



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias
Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

**ROL DE AMPK EN LA REMODELACIÓN MFN2-DEPENDIENTE DE LOS
CONTACTOS RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO-MITOCONDRIA
INDUCIDA POR OLIGÓMEROS SOLUBLES DE A β EN MODELOS DE
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

OSCAR GUILLERMO RAMÍREZ MOLINA
CONCEPCIÓN – CHILE
2026

Profesor Guía: Dr. Jorge Fuentealba Arcos
Dpto. de Fisiología, Facultad de Cs. Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Jorge Fuentealba Arcos
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Katterine Salazar Martínez
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Félix Urra Faúndez
Profesor Evaluador Externo
Universidad de Chile

Dra. Marcela Torrejón Quezada
Directora
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas

Presentación

Esta tesis de doctorado fue dirigida por el Dr. Jorge Fuentealba Arcos en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Durante el periodo de permanencia en el Doctorado se realizaron las siguientes actividades y se generaron los siguientes productos:

Publicaciones:

- **2026:** Verbal F, Rubilar N, Marileo AM, Fierro H, **Ramirez-Molina OG**, Pinto-Leon A, Yevénes GE, Fuentealba J and Panes-Fernández J (2026) Current perspectives on circadian regulation of mitochondrial dynamics in mood disorders and perioperative stress. *Front. Pharmacol.* 17:1723748. doi: 10.3389/fphar.2026.1723748
- **2026:** Nguyen, T.K.O., Trushin, S.A., Ostroot, M., **Ramirez-Molina, O.** and Trushina, E. Mild Inhibition of Mitochondrial Complex I Activates Neuroprotective Mechanisms by Enhancing Glucose Uptake and Restoring Energy Homeostasis in Alzheimer's Disease Models. *Alzheimer's Dement.*, 21: e104475. https://doi.org/10.1002/alz70855_104475
- **2026:** Meza, Macarena E.; **Ramirez-Molina, Oscar**; et al. "Neuronal ion channel modulation by *Drimys winteri* compounds: Opening a new chemical space to neuropharmacology." *Neural Regeneration Research* 21(4): p 1373-1382. DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-24-01194
- **2025:** Pablo S. Cavagnero, Yaíma Sánchez, Brian Fell, **Oscar Ramírez Molina**, et al. "Neuroprotective Activity of 3-((6-(Phenylethynyl)pyridin-3-yl)oxy)quinuclidine: A Potential Ligand for the Treatment of Alzheimer's Disease."

ACS Chemical Neuroscience 16 (23), 4502-4510. DOI: 10.1021/acscchemneuro.5c00527

- **2025:** Camila Millar-Obreque; Vicente González-Muñoz; Ana M. Marileo; Bernardita Salgado-Martínez; Krishna Gaete-Riquelme; **Oscar Ramírez-Molina**; Pamela A. Godoy; Jorge Fuentealba; Gonzalo E. Yévenes; Carlos F. Burgos. "In Silico Characterization of Gelsemium Compounds as Glycine Receptor Ligands." *Compounds*, 5, 40.
- **2023:** Paula Lizana, Ricardo Godoy, Francheska Martínez, Dieter Wicher, Sabine Kaltofen, Leonardo Guzmán, **Oscar Ramírez**, Diego Cifuentes, Ana Mutis, Herbert Venthur. "A highly conserved plant volatile odorant receptor detects a sex pheromone component of the greater wax moth, *Galleria mellonella*." *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 163, 104031.
- **2023:** Gavilan, Javiera... **Ramírez, Oscar**, et al. "Increases Calpain-1 Levels by P2X2R Activation Promote the Amyloidogenic Pathway and B-Amyloid Peptide Generation." *IBRO Neuroscience Reports*, Vol 15, S413.
- **2023:** Gavilán, Javiera... **Ramírez-Molina, Oscar**, et al. "Elephant Black Garlic's Beneficial Properties for Hippocampal Neuronal Network, Chemical Characterization and Biological Evaluation." *Foods* 12(21):3968.
- **2023:** Panes-Fernandez, Jessica... **Ramírez-Molina, Oscar**, et al. "TG2 promotes amyloid β aggregates: Impact on ER-mitochondria crosstalk, calcium homeostasis and synaptic function in Alzheimer's disease." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 162(9):114596.
- **2022:** Panes, Jessica D **Ramirez-Molina, Oscar**, et al. "Deciphering the role of PGC-1 in neurological disorders: From mitochondrial dysfunction to synaptic failure." *Neural Regeneration Research* 17(2):237-245.

- **2021:** Pamela A. Godoy... **Oscar Ramírez-Molina**, et al. "Increased P2×2 receptors induced by amyloid-β peptide participates in the neurotoxicity in Alzheimer's disease." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 142(1):111968.

Presentaciones a congresos internacionales:

- **Ramírez-Molina, O.**, et al. "P2X2 receptor overexpression increases mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes through the activation of P2X2R-AMPK axis in cellular models of Alzheimer's Disease." Society for Neuroscience, Washington DC, USA. November 11–15, 2023.
- P. Godoy, **O. Ramírez-Molina**, R. García-Campillay, C. Millar-Obreque, C.F. Burgos. Screening for novel modulators of hP2X2 and hP2X4 receptors using an in silico approach. FENS, Viena, Austria, 2024.
- O. Flores, J. Panes, **O. Ramírez Molina**, R. Duran, M. Meza, J. Gavilán, J. Fuentealba, P. A. Godoy. Changes in the cGAS-STING1 pathway induced by β-Amyloid oligomers to conditionate the IR stress and synaptic dysfunction. Society for Neuroscience. Washington DC, USA, 2023.

Congresos nacionales

- P2X2R-Sigma-1R Crosstalk: Implications for Neuromodulation in Alzheimer's Disease. Authors: Rubilar, N1., Pinto-León, A1., Verbal, F1., Panes-Fernandez, J1., Gavilán, J1., **Ramírez-Molina, O1.**, Burgos, CF1., Fuentealba, J1. CUARTO ENCUENTRO DE ESTUDIANTES DE POSTGRADO CRUCH Biobío-Ñuble, ExpoPoster 2025. Universidad de Concepción, Chile.
- Evaluation of Sigma-1R–P2X2 coupling in the modulation of ATP-gated currents: structural and electrophysiological evidence. Authors: Nicole Rubilar¹,

Araceli Pinto¹, Florencia Verbal¹, Javiera Gavilán¹, **Oscar Ramirez¹**, Jessica Panes¹, Jorge Fuentealba¹. Congreso: XXXVII Reunión Anual de la SBCCH 2025. Puerto Varas, Chile. noviembre, 2025.

- Fuentealba J., Panes D., Gavilan J., Vega JL., Godoy P., Espinoza N., **Ramírez-Molina O.**, PintoLeon A. Role of the P2X2 receptor in the cellular mechanisms of neurogeneration, the example of Alzheimer's disease. XLV Annual Congress of the Pharmacology Society of Chile. Viña del Mar, Chile, 2024.
- Robinson Duran-Arcos, Pamela Godoy, Jessica Panes-Fernández, Javiera Gavilan, **Oscar RamirezMolina**, Macarena Meza, Oscar Flores, Gonzalo Yevenes, Jorge Fuentealba-Arcos. Protective Role of S-Allyl-Cysteine Against Soluble β -Amyloid Peptide Oligomers Through Modulation of VDAC1 Level. XLIV Annual Congress of the Pharmacology Society of Chile. Antofagasta, Chile, 2023.
- J. Gavilan, J. Panes-Fernandez, P. Godoy, **O. Ramirez-Molina**, P. Castro, G. Yevenes, G. Moraga and J. Fuentealba. Increases calpain-1 levels by P2X2R activation promote the amyloidogenic pathway and β -amyloid peptide generation. 11th IBRO World Congress of Neuroscience. Granada, España, 2023.
- J. Gavilan, J. Panes-Fernandez, P. Godoy, **O. Ramirez-Molina**, P. Castro, C. Muñoz, G. Yevenes, G. Moraga and J. Fuentealba. Increases calpain-1 levels by P2X2R activation promote the amyloidogenic pathway and β -amyloid peptide generation. XLIII Annual Congress of the Pharmacology Society of Chile. Punta Arenas, Chile, 2022.
- J. Gavilan, J. Panes-Fernandez, P. A. Godoy, **O. Ramirez**, R. Duran, P. A. Castro, C. MunozMontesinos, G. Yevenes, G. Moraga, E. L. Jara and J. Fuentealba. Increases calpain-1 levels by P2X2R activation promote the A β peptide generation & potentiate their cellular toxicity. Society for Neuroscience. San Diego, USA, 2022.
- Panes-Fernández J., Godoy P., Gavilán J., **Ramírez-Molina O.**, Flores O., Burgos C.F., Marileo A., Yévenes G., Muñoz-Montesino C., Salisbury J., Trushina E.

and Fuentealba J. Novel mitochondrial strategies to modulate Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contacts formation on Alzheimer disease: the role of inhibitors of mitochondria complex I and transglutaminase type 2. XLIII Annual Congress of the Pharmacological Society of Chile. Punta Arenas, 2022.

