of APP function', *Curr Opin Neurobiol*, 82: 102754.
- Dunys, J., A. Valverde, and F. Checler. 2018. 'Are N- and C-terminally truncated Aβ species key pathological triggers in Alzheimer's disease?', *J Biol Chem*, 293: 15419-28.
- Duran-Aniotz, C., V. H. Cornejo, S. Espinoza, A. O. Ardiles, D. B. Medinas, C. Salazar, A. Foley, I. Gajardo, P. Thielen, T. Iwakaki, W. Scheper, C. Soto, A. G. Palacios, J. J. M. Hoozemans, and C. Hetz. 2017. 'IRE1 signaling exacerbates Alzheimer's disease pathogenesis', *Acta Neuropathol*, 134: 489-506.
- Ebrahimi, R., and A. Golestani. 2022. 'The emerging role of noncoding RNAs in neuroinflammation: Implications in pathogenesis and therapeutic approaches', *J Cell Physiol*, 237: 1206-24.
- Elmazoglu, Z., S. Galvan-Arzate, M. Aschner, E. Rangel-Lopez, O. Bayraktar, A. Santamaria, and C. Karasu. 2021. 'Redox-active phytoconstituents ameliorate cell damage and inflammation in rat hippocampal neurons exposed to hyperglycemia+Aβ(1-42) peptide', *Neurochem Int*, 145: 104993.
- Ferreira, S. T., M. V. Lourenco, M. M. Oliveira, and F. G. De Felice. 2015. 'Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease', *Front Cell Neurosci*, 9: 191.
- Fuentealba, J., A. J. Dibarrart, M. C. Fuentes-Fuentes, F. Saez-Orellana, K. Quinones, L. Guzman, C. Perez, J. Becerra, and L. G. Aguayo. 2011. 'Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid-beta aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract', *J Neurosci Res*, 89: 1499-508.

- Fukumoto, K., H. Mizoguchi, H. Takeuchi, H. Horiuchi, J. Kawanokuchi, S. Jin, T. Mizuno, and A. Suzumura. 2014. 'Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid beta-induced memory impairment', *Behav Brain Res*, 268: 88-93.
- Gao, X., and Y. Xu. 2021. 'Therapeutic Effects of Natural Compounds and Small Molecule Inhibitors Targeting Endoplasmic Reticulum Stress in Alzheimer's Disease', *Front Cell Dev Biol*, 9: 745011.
- Ghazimoradi, M. M., E. Ghoushi, M. Ghobadi Pour, H. Karimi Ahmadabadi, and M. Rafeian-Kopaei. 2023. 'A review on garlic as a supplement for Alzheimer's disease: a mechanistic insight in its direct and indirect effects', *Curr Pharm Des*.
- Ghemrawi, R., and M. Khair. 2020. 'Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases', *Int J Mol Sci*, 21.
- Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran, and S. Sisodia. 2012. 'Trafficking and proteolytic processing of APP', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006270.
- Habiba, U., S. Merlin, J. K. H. Lim, V. H. Y. Wong, C. T. O. Nguyen, J. W. Morley, B. V. Bui, and M. Tayebi. 2020. 'Age-Specific Retinal and Cerebral Immunodetection of Amyloid-beta Plaques and Oligomers in a Rodent Model of Alzheimer's Disease', *J Alzheimers Dis*, 76: 1135-50.
- Ham, S. J., D. Lee, H. Yoo, K. Jun, H. Shin, and J. Chung. 2020. 'Decision between mitophagy and apoptosis by Parkin via VDAC1 ubiquitination', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117: 4281-91.
- Hambali, A., J. Kumar, N. F. M. Hashim, S. Maniam, M. Z. Mehat, M. S. Cheema, M. Mustapha, M. I. Adenan, J. Stanslas, and H. A. Hamid. 2021. 'Hypoxia-Induced Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Potential Neuroprotective Effects of Centella asiatica', *Front Physiol*, 12: 712317.
- Harris, J. J., R. Jolivet, and D. Attwell. 2012. 'Synaptic energy use and supply', *Neuron*, 75: 762-77.
- Ho, J. N., M. Kang, S. Lee, J. J. Oh, S. K. Hong, S. E. Lee, and S. S. Byun. 2018. 'Anticancer effect of S-allyl-L-cysteine via induction of apoptosis in human bladder cancer cells', *Oncol Lett*, 15: 623-29.
- Hoiland-Carlsen, P. F., M. E. Revheim, T. Costa, A. Alavi, K. P. Kepp, S. L. Sensi, G. Perry, N. K. Robakis, J. R. Barrio, and B. Vissel. 2023. 'Passive Alzheimer's immunotherapy: A promising or uncertain option?', *Ageing Res Rev*, 90: 101996.
- Holtzman, D. M., J. C. Morris, and A. M. Goate. 2011. 'Alzheimer's disease: the challenge of the second century', *Sci Transl Med*, 3: 77sr1.
- Hwang, Y. P., H. G. Kim, J. H. Choi, M. T. Do, Y. C. Chung, T. C. Jeong, and H. G. Jeong. 2013. 'S-allyl cysteine attenuates free fatty acid-induced lipogenesis in human HepG2 cells through activation of the AMP-activated protein kinase-dependent pathway', *J Nutr Biochem*, 24: 1469-78.
- Imai, T., Y. Kosuge, K. Endo-Umeda, H. Miyagishi, K. Ishige, M. Makishima, and Y. Ito. 2014. 'Protective effect of S-allyl-L-cysteine against endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death is mediated by inhibition of calpain', *Amino Acids*, 46: 385-93.
- Ito, Y., Y. Kosuge, T. Sakikubo, K. Horie, N. Ishikawa, N. Obokata, E. Yokoyama, K. Yamashina, M. Yamamoto, H. Saito, M. Arakawa, and K. Ishige. 2003. 'Protective effect of S-allyl-L-cysteine, a garlic compound, on amyloid beta-protein-induced cell death in nerve growth factor-differentiated PC12 cells', *Neurosci Res*, 46: 119-25.
- Jang, H., F. T. Arce, S. Ramachandran, R. Capone, R. Lal, and R. Nussinov. 2010. 'beta-Barrel topology of Alzheimer's beta-amyloid ion channels', *J Mol Biol*, 404: 917-34.
- Jeong, Y. Y., N. Jia, D. Ganesan, and Q. Cai. 2022. 'Broad activation of the PRKN pathway triggers synaptic failure by disrupting synaptic mitochondrial supply in early tauopathy', *Autophagy*: 1-3.
- Kaku, T., K. Tsukakoshi, and K. Ikebukuro. 2021. 'Cytotoxic Aβ Protofilaments Are Generated in the Process of Aβ Fibril Disaggregation', *Int J Mol Sci*, 22.
- Katayama, T., K. Imaizumi, T. Manabe, J. Hitomi, T. Kudo, and M. Tohyama. 2004. 'Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease', *J Chem Neuroanat*, 28: 67-78.
- Kimura, S., Y. C. Tung, M. H. Pan, N. W. Su, Y. J. Lai, and K. C. Cheng. 2017. 'Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application', *J Food Drug Anal*, 25: 62-70.

- Klein, S., A. Goldman, H. Lee, S. Ghahremani, V. Bhakta, Ucla Clinical Genomics Center, S. F. Nelson, and J. A. Martinez-Agosto. 2016. 'Truncating mutations in APP cause a distinct neurological phenotype', *Ann Neurol*, 80: 456-60.
- Koopman, M. B., L. Ferrari, and S. G. D. Rudiger. 2022. 'How do protein aggregates escape quality control in neurodegeneration?', *Trends Neurosci*.
- Kosuge, Y. 2020. 'Neuroprotective mechanisms of S-allyl-L-cysteine in neurological disease', *Exp Ther Med*, 19: 1565-69.
- Kumar, V. 2006. 'Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview', *Phytother Res*, 20: 1023-35.
- Lackner, L. L., and G. K. Voeltz. 2017. 'The mechanisms and functions of interorganelle interactions', *Mol Biol Cell*, 28: 703-04.
- Liu, K. Y., N. Villain, S. Ayton, S. F. Ackley, V. Planche, R. Howard, and M. Thambisetty. 2023. 'Key questions for the evaluation of anti-amyloid immunotherapies for Alzheimer's disease', *Brain Commun*, 5: fcad175.
- Lloret, A., D. Esteve, M. A. Lloret, P. Monllor, B. Lopez, J. L. Leon, and A. Cervera-Ferri. 2021. 'Is Oxidative Stress the Link Between Cerebral Small Vessel Disease, Sleep Disruption, and Oligodendrocyte Dysfunction in the Onset of Alzheimer's Disease?', *Front Physiol*, 12: 708061.
- Long, J. M., and D. M. Holtzman. 2019. 'Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies', *Cell*, 179: 312-39.