Becas

Durante la permanencia en el doctorado, la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) otorgó las siguientes becas:

- Beca ANID 21211001 para Estudios de Doctorado en Chile. 2021
- Beneficio complementario Beca ANID 24240214 para Gastos Operacionales del Proyecto de Tesis Doctoral. Enero 2024
- Beneficio complementario Beca ANID 752230032 para Pasantía Doctoral en Laboratorio de Neurobiología y Terapéutica Mitocondrial, dirigido por la Dra. Eugenia Trushina, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, Estados Unidos. Mayo a septiembre de 2024.
- Beneficio complementario Beca ANID 232250181 Extensión para Redacción de Tesis Doctoral. Marzo 2025

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por el proyecto Fondecyt Regular 1200908 y FOVI220166 del Dr. Jorge Fuentealba Arcos y por los fondos comunes del departamento de Fisiología de la Universidad de Concepción.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mi tutor de tesis, Dr. Jorge Fuentealba Arcos, quien desde mis estudios de pregrado me ha apoyado y motivado a seguir estudiando e investigando. Su guía, apoyo y acompañamiento han sido fundamentales en mi formación como científico creativo y con pensamiento crítico.

También quiero agradecer a los profesores integrantes de esta comisión evaluadora: Dra. Katterine Salazar, Dr. Gonzalo Yévenes y Dr. Félix Urra, quienes se dieron el tiempo de leer mi proyecto de tesis, mis avances y el manuscrito final, realizando críticas constructivas que contribuyeron significativamente a mejorar la calidad de este trabajo.

Agradezco también al equipo técnico y auxiliar del Departamento de Fisiología, especialmente a Ixia Cid y Jocelin González, por todo su apoyo y buena disposición durante la realización de esta tesis.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio: a la Dra. Pamela Godoy, por ser un pilar fundamental en mi investigación, una guía y mentora, además de ser una excelente amiga; a la Dra. Jessica Panes, por haberme dado la idea de estudiar AMPK allá por el año 2018; a la Dra. (c) Nicole Rúbilar, por las risas, las discusiones científicas y su apoyo durante los experimentos; a la Dra. Javiera Gavilán, por las risas y los buenos momentos, a Florencia Verbal, Rocio García y Aracely Pinto y Macarena Meza, por su amistad y ayuda. Las constantes discusiones científicas y el compañerismo que hicieron más agradable el trabajo diario.

A quienes fueron fundamentales en mi desarrollo personal y profesional: al Dr. Francisco Sáez, quien me enseñó gran parte de las técnicas que manejo hoy en día; al futuro doctor Oscar Flores, quien me enseñó a ser un guía con mayor paciencia y compromiso; y a la Dra. Daniela Mennickent, quien me ha enseñado a ser un mejor científico y participó activamente en los inicios de mi ingreso a la ciencia.

A mi compañera de doctorado, amiga y ex roomie, Dra. (c) Juliana González, por acompañarme en esta verdadera montaña rusa de emociones, los cafecitos, las risas y los llantos han hecho de este viaje, un carrusel de emociones que me volvería a subir contigo. A la Dra. Carola Díaz, por su apoyo emocional, técnico y filosófico, que me ha ayudado a replantear la manera en que veo y hago ciencia.

A las y los estudiantes e investigadores del Departamento de Fisiología, especialmente a Diego Cifuentes, cuyos cafecitos y conversaciones me han ayudado a mantenerme motivado y cuerdo para continuar este camino. También a Krishna, Sofí, Cami, Claudio, Dra. Lore, Dra. Ana, y a todas y todos aquellos con quienes compartí y disfruté enormemente estos años en el laboratorio.

A los integrantes del Mitochondrial Neurobiology and Therapeutics Laboratory, dirigido por la Dra. Eugenia Trushina, especialmente a Sergei, Han y Jane, quienes potenciaron mis conocimientos y mi pensamiento crítico durante los seis meses que estuve con ellos. También a Rachel Stein, Kim y Ted, quienes me recibieron como uno más de los suyos en Estados Unidos.

A mis amigas eternas, Valentina Cabezas, Gabriela Montoille y Fernanda Vielma; aunque nos veamos solo un par de veces al año, su compañía siempre ha sido energía suficiente para recargar las pilas. Las amo.

A Margarita Riquelme y Milena Smith, con quienes he recorrido este camino desde mucho antes de iniciar el doctorado. Los jueves en su departamento fueron un espacio para descansar, recomponer la mente y seguir adelante.

Quiero agradecer especialmente a Gabriel Olivas, mi compañero de vida, quien me ha acompañado desde el inicio de este viaje, me ha sostenido en los buenos y en los malos momentos y, que, sin su apoyo, no podría ser el investigador y científico que escribe estas palabras hoy.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, especialmente a mi madre, Gema Molina, quien me dio la vida y se ha encargado de que nunca me falte nada; a mi hermano Raúl Molina, quien con su motivación y ejemplo me ha ayudado a mantener el foco en mis objetivos; y a mi hermano Miguel Ramírez, quien fue mi modelo para entrar a la UdeC y que, cuando he tenido dudas o preguntas, nunca ha dejado de estar ahí como mi hermano mayor.

También quiero agradecer a mi padre, quien, a pesar de no haber alcanzado a verme convertido en doctor, sé que siempre estuvo orgulloso y feliz por los logros de su hijo. Esta tesis es para ti, en tu honor.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Presentación	3
AGRADECIMIENTOS	8
ÍNDICE DE CONTENIDOS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE TABLAS	13
RESUMEN.....	14
INTRODUCCIÓN	15
I. La Enfermedad de Alzheimer	15
II. Rol fisiológico y patológico del Péptido β -amiloide	18
III. AMPK como sensor energético y su rol en neurodegeneración	23
IV. MAMs, Mfn2 y disfunción mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer	29
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
METODOLOGÍA	39
V. Compuestos Químicos.....	39
Agregación péptido A β 1-40	40
Lisis Celular	41
Cuantificación de Proteínas.....	41
Transfección celular	42
<i>Western Blot</i>	43
Inmunocitoquímica.....	44
Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	46
Viabilidad celular (MTT)	46
Electrofisiología	47
Análisis de datos	50
RESULTADOS.....	51
I. Evaluar la actividad de AMPK en líneas celulares y cultivos primarios de neuronas tratadas con oligómeros solubles del péptido β -amiloide.	51

II. Correlacionar la actividad de AMPK con los niveles de Mfn2 en células tratadas con A β Os.	56
III. Correlacionar los efectos de A β Os sobre indicadores de dinámica mitocondrial, acoplamiento RE-mitocondria, bioenergética y función sináptica frente al estado de actividad de AMPK.	65
IV. Evaluación del número y distribución de estructuras MAMs en tejido hipocampal de ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.	82
DISCUSIÓN	90
CONCLUSIÓN	102
Limitaciones y proyecciones	103
RESUMEN GRÁFICO.....	105
ABREVIATURAS	106
REFERENCIAS	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las vías de procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP).....	20
Figura 2. Estructura y vías de activación de AMPK.....	25
Figura 3. Las MAMs/MERCs como plataforma integradora de señales y metabolismo.	33
Figura 4. Modelos alternativos de anclaje entre retículo endoplasmático y mitocondrias mediado por Mfn2.	35
Figura 5. A β O _s inducen la activación sostenida de AMPK en células PC12 y neuronas hipocámpales de ratón. (A)	55
Figura 6. A β O _s elevan Mfn2 en células PC12 y Neuronas Hipocámpales de ratón de forma dependiente de AMPK.....	60
Figura 7. AMPK α 1/ α 2 <i>knockdown</i> intensifica la disfunción metabólica inducida por APP ^{swe} , sin revertir la alteración de la autofagia en células SH-SY5Y APP ^{swe}	64
Figura 8. A β O _s promueven fragmentación mitocondrial en células PC12 de manera dependiente de AMPK.	69
Figura 9. A β O _s promueven fragmentación mitocondrial en neuronas hipocámpales de ratón de manera dependiente de AMPK.....	71
Figura 10. Principio del sistema split-GFP para detectar contactos entre organelos.	73
Figura 11. A β O _s incrementan los contactos RE-mitocondria y disminuyen el potencial de membrana mitocondrial mediante un mecanismo dependiente de AMPK en células PC12.....	77
Figura 12. Efecto de los oligómeros de β -amiloide (A β O _s) y la inhibición de AMPK sobre la actividad sináptica espontánea en neuronas hipocámpales de ratón.....	81
Figura 13. Reconstrucciones tridimensionales representativas de mitocondrias y retículo asociado en hipocampo de ratón.	83
Figura 14. El KO de AMPK neuronal en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer previene el aumento del volumen, longitud y área mitocondrial.	87
Figura 15. El <i>knockout</i> neuronal de AMPK reduce el incremento en los contactos RE-mitocondria observado en el modelo APP/PS1.	89
Figura 16. Resumen Gráfico.	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos Químicos.....	39
Tabla 2. Listado anticuerpos utilizados en <i>Western Blot</i>	44
Tabla 3. Listado anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica	45

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer se asocia con alteraciones tempranas en la función sináptica y mitocondrial inducidas por oligómeros solubles de β -amiloide (A β Os). En esta tesis se planteó que el estrés amiloide desregula AMPK, una quinasa clave en la regulación del metabolismo energético, favoreciendo cambios en la dinámica mitocondrial y en los contactos retículo endoplasmático-mitocondria, o MAMs, de manera dependiente de Mfn2. Los resultados mostraron que A β Os aumentan la activación de AMPK y los niveles de Mfn2, incrementan el acoplamiento RE-mitocondria, alteran la morfología mitocondrial, disminuyen el potencial de membrana y comprometen la función sináptica. En el modelo crónico APP_{SWE}, AMPK mostró una regulación diferencial asociada a cambios en Mfn2, autofagia y metabolismo oxidativo. La inhibición farmacológica o disminución genética de AMPK atenuó varios de estos efectos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que AMPK actúa como un regulador clave del daño inducido por A β Os, vinculando la remodelación de MAMs con la disfunción mitocondrial y sináptica en la enfermedad de Alzheimer.

INTRODUCCIÓN

I. La Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa y constituye la principal causa de demencia en adultos mayores (Barker et al., 2002; Wilson et al., 2012). En Chile, en 2014 se estimó que el 1.1% de la población presentaba algún tipo de demencia (Fuentes & Albala, 2014). En personas de 60 años o más, el 7.1% presenta deterioro cognitivo, cuya prevalencia aumenta de manera marcada con la edad, alcanzando un 13% en el grupo de 75 a 79 años y llegando al 36.2% en mayores de 85 años (Klaassen P et al., 2021). En concordancia con esta tendencia, el Censo 2024 en Chile confirmó una acelerada tendencia al envejecimiento poblacional, con un 14% de la población mayor de 65 años, lo que anticipa un aumento en la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (INE, 2024). En este contexto, se proyecta que hacia 2050 un 3.1% de la población chilena, equivalente a más de 600 mil personas, vivirá con EA u otra forma de demencia (Fuentes & Albala, 2014; Slachevsky et al., 2018).

En cuanto a costos, se ha proyectado un gasto anual por persona del orden de US\$ 13.900 (suma de costos directos e indirectos) para países latinoamericanos de

ingreso medio, magnitud consistente con la experiencia local y con la alta ponderación de costos sociales y de cuidados informales (Hojman et al., 2017; Qassem et al., 2023). Territorialmente, la Región Metropolitana concentra el mayor número absoluto de casos (por tamaño poblacional y envejecimiento), y análisis de mortalidad muestran exceso de riesgo en varias comunas del Gran Santiago; no obstante, la prevalencia tiende a ser mayor en zonas rurales y en niveles socioculturales bajos (Celis-Morales et al., 2021; Ministerio de Salud, 2017; Slachevsky et al., 2018). Desde un punto de vista etiológico, la EA se presenta mayoritariamente como forma esporádica de inicio tardío, que representa más del 95% de los casos y en la que influyen la edad, factores de riesgo vasculares y metabólicos y la susceptibilidad genética, siendo el alelo de la apolipoproteína E (APOE) ϵ 4 el principal factor de riesgo conocido (Raulin et al., 2022). Una fracción menor corresponde a la EA familiar de inicio temprano, la cual, debido a mutaciones autosómicas dominantes y de alta penetrancia en la proteína precursora amiloide (APP) y en las presenilinas PSEN1 y PSEN2 (componentes del complejo γ -secretasa), la que cursa con un cuadro clínico habitualmente más precoz y agresivo (ASSOCIATION, 2024; Dai et al., 2018; Xiao et al., 2021).

A nivel celular, la EA se caracteriza por la muerte neuronal progresiva, afectando principalmente hipocampo y corteza cerebral, lo que se traduce como un deterioro cognitivo progresivo (Alzheimer's, 2024; Ferreira et al., 2015). En etapas iniciales, la

EA se manifiesta con dificultades en la evocación de palabras y la orientación espacial, seguidas por el compromiso de funciones como la atención, concentración, lenguaje, praxis constructiva, prosopagnosia y la planificación diaria. En fases avanzadas, se observa un deterioro profundo de la memoria inmediata y otras capacidades cognitivas esenciales. (Henneges et al., 2016; Tahami Monfared et al., 2022).

Desde el punto de vista histopatológico la EA se caracteriza clásicamente por la presencia de dos marcadores clásicos: los ovillos neurofibrilares y las placas seniles de péptido β -amiloide (Berchtold & Cotman, 1998; Stoothoff & Johnson, 2005). Los ovillos neurofibrilares corresponden a agregados intracelulares formados principalmente por la proteína Tau hiperfosforilada. En condiciones fisiológicas, Tau es una proteína asociada a microtúbulos que contribuye a la organización estructural y funcional de las neuronas, sin embargo, su hiperfosforilación favorece su desprendimiento de los microtúbulos, agregación y acumulación patológica (Buee et al., 2000; Finder & Glockshuber, 2007). Por otro lado, las placas seniles corresponden a depósitos extracelulares insolubles del péptido β -amiloide ($A\beta$) que se origina a partir de APP (Hardy & Higgins, 1992; Murphy & LeVine, 2010).

II. Rol fisiológico y patológico del Péptido β -amiloide

APP es una proteína transmembrana de expresión ubicua cuya función aún no ha sido completamente dilucidada. Sin embargo, se le han atribuido roles en la regulación del desarrollo del sistema nervioso, la formación y función de la unión neuromuscular, la sinaptogénesis, la complejidad dendrítica y la densidad de espinas, así como en el crecimiento y guía axonal. Además, APP participa en funciones sinápticas clave, incluyendo la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. (Chen et al., 2013; Muller et al., 2017; Nalivaeva & Turner, 2013).

El péptido A β se genera por la vía amiloidogénica, tras el clivaje secuencial de APP por las enzimas β -secretasa/BACE1 y el complejo γ -secretasa (presenilina, nicastrina, Aph-1 y Pen-2) (Fig. 1), proceso que ocurre principalmente en endosomas tempranos donde convergen APP y BACE1 por tráfico vesicular (Godoy et al., 2021; Nixon, 2017; Park et al., 2022); en contraste, la vía no amiloidogénica (α -secretasa/ADAM10) previene la formación de A β y libera sAPP α , fragmento que cumple funciones neurotróficas (Corrigan et al., 2012; Muller et al., 2017; Peron et al., 2018). La composición del complejo γ -secretasa, el tráfico intracelular de APP/BACE1 y la activación de ADAM10 regulan finamente la producción de A β (Hur, 2022; Kuhn et al., 2010; Peron et al., 2018; Sun & Roy, 2018; Tan & Gleeson, 2019; Thinakaran & Koo, 2008; Zhang et al., 2014). En condiciones fisiológicas, A β es un

producto normal del metabolismo neuronal y se libera en forma dependiente de la actividad sináptica, actuando como neuromodulador de la transmisión y la plasticidad (Cuevas et al., 2011; Galanis et al., 2021; Morley & Farr, 2014). A concentraciones picomolares, A β fortalece la potenciación a largo plazo (LTP) y la capacidad de la memoria para codificar, almacenar y recuperar información, y resulta necesario para la plasticidad sináptica. Asimismo, sus efectos exhiben un comportamiento hormético; que quiere decir beneficiosos en concentraciones fisiológicas reducidas, pero se tornan perjudiciales cuando aumenta su concentración o se modifican sus estados de agregación (Cai et al., 2023; Fagiani et al., 2021; Galanis et al., 2021). Más allá de la sinapsis, se ha propuesto un papel fisiológico innato como péptido antimicrobiano y señal de reparación, que podría explicar parte de su rápida polimerización frente a patógenos en el encéfalo (Vojtechova et al., 2022). En conjunto, A β cumple funciones homeostáticas en sinapsis y tejidos cerebrales; cuando se desequilibran su concentración, su conformación molecular o su localización (intracelular o extracelular), estos mismos circuitos se vuelven vulnerables, lo que condiciona su rol patológico (Eimer et al., 2018; Hampel et al., 2021; Vojtechova et al., 2022).

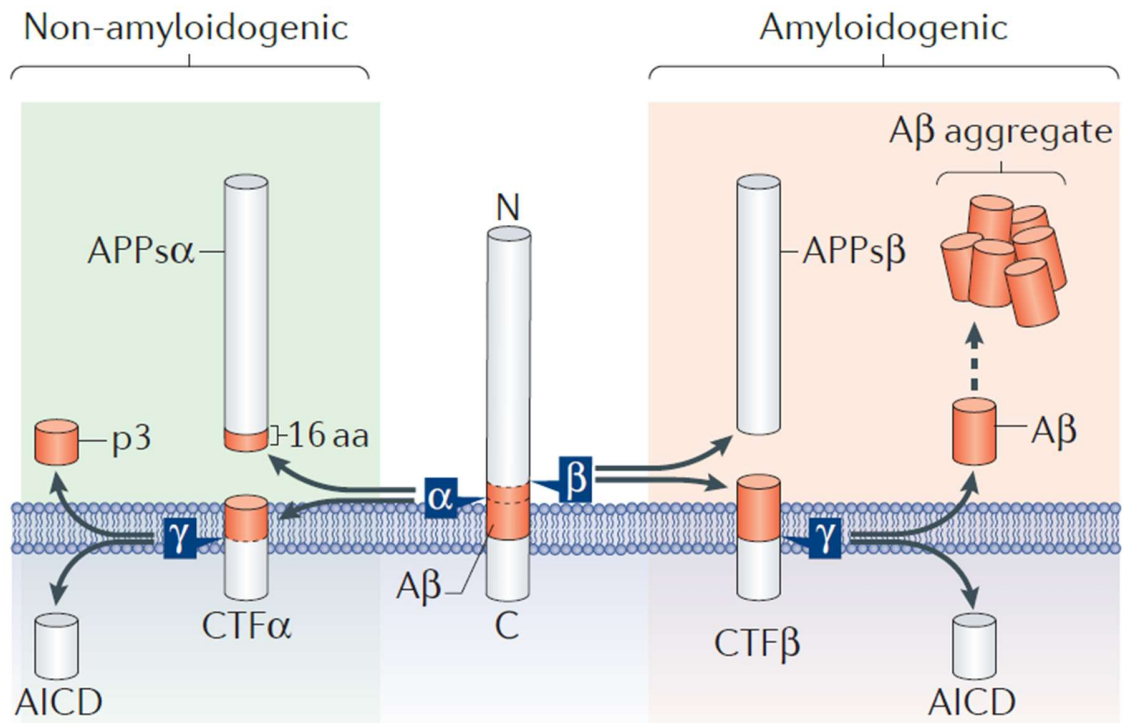


Figura 1. Esquema de las vías de procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP). En la vía no amiloidogénica (izquierda), la APP es escindida primero por α -secretasa dentro de la región A β (indicada en rojo), lo que impide la generación de A β . Esta escisión libera el ectodominio soluble sAPP α y genera el fragmento C-terminal C83 (CTF α), el cual es posteriormente procesado por γ -secretasa para producir el péptido p3 y liberar el dominio intracelular de APP (AICD). En la vía amiloidogénica (derecha), la APP es escindida inicialmente por β -secretasa, liberando sAPP β y generando el fragmento C-terminal C99 (CTF β). Luego, la γ -secretasa procesa C99 para producir péptidos A β y liberar también AICD. Tomado de (Muller et al., 2017)

Las especies predominantes que se generan a partir de este procesamiento proteolítico de APP son A β 40 y A β 42; esta última, se diferencia debido a que contiene dos residuos C-terminales adicionales, Isoleucina en la posición 41 y Alanina en la posición 42, estos dos aminoácidos son no polares, lo que le otorga una cualidad hidrofóbica mayor a A β 42 por sobre A β 40, lo que se traduce como una mayor propensión a agregarse y formar oligómeros/protofibrillas sinaptotóxicas (Qiu et al., 2015). En relación con la proporción de estos péptidos, A β 40 se encuentra en mayor proporción (A β 42/A β 40 – 1/9), esta proporción suele desplazarse hacia un mayor porcentaje de A β 42 en los cerebros de los pacientes con EA familiar, lo que conduce a un aumento de la sinaptotoxicidad. (Hartley et al., 1999; Jan et al., 2008; Pauwels et al., 2012; Qiu et al., 2015)

Actualmente, se propone a los oligómeros solubles del péptido A β (A β Os) como el principal agente tóxico en la EA, ya que por su tamaño pueden difundir en el parénquima y afectar la estructura sináptica, la función neuronal y la supervivencia celular (Haass & Selkoe, 2007; Walsh & Selkoe, 2004). Uno de los mecanismos propuestos para la toxicidad del péptido A β es su capacidad de formar un poro en membranas celulares (Lin et al., 1999; Rhee et al., 1998; Sepulveda et al., 2010). Se cree que este poro estaría formado por 4 a 6 subunidades y el tamaño del poro oscilaría en torno a los 2-3 nm, permitiendo en una primera instancia el paso de cationes de manera inespecífica y, posteriormente, el paso de moléculas de hasta

900 Da (Sepúlveda et al., 2010). En consecuencia, a partir de estos antecedentes, este poro podría permitir el paso de moléculas e iones siguiendo sus gradientes electroquímicos. Por ejemplo, el calcio (Ca^{2+}) se encuentra en el medio extracelular en concentraciones del orden milimolar, mientras que en el citosol su concentración basal es del orden nanomolar; por lo tanto, la formación de este poro favorecería un influjo de Ca^{2+} y el consiguiente aumento de sus niveles intracelulares (Lal et al., 2007). Además, el poro también podría permitir la salida de moléculas de mayor tamaño, como el adenosín trifosfato (ATP), promoviendo su fuga hacia el espacio extracelular. En conjunto, estos eventos contribuirían a un desbalance energético celular y podrían gatillar una cascada de procesos patológicos. (Fuentealba et al., 2012; Fuentealba et al., 2011; Saez-Orellana et al., 2016).

Además de perturbar membranas, los oligómeros de $\text{A}\beta$ activan rutas receptor-dependientes que deprimen la LTP y alteran la señalización mediada por NMDAR (Kessels et al., 2013; Taniguchi et al., 2022; Walsh et al., 2002). En dendritas, los $\text{A}\beta\text{Os}$ pueden acoplarse al prion celular (PrP^c) y utilizar mGluR5 como correceptor, activando vías dependientes de Fyn/Pyk2 que desregulan la señalización mediada por NMDAR, favoreciendo una plasticidad sináptica patológica caracterizada por inhibición de la LTP y facilitación de mecanismos asociados a LTD (Grochowska et al., 2023; Taniguchi et al., 2022; Um et al., 2013). Además, los $\text{A}\beta\text{Os}$ reducen la

disponibilidad de EphB2, un receptor tirosina quinasa clave para la estabilización postsináptica de NMDAR y la plasticidad sináptica. Esta pérdida se asocia con una mayor degradación proteasomal de EphB2, comprometiendo la función de NMDAR y contribuyendo a la disminución de la LTP (Geng et al., 2013; Miyamoto et al., 2016; Zhang et al., 2022). En conjunto, estos eventos convergen en un desbalance de Ca^{2+} , estrés mitocondrial y liberación anómala de ATP al espacio extracelular; este ATP activa receptores purinérgicos, lo que potencia la sobrecarga de Ca^{2+} y amplifica cascadas de señalización pro-excitotóxicas (Godoy et al., 2021; Godoy et al., 2019; Rauhala et al., 2018; Saez-Orellana et al., 2018; Saez-Orellana et al., 2016).

III. AMPK como sensor energético y su rol en neurodegeneración

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es una serina/treonina quinasa heterotrimérica compuesta por una subunidad catalítica (α) y dos subunidades reguladoras (β y γ) que actúa como sensor maestro del estado energético celular. Cuando desciende el ATP y aumentan AMP/ADP, la unión de estos nucleótidos a la subunidad γ induce un cambio conformacional que posiciona y expone el sitio de activación con Thr172 en la subunidad α , facilitando su fosforilación por las quinasas *upstream* LKB1 y CaMKK2 e incrementando la actividad enzimática de

AMPK (Fig. 2) (Hardie et al., 2012; Hawley et al., 1996; Herzig & Shaw, 2018; Hurley et al., 2005; Park et al., 2023; Trefts & Shaw, 2021; Yan et al., 2021). Además, la unión de AMP/ADP favorece el mantenimiento de AMPK activa al proteger Thr172 de la desfosforilación por fosfatasas, estabilizando a la quinasa en su estado fosforilado (Gowans & Hardie, 2014; Gowans et al., 2013; Trefts & Shaw, 2021). Una vez activa, AMPK reprograma el metabolismo inhibiendo rutas anabólicas que consumen ATP y potenciando vías catabólicas generadoras de ATP; en paralelo, coordina procesos de control de calidad mitocondrial como autofagia/mitofagia, biogénesis y dinámica mitocondrial. En este contexto, puede promover la fisión mediante la fosforilación del factor de fisión mitocondrial (MFF) lo que recluta DRP1 para el remodelamiento mitocondrial según el estado energético celular (Hardie et al., 2012; Herzig & Shaw, 2018; Steinberg & Carling, 2019; Toyama et al., 2016; Zhu et al., 2024).

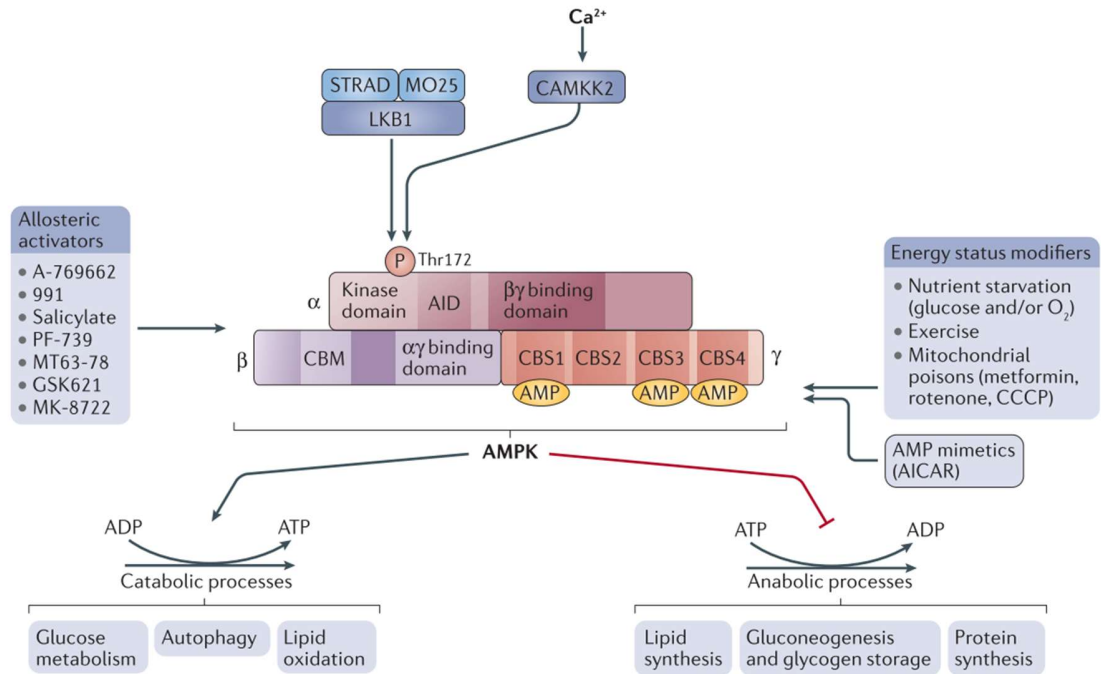


Figura 2. Estructura y vías de activación de AMPK. Esquema de las subunidades α , β y γ de la proteína AMPK, mostrando sus respectivos dominios. Se muestran las quinasas que fosforilan el residuo Thr172 (LKB1 y CAMKK2), activadores alostéricos y eventos modificadores del estado energético celular. También se observa los procesos catabólicos promovidos por AMPK y los procesos anabólicos inhibidos por AMPK. Tomado de (Herzig & Shaw, 2018).

En la enfermedad de Alzheimer, los A β O alteran la homeostasis intracelular de Ca²⁺ y la bioenergética celular, promoviendo una remodelación mitocondrial que, aunque podría iniciarse como una respuesta adaptativa al estrés energético, en el contexto neuronal se asocia con disfunción y muerte celular (Calvo-Rodriguez et al., 2019). En concordancia con ello, en tejido humano y modelos preclínicos de EA se han descrito alteraciones isoforma-específicas de AMPK, mientras que la represión cerebral de AMPK α 1 atenúa déficits cognitivos y sinápticos (Zimmermann et al., 2020). Asimismo, la exposición a A β O en modelos murinos sobreactiva el eje CaMKK2-AMPK, reduciendo la densidad de espinas dendríticas a través de la fosforilación coordinada de MFF y ULK2, vinculadas con fisión mitocondrial y mitofagia, respectivamente. Estos efectos pueden prevenirse mediante la inhibición de la sobreactivación de CaMKK2/AMPK, lo que protege la integridad de espinas dendríticas y mitocondrias en neuronas derivadas de células madre embrionarias humanas y en modelos murinos de EA (Lee et al., 2022).

En paralelo, los A β O elevan el Ca²⁺ mitocondrial en neuronas antes de la muerte celular, conectando la toxicidad amiloide con la sobrecarga de calcio en la mitocondria, la dishomeostasis de Ca²⁺ intracelular y el estrés bioenergético (Calvo-Rodriguez et al., 2020). En este escenario, emergen los contactos estrechos entre el retículo endoplasmático y la mitocondria, conocidos como MAMs (mitochondria-associated membranes) o MERCs (mitochondria-ER contacts).

Estos microdominios corresponden a sitios de proximidad nanométrica, típicamente del orden de 10–40 nm, que coordinan procesos clave como integrar el manejo del Ca^{2+} , el metabolismo lipídico y el control de calidad mitocondrial (Area-Gomez et al., 2012; Bui et al., 2025). A través del complejo IP3R-GRP75-VDAC articulan la liberación de Ca^{2+} desde el retículo con su captación por la mitocondria y coordinan procesos como biogénesis y mitofagia. En la EA se ha descrito un aumento o desregulación de estas estructuras funcionales MAMs, asociado a mayor transferencia de Ca^{2+} desde el retículo a la mitocondria y a disfunción bioenergética (Area-Gomez et al., 2012; Bui et al., 2025; Rossini et al., 2025; Wilson & Metzakopian, 2021; Xu et al., 2020).

Bajo estrés energético, AMPK se redistribuye hacia MAMs e interactúa con mitofusina 2 (Mfn2), una GTPasa localizada en la membrana mitocondrial externa y también en subdominios del RE, donde puede contribuir al acoplamiento físico RE–mitocondria (*tethering*) y a la comunicación interorganelar (Hu et al., 2021). En el modelo original, Mfn2 actuaría como un *tether* positivo, de modo que su silenciamiento o ablación reduce la yuxtaposición RE–mitocondria y altera la transferencia de Ca^{2+} (de Brito & Scorrano, 2008; Filadi et al., 2018). Sin embargo, estudios posteriores han reportado que la depleción de Mfn2 puede incrementar el número o la extensión de los contactos retículo endoplasmático–mitocondria, así como potenciar la transferencia de Ca^{2+} entre ambos organelos. Estos hallazgos

sugieren que Mfn2 no actúa exclusivamente como una proteína de anclaje físico entre el retículo endoplasmático y la mitocondria, sino que también puede regular la distancia y la organización funcional de estos contactos, evitando una proximidad excesiva en determinados contextos celulares (Filadi et al., 2015, 2017; Filadi et al., 2018; Naon et al., 2023; Naon et al., 2016). En conjunto, la evidencia apoya un rol contexto-dependiente de Mfn2 en la regulación de las MAMs, más que una función exclusivamente pro-anclaje.

En este escenario, se ha descrito que AMPK puede fosforilar Mfn2 en Ser442, favoreciendo una ubiquitinación no degradativa que inhibe la fusión mitocondrial, lo que aporta un control directo de la dinámica mitocondrial desde la señalización energética (Crosas-Molist et al., 2023; de Brito & Scorrano, 2008; Filadi et al., 2018; Hu et al., 2021). En conjunto, estos antecedentes perfilan un rol dual de AMPK en el contexto neuronal. En fases agudas, su activación puede cumplir una función adaptativa orientada a restaurar la homeostasis energética y promover mecanismos de control de calidad organelar. Sin embargo, cuando esta activación se mantiene en el tiempo, como ocurre en un contexto de exposición a A β y dishomeostasis de Ca²⁺, AMPK puede adquirir un carácter perjudicial, favoreciendo una fisión mitocondrial excesiva, el aumento de estructuras MAMs, la disfunción sináptica y la progresión neurodegenerativa (Liu et al., 2025; Marinangeli et al., 2018; Park et al., 2023; Trefts & Shaw, 2021).

IV. MAMs, Mfn2 y disfunción mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer

Las membranas asociadas a mitocondria (MAMs) son dominios de contacto estrecho (del orden de 10-40 nm de distancia) y dinámico entre el retículo endoplasmático y la mitocondria que coordinan a escala nanométrica, la transferencia de Ca^{2+} , el metabolismo de lípidos la dinámica mitocondrial y el acople bioenergético que sostiene la fisiología celular (Bui et al., 2025). En su núcleo de señalización de Ca^{2+} opera el ensamblaje formado por el receptor de inositol trifosfato (IP3R) en el retículo, la chaperona citosólica GRP75 y el canal aniónico dependiente de voltaje 1 (VDAC1) en la membrana mitocondrial externa, acoplado al canal uniportador mitocondrial (MCU) en la membrana interna, lo que permite traducir pulsos locales de Ca^{2+} en ajustes finos de producción de ATP (Atakpa-Adaji & Ivanova, 2023; Lim et al., 2021). La arquitectura y la modulación del acoplamiento dependen, además, de complejos de anclaje como VAPB-PTPIP51, la proteína PDZD8 que es especialmente relevante en neuronas, y el receptor Sigma-1 que estabiliza IP3R bajo estrés y regula la señalización local de calcio (Csordas et al., 2006; Sharma et al., 2021; Sun et al., 2025). Estos contactos también alojan pasos clave de síntesis y transferencia de fosfolípidos: la fosfatidilserina sintetizada en el retículo se traslada a mitocondria y se convierte en fosfatidiletanolamina, integrando la biogénesis de membranas con la respiración celular; transportadores

como ORP5 y ORP8 facilitan el intercambio fosfolípido-fosfatidilinositol y participan en el balance de colesterol junto a la enzima Acil-CoA acetiltransferasa 1 (ACAT1) y otras enzimas enriquecidas en MAMs. La desregulación de estos flujos altera la composición de membranas, la organización de crestas mitocondriales y la eficiencia bioenergética (Monteiro-Cardoso et al., 2022). En cuanto a la dinámica mitocondrial, las MAMs funcionan como plataformas donde se coordinan fusión y fisión. Mfn2, ubicada en la membrana mitocondrial externa y en dominios del retículo, contribuye tanto a la fusión como a la arquitectura del contacto; en paralelo, la activación del factor de fisión mitocondrial (MFF) y el reclutamiento de la proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP1) promueven fisión cercana a MAMs, paso necesario para distribuir mitocondrias y para la segregación de organelos dañados antes del proceso de mitofagia. Cambios en el acoplamiento pueden sesgar la balanza hacia fragmentación o hiperfusión, con impacto directo en la función sináptica (de Brito & Scorrano, 2008; Friedman et al., 2011; Naon et al., 2023). En relación con el retículo endoplasmático, diversos componentes de la respuesta a proteínas mal plegadas se localizan o se anclan en las MAMs. Entre ellos, PERK, una quinasa implicada en la respuesta al estrés del retículo endoplasmático reduce la síntesis global de proteínas tras su activación, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis celular. Además, PERK participa en la regulación de respuestas antioxidantes que protegen a la célula frente al estrés redox (Sassano et al., 2023). Por su parte, IRE1, un sensor

transmembrana del estrés del retículo endoplasmático, y ATF6, un factor de transcripción transmembrana, ajustan procesos asociados al plegamiento proteico y a la degradación asociada al retículo endoplasmático. Asimismo, chaperonas como BiP y Sigma-1R contribuyen a estabilizar receptores y canales presentes en estos dominios de contacto (Hayashi & Su, 2007). Bajo sobrecarga proteica o de Ca^{2+} , el microdominio relacionado con las MAMs se remodela para contener el daño; si el estrés persiste, se activan vías pro-apoptóticas y se altera la comunicación RE-mitocondria (Hayashi & Su, 2007; Proulx et al., 2021; Sassano et al., 2023). El aumento de Ca^{2+} mitocondrial y los desbalances lipídicos en MAMs favorecen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la cadena respiratoria, además de promover la peroxidación de fosfolípidos en membranas adyacentes (Palma et al., 2020). Frente a este escenario, sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa 2 (SOD2), que protege a la célula del daño inducido por ROS, y GPX4, enzima clave que neutraliza hidroperóxidos lipídicos y limita la lipoperoxidación, contribuyen a amortiguar el estrés oxidativo. Sin embargo, cuando estas defensas resultan insuficientes, se perpetúa el daño oxidativo, se compromete el potencial de membrana mitocondrial y se facilita la liberación de factores pro-muerte (Palma et al., 2020; Resende et al., 2022; Xie et al., 2023). Cuando todos los mecanismos de control celular fallan, en las MAMs se reclutan proteínas pro-apoptóticas como ULK1/2, Beclin-1, ATG14 y proteínas de anclaje que facilitan la nucleación de la membrana de aislamiento con el fin de formar el

autofagosoma; la fisión cercana a MAMs segrega mitocondrias dañadas para su eliminación. La hiperactivación de contactos o su desorganización alteran el flujo autofágico, favoreciendo acumulación de organelos disfuncionales o, en el extremo opuesto, la pérdida excesiva de masa mitocondrial (Gomez-Suaga et al., 2017; Hamasaki et al., 2013; Yang et al., 2020). De este modo, las MAMs impactan de manera simultánea en la señalización de Ca^{2+} , el equilibrio de fosfolípidos, la respiración mitocondrial, el estrés del retículo, el control redox y las rutas de control de calidad como la autofagia y la mitofagia. En neuronas, estos contactos sostienen la demanda energética de la sinapsis y afinan señales de Ca^{2+} en microdominios que impactan la producción de ATP y la supervivencia celular (Atakpa-Adaji & Ivanova, 2023; Bernard-Marissal et al., 2018; Bobba et al., 2017; Chen et al., 2025; de Ridder et al., 2023; Liu et al., 2025; Marchi et al., 2018; Markovinovic et al., 2022; Wang et al., 2021; Wu et al., 2017).

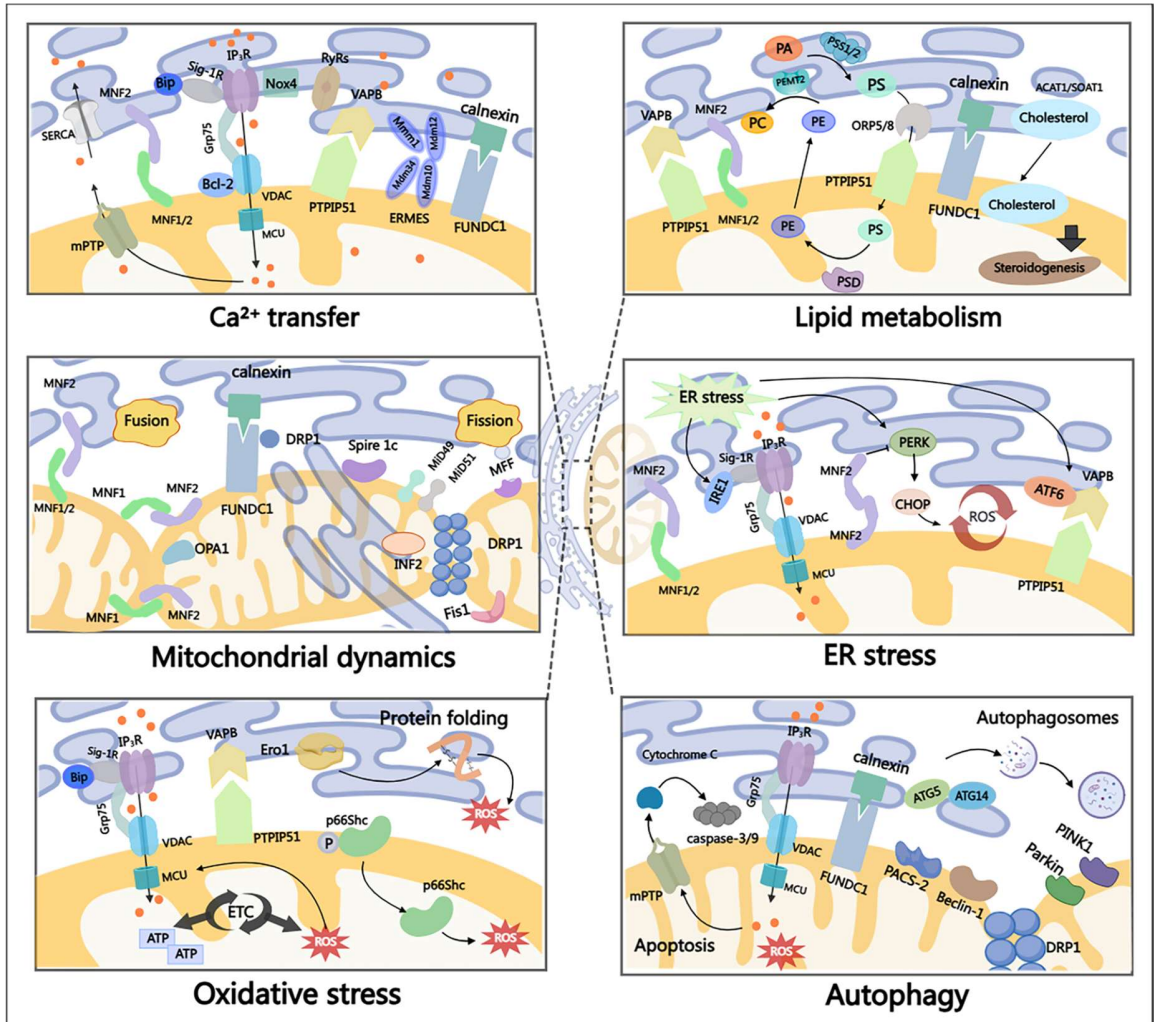


Figura 3. Las MAMs/MERCs como plataforma integradora de señales y metabolismo. En homeostasis de Ca²⁺, la liberación de Ca²⁺ desde el RE ocurre principalmente vía IP₃R (y RyR), y su acoplamiento físico con la mitocondria se facilita por GRP75, que conecta IP₃R con VDAC en la membrana mitocondrial externa; posteriormente, el Ca²⁺ ingresa a la matriz a través del MCU. Este eje IP₃R–GRP75–VDAC/MCU se modula por chaperonas/reguladores como Sig-1R/BiP y proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, mientras que SERCA contribuye a la recaptación de Ca²⁺ al RE. En metabolismo lipídico, complejos de *tethering* como VAPB–PTPIP51 y transportadores como ORP5/8 favorecen el intercambio de lípidos y colesterol entre RE y mitocondria. En dinámica mitocondrial, MFN1/Mfn2 participan en fusión y también en el acoplamiento RE–mitocondria, mientras que la fisión depende de DRP1 y adaptadores como MFF/Fis1. Las MAMs además integran respuestas a estrés del RE y estrés oxidativo mediante PERK/IRE1/ATF6, y conectan con rutas de control de calidad y muerte celular, incluyendo mitofagia/autofagia y apoptosis relacionándose con PINK1/Parkin, ATG14/ATG5, Beclin-1. Tomado (Chen et al., 2025).

En este contexto, mitofusina 2 (Mfn2) cumple un papel doble: es una GTPasa esencial para la fusión de la membrana mitocondrial externa y, además, modula la arquitectura de las MAMs. Evidencia reciente demostró que el gen Mfn2 genera variantes de *splicing* específicas del retículo que actúan como contrapartes de anclaje, definidas como ERMIT2 y ERMIN2, capaces de modelar la morfología del retículo y de establecer el puente físico con las mitocondrias (Naon et al., 2023). Este hallazgo ayudó a resolver discrepancias previas sobre el rol de Mfn2 como proteína de anclaje y logró dar explicación de cómo cambios en Mfn2 impactan a la vez en el acoplamiento retículo-mitocondria y en la dinámica de fusión de la red mitocondrial (Fig. 4) (Filadi et al., 2018; Naon et al., 2023). En modelos celulares y en cerebro de ratón, la exposición a A β O_s aumenta la co-localización entre retículo y mitocondria, altera la actividad mitocondrial y modula la formación de autofagosomas; además, en neuronas el incremento del acoplamiento se acompaña de mayor transferencia de Ca²⁺ hacia la mitocondria (Calvo-Rodriguez et al., 2019; Leal et al., 2020). De forma complementaria, en preparaciones *in vivo* se ha observado que el aumento de calcio mitocondrial antecede a la muerte neuronal, lo que vincula de manera directa la toxicidad amiloide con la dishomeostasis de calcio y el estrés bioenergético. (Calvo-Rodriguez et al., 2020; Wilson & Metzakopian, 2021).

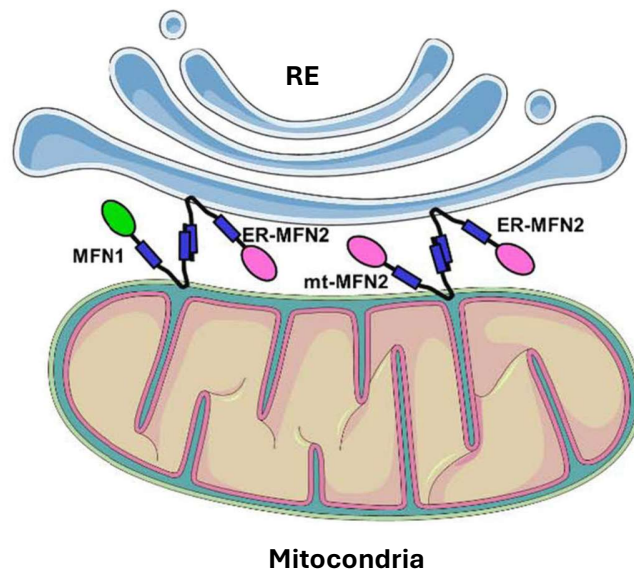


Figura 4. Modelos alternativos de anclaje entre retículo endoplasmático y mitocondrias mediado por Mfn2. El esquema representa la visión clásica de Mfn2 como un modulador positivo de la yuxtaposición entre el RE y las mitocondrias. En este modelo, Mfn2 en la membrana del RE se une a Mfn2 o MFN1 en la membrana mitocondrial externa (OMM), mediando el anclaje entre los dos orgánulos. Modificado de R. Filadi, D. Pendin and P. Pizzo. *Cell Death & Disease* 2018

Finalmente, varios estudios apuntan a un acoplamiento entre el estado energético y la arquitectura de estos contactos a través del eje AMPK–Mfn2. Bajo estrés energético, AMPK puede reclutarse a fracciones asociadas a mitocondria, interactuar con Mfn2 y modular el número y la función de los contactos, coordinando al mismo tiempo dinámica mitocondrial y autofagia (Calvo-Rodriguez et al., 2019; Hu et al., 2021; Leal et al., 2020; Wilson & Metzakopian, 2021).

En síntesis, la evidencia disponible sugiere que los oligómeros de A β alteran la homeostasis de calcio y el estado bioenergético neuronal, mientras AMPK se activa de forma sostenida y las MAMs muestran cambios en su abundancia y organización; sin embargo, persiste una brecha clave: no está claro si AMPK impulsa, mantiene o restringe la formación de MAMs en el contexto de la EA, ni cuál es el sentido funcional de ese ajuste sobre la transferencia de calcio y la eficiencia mitocondrial. Tampoco se conoce con precisión la secuencia temporal entre la activación de AMPK, la remodelación de MAMs y la aparición de vulnerabilidad sináptica, ni si estos fenómenos son adaptativos al inicio y patológicos cuando se cronifican. Este vacío conceptual limita la interpretación de resultados previos y la identificación de blancos terapéuticos que conecten estado energético con comunicación retículo-mitocondria. Por ello, el problema que abordaremos es determinar cómo la señalización energética mediada por AMPK se relaciona con la biogénesis y estabilidad de los contactos retículo-mitocondria en modelos de enfermedad de Alzheimer, y de manera explícita nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿cuál es el rol de AMPK en la formación y organización de MAMs en modelos de la enfermedad de Alzheimer?

HIPÓTESIS

La activación aberrante de AMPK inducida por oligómeros de A β promueve la remodelación Mfn2-dependiente de los contactos retículo endoplasmático-mitocondria, favoreciendo alteraciones en la dinámica mitocondrial y disfunción sináptica en modelos de enfermedad de Alzheimer.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es determinar el rol que tiene la actividad de AMPK sobre los mecanismos moleculares que condicionan la formación y funcionalidad de MAMs en modelos de toxicidad amiloide.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar la actividad de AMPK en líneas celulares y cultivos primarios de neuronas tratadas con oligómeros solubles del péptido β -amiloide.
- II. Correlacionar la actividad de AMPK con los niveles de Mfn2 en células tratadas con A β Os.
- III. Correlacionar los efectos de A β Os sobre indicadores de dinámica mitocondrial, acoplamiento RE-mitocondria, bioenergética y función sináptica con el estado de actividad de AMPK.
- IV. Caracterizar la organización de MAMs en tejido hipocampal de un modelo murino de enfermedad de Alzheimer, en función de la presencia o ausencia de AMPK neuronal

METODOLOGÍA

V. Compuestos Químicos.

Tabla 1. Compuestos Químicos.

Nombre Común	Fórmula Química	CAS	Empresa	Referencia
AICAR	$C_9H_{14}N_4O_5$	2627-69-2	Cell Signaling	#9944
Compuesto C	$C_{24}H_{27}Cl_2N_5O$	1219168-18-9	AmBeed	A213616
A β 1-40	$C_{194}H_{295}N_{53}O_{58}S$	131438-79-4	GenicBio	A-40-H-10
FCCP	$C_{10}H_5F_3N_4O$	370-86-5	Santa Cruz	sc-203578

Cultivos celulares. Se utilizaron células PC12, derivadas de feocromocitoma de médula suprarrenal de rata (*Rattus norvegicus*), cultivos primarios de neuronas hipocámpales de ratón y células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y transfectadas establemente con la proteína precursora amiloide portador de la mutación sueca, denominadas SH-SY5Y APP^{swe}. Las células PC12 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), y 1% de penicilina/estreptomicina. Los cultivos primarios de hipocampo se obtuvieron a partir de embriones de ratón C57BL/6J en estadio E18.5. Las células fueron plaqueadas a una densidad de 320.000 células/mL sobre cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina, utilizando un medio de *plating* compuesto por DMEM, 10% de suero de caballo (HS), DNasa I 4 μ g/mL y L-glutamina 2 mM. Posteriormente, las neuronas se mantuvieron en medio *feeding* compuesto por DMEM

suplementado con 5% HS, 5% FBS y 0.5% de suplemento N3, constituido por BSA, putrescina, insulina, selenito de sodio, T3, progesterona y corticosterona, de acuerdo con publicaciones previas (Fuentealba et al., 2012). Los animales fueron manipulados de acuerdo con las recomendaciones del NIH y con los protocolos aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Concepción. Por otra parte, las células SH-SY5Y APP^{swe} fueron utilizadas en el laboratorio de la Dra. Eugenia Trushina, Mayo Clinic, Rochester, MN, Estados Unidos. La autenticación de esta línea celular fue confirmada mediante PCR. Estas células se cultivaron en medio DMEM de alta glucosa suplementado con 10% FBS, 1 mM de piruvato de sodio y 1x de aminoácidos no esenciales, siguiendo los protocolos previamente establecidos por el grupo (Trushin et al., 2025). Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Agregación péptido A β 1-40. El péptido A β 1-40 fue reconstituido en DMSO grado p.a. hasta alcanzar una concentración *stock* de 2.3 mM. Posteriormente, se preparó una solución de trabajo de 80 μ M en PBS 1X estéril. Los oligómeros solubles de A β , A β Os, fueron obtenidos mediante agitación con barras magnéticas a una velocidad promedio de 500 rpm. Este procedimiento se realizó en dos fases: una primera fase a 37 °C durante 2 h, seguida de una segunda fase a temperatura ambiente durante 2 h adicionales. Los tratamientos celulares se realizaron con A β Os a una concentración final de 0.5 μ M, durante los tiempos indicados en cada ensayo, de

acuerdo con publicaciones previas del grupo (Fuentealba et al., 2012; Saez-Orellana et al., 2018; Saez-Orellana et al., 2016).

Lisis Celular. Células provenientes de las distintas muestras fueron lavadas 2 veces con PBS 1X estéril a temperatura ambiente durante 1 min cada vez, las células se congelaron inmediatamente a -80 °C y luego se lisaron con *buffer* de composición mM: Tris 10, EDTA 10, NaCl 100, Tritón 0.5%, inhibidor de proteasas (complete Mini EDTA free, Sigma Aldrich), Glicerol 10%, inhibidor de fosfatasas 1% (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, SigmaAldrich), pH 7.4. Posterior a esto fueron centrifugadas y el sobrenadante fue recolectado y almacenado.

Cuantificación de Proteínas. La concentración de proteínas se determinó con el kit Micro BCA (Pierce™, Thermo Fisher Scientific; Cat. 23235) en microplaca de 96 pocillos transparente de fondo redondo, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El reactivo de trabajo se preparó mezclando las soluciones MA:MB:MC en proporción 25:24:1 (v/v/v). La curva estándar de 8 puntos se preparó a partir de BSA 2 mg/mL, con un punto máximo de 2 mg/mL y diluciones seriadas 1:2 para obtener 1, 0.5, 0.250, 0.125, 0.0625, 0.0312 y un punto blanco 0 mg/mL. En cada pocillo se cargaron 2 µL de estándar o muestra, 98 µL de agua ultrapura y 100 µL del reactivo de trabajo, lo que se hizo en triplicado; se selló la placa para evitar evaporación, se incubó a 37 °C por 2 h, posteriormente se dejó enfriar a temperatura

ambiente y la absorbancia se midió a 562 nm en un lector de microplacas NOVOstar (BMG LABTECH).

Transfección celular. Células PC12 fueron transfectadas con 0.5 µg del plásmido pcDNA3.1_TOM20N-3xFLAG-GFP1-10 que codifica una construcción dirigida a la membrana mitocondrial externa mediante la señal N-terminal de TOM20 (TOM20N) fusionada a 3xFLAG y al fragmento GFP1-10, y con 0.5 µg del plásmido pcDNA3.1_ERj1N-V5-GFP11, que codifica una construcción dirigida al retículo endoplasmático mediante la secuencia N-terminal de ERj1 (ERj1N) fusionada a V5 y al fragmento GFP11. En conjunto, ambas construcciones conforman el sistema Split-GFP, en el cual la proximidad entre RE y mitocondria permite la reconstitución de la fluorescencia GFP, estos plásmidos fueron comprados a RIKEN BRC a través del National BioResource Project del Ministerio de Educación, Cultura