- Manczak, M., and P. H. Reddy. 2012. 'Abnormal interaction of VDAC1 with amyloid beta and phosphorylated tau causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease', *Hum Mol Genet*, 21: 5131-46.
- Marcondes, N. A., S. R. Terra, C. S. Lasta, N. R. C. Hlavac, M. L. Dalmolin, L. A. Lacerda, G. A. M. Faulhaber, and F. H. D. Gonzalez. 2019. 'Comparison of JC-1 and MitoTracker probes for mitochondrial viability assessment in stored canine platelet concentrates: A flow cytometry study', *Cytometry A*, 95: 214-18.
- Matthes, D., and B. L. de Groot. 2023. 'Molecular dynamics simulations reveal the importance of amyloid-beta oligomer beta-sheet edge conformations in membrane permeabilization', *J Biol Chem*, 299: 103034.
- Mattson, M. P., F. M. LaFerla, S. L. Chan, M. A. Leissring, P. N. Shepel, and J. D. Geiger. 2000. 'Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders', *Trends Neurosci*, 23: 222-9.
- Mohamed Asik, R., N. Suganthy, M. A. Aarifa, A. Kumar, K. Szigeti, D. Mathe, B. Gulyas, G. Archunan, and P. Padmanabhan. 2021. 'Alzheimer's Disease: A Molecular View of beta-Amyloid Induced Morbific Events', *Biomedicines*, 9.
- Moreno-Gonzalez, I., G. Edwards, 3rd, R. Morales, C. Duran-Aniotz, G. Escobedo, Jr., M. Marquez, M. Pumarola, and C. Soto. 2021. 'Aged Cattle Brain Displays Alzheimer's Disease-Like Pathology and Promotes Brain Amyloidosis in a Transgenic Animal Model', *Front Aging Neurosci*, 13: 815361.
- Mukherjee, A., R. Al-Lahham, M. E. Corkins, S. Samanta, A. M. Schmeichel, W. Singer, P. A. Low, T. Govindaraju, and C. Soto. 2021. 'Identification of Multicolor Fluorescent Probes for Heterogeneous Abeta Deposits in Alzheimer's Disease', *Front Aging Neurosci*, 13: 802614.
- Muller, U. C., T. Deller, and M. Korte. 2017. 'Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family', *Nat Rev Neurosci*, 18: 281-98.
- Nagar, P., P. Sharma, R. Dhapola, S. Kumari, B. Medhi, and D. HariKrishnaReddy. 2023. 'Endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease: Molecular mechanisms and therapeutic prospects', *Life Sci*, 330: 121983.
- Nishiyama, N., T. Moriguchi, N. Morihara, and H. Saito. 2001. 'Ameliorative effect of S-allylcysteine, a major thioallyl constituent in aged garlic extract, on learning deficits in senescence-accelerated mice', *J Nutr*, 131: 1093S-5S.
- Ono, K. 2018. 'Alzheimer's disease as oligomeropathy', *Neurochem Int*, 119: 57-70.
- Onozato, M., H. Nakanoue, T. Sakamoto, M. Umino, and T. Fukushima. 2023. 'Determination of d- and l-Amino Acids in Garlic Foodstuffs by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry', *Molecules*, 28.
- Panes-Fernandez, J., P. A. Godoy, J. Gavilan, O. Ramirez-Molina, C. F. Burgos, A. Marileo, O. Flores-Nunez, P. A. Castro, G. Moraga-Cid, G. E. Yevenes, C. Munoz-Montesino, and J. Fuentealba. 2023. 'TG2

- promotes amyloid beta aggregates: Impact on ER-mitochondria crosstalk, calcium homeostasis and synaptic function in Alzheimer's disease', *Biomed Pharmacother*, 162: 114596.
- Panes, J. D., P. A. Godoy, T. Silva-Grecchi, M. T. Celis, O. Ramirez-Molina, J. Gavilan, C. Munoz-Montecino, P. A. Castro, G. Moraga-Cid, G. E. Yevenes, L. Guzman, J. L. Salisbury, E. Trushina, and J. Fuentealba. 2020. 'Changes in PGC-1alpha/SIRT1 Signaling Impact on Mitochondrial Homeostasis in Amyloid-Beta Peptide Toxicity Model', *Front Pharmacol*, 11: 709.
- Pannuzzo, M. 2022. 'Beta-amyloid pore linked to controlled calcium influx into the cell: A new paradigm for Alzheimer's Disease', *Alzheimers Dement*, 18: 191-96.
- Paschen, W., and T. Mengesdorf. 2005. 'Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration', *Cell Calcium*, 38: 409-15.
- Pinton, P. 2018. 'Mitochondria-associated membranes (MAMs) and pathologies', *Cell Death Dis*, 9: 413.
- 'Recent Advances on the Nutritional Effects Associated with the Use of Garlic as a Supplement. November 15-17, 1998. Newport Beach, California, USA. Proceedings'. 2001. *J Nutr*, 131: 951S-1123S.
- Reitz, C., M. A. Pericak-Vance, T. Foroud, and R. Mayeux. 2023. 'A global view of the genetic basis of Alzheimer disease', *Nat Rev Neurol*, 19: 261-77.
- Ricciarelli, R., and E. Fedele. 2017. 'The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind', *Curr Neuropharmacol*, 15: 926-35.
- Ried, K., O. R. Frank, and N. P. Stocks. 2010. 'Aged garlic extract lowers blood pressure in patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomised controlled trial', *Maturitas*, 67: 144-50.
- Rosa, N., F. Sneyers, J. B. Parys, and G. Bultynck. 2020. 'Type 3 IP(3) receptors: The chameleon in cancer', *Int Rev Cell Mol Biol*, 351: 101-48.
- Ryan, K. C., Z. Ashkavand, and K. R. Norman. 2020. 'The Role of Mitochondrial Calcium Homeostasis in Alzheimer's and Related Diseases', *Int J Mol Sci*, 21.
- Scheltens, P., K. Blennow, M. M. Breteler, B. de Strooper, G. B. Frisoni, S. Salloway, and W. M. Van der Flier. 2016. 'Alzheimer's disease', *Lancet*, 388: 505-17.
- Scott, L. J., and K. L. Goa. 2000. 'Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease', *Drugs*, 60: 1095-122.
- Shao, L., Y. Zhang, Y. Hao, and Y. Ping. 2022. 'Upregulation of IP(3) receptor mediates APP-induced defects in synaptic downscaling and sleep homeostasis', *Cell Rep*, 38: 110594.
- Shoshan-Barmatz, V., S. De, and A. Meir. 2017. 'The Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1, Ca(2+) Transport, Apoptosis, and Their Regulation', *Front Oncol*, 7: 60.
- Shoshan-Barmatz, V., E. Nahon-Crystal, A. Shteinfer-Kuzmine, and R. Gupta. 2018. 'VDAC1, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease', *Pharmacol Res*, 131: 87-101.
- Small, S. A., and S. Gandy. 2006. 'Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis', *Neuron*, 52: 15-31.
- Smilansky, A., L. Dangoor, I. Nakdimon, D. Ben-Hail, D. Mizrachi, and V. Shoshan-Barmatz. 2015. 'The Voltage-dependent Anion Channel 1 Mediates Amyloid beta Toxicity and Represents a Potential Target for Alzheimer Disease Therapy', *J Biol Chem*, 290: 30670-83.
- Teli, P., A. Nachanekar, V. Kale, and A. Vaidya. 2023. 'Priming mesenchymal stromal cells with neurotrophic factors boosts the neuro-regenerative potential of their secretome', *Regen Med*, 18: 329-46.
- Uddin, M. S., D. Tewari, G. Sharma, M. T. Kabir, G. E. Barreto, M. N. Bin-Jumah, A. Perveen, M. M. Abdel-Daim, and G. M. Ashraf. 2020. 'Molecular Mechanisms of ER Stress and UPR in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease', *Mol Neurobiol*, 57: 2902-19.
- van der Kant, R., and L. S. Goldstein. 2015. 'Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia', *Dev Cell*, 32: 502-15.
- Venkatesan, R., E. Ji, and S. Y. Kim. 2015. 'Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: a comprehensive review', *Biomed Res Int*, 2015: 814068.
- Verma, A., A. Shteinfer-Kuzmine, N. Kamenetsky, S. Pittala, A. Paul, E. Nahon Crystal, A. Ouro, V. Chalifa-Caspi, S. K. Pandey, A. Monsonogo, N. Vardi, S. Knafo, and V. Shoshan-Barmatz. 2022. 'Targeting the overexpressed mitochondrial protein VDAC1 in a mouse model of Alzheimer's disease protects against mitochondrial dysfunction and mitigates brain pathology', *Transl Neurodegener*, 11: 58.

- Viana, R. J., A. F. Nunes, and C. M. Rodrigues. 2012. 'Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease', *Mol Neurobiol*, 46: 522-34.
- Walker, L. C. 2020. 'Abeta Plaques', *Free Neuropathol*, 1.
- Wang, H., Y. Li, C. Liu, T. Lu, Q. Zhai, H. Wang, and J. Zhang. 2023. 'Inhibition of VDAC1 prevents oxidative stress and apoptosis induced by bisphenol A in spermatogonia via AMPK/mTOR signaling pathway', *J Toxicol Sci*, 48: 109-19.
- Wang, Z. J., F. Zhao, C. F. Wang, X. M. Zhang, Y. Xiao, F. Zhou, M. N. Wu, J. Zhang, J. S. Qi, and W. Yang. 2019. 'Xestospongins C, a Reversible IP3 Receptor Antagonist, Alleviates the Cognitive and Pathological Impairments in APP/PS1 Mice of Alzheimer's Disease', *J Alzheimers Dis*, 72: 1217-31.
- Winder, Z., T. L. Sudduth, S. Anderson, E. Patel, J. Neltner, B. J. Martin, K. E. Snyder, E. L. Abner, G. A. Jicha, P. T. Nelson, and D. M. Wilcock. 2022. 'Examining the association between blood-based biomarkers and human post mortem neuropathology in the University of Kentucky Alzheimer's Disease Research Center autopsy cohort', *Alzheimers Dement*.
- Wu, N. N., L. Wang, L. Wang, X. Xu, G. D. Lopaschuk, Y. Zhang, and J. Ren. 2023. 'Site-specific ubiquitination of VDAC1 restricts its oligomerization and mitochondrial DNA release in liver fibrosis', *Exp Mol Med*, 55: 269-80.
- Wu, Y., Q. Chen, B. Wen, N. Wu, B. He, and J. Chen. 2021. 'Berberine Reduces Abeta42 Deposition and Tau Hyperphosphorylation via Ameliorating Endoplasmic Reticulum Stress', *Front Pharmacol*, 12: 640758.
- Xu, S., P. Yang, K. Qian, Y. Li, Q. Guo, P. Wang, R. Meng, J. Wu, J. Cao, Y. Cheng, M. Xu, and Q. Zhang. 2022. 'Modulating autophagic flux via ROS-responsive targeted micelles to restore neuronal proteostasis in Alzheimer's disease', *Bioact Mater*, 11: 300-16.
- Xuan, W. T., H. Wang, P. Zhou, T. Ye, H. W. Gao, S. Ye, J. H. Wang, M. L. Chen, H. Song, Y. Wang, and B. Cai. 2020. 'Berberine ameliorates rats model of combined Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus via the suppression of endoplasmic reticulum stress', *3 Biotech*, 10: 359.
- Yin, Z., D. Gao, K. Du, C. Han, Y. Liu, Y. Wang, and X. Gao. 2022. 'Rhein Ameliorates Cognitive Impairment in an APP/PS1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease by Relieving Oxidative Stress through Activating the SIRT1/PGC-1alpha Pathway', *Oxid Med Cell Longev*, 2022: 2524832.
- Yoshida, N., Y. Kato, H. Takatsu, and K. Fukui. 2022. 'Relationship between Cognitive Dysfunction and Age-Related Variability in Oxidative Markers in Isolated Mitochondria of Alzheimer's Disease Transgenic Mouse Brains', *Biomedicines*, 10.
- Young, J. K. 2020. 'Neurogenesis Makes a Crucial Contribution to the Neuropathology of Alzheimer's Disease', *J Alzheimers Dis Rep*, 4: 365-71.
- Yuan, H., Q. Ma, L. Ye, and G. Piao. 2016. 'The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products', *Molecules*, 21.
- Zhang, Q., Q. Jiang, K. Sa, J. Liang, D. Sun, H. Li, and L. Chen. 2023. 'Research progress of plant-derived natural alkaloids in central nervous system diseases', *Phytother Res*.
- Zhao, L., and S. L. Ackerman. 2006. 'Endoplasmic reticulum stress in health and disease', *Curr Opin Cell Biol*, 18: 444-52.
- Zhou, W. S., M. Silva, C. Yang, S. Li, Y. T. Chen, and W. H. Zheng. 2023. 'Mechanism and Molecular Targets of a Water-Soluble Extract of *Artemisia annua* on the Treatment of Alzheimer's Disease Based on Network Pharmacology and Experimental Validation', *Am J Chin Med*, 51: 595-622.
- Zucker, R. S., and W. G. Regehr. 2002. 'Short-term synaptic plasticity', *Annu Rev Physiol*, 64: 355-405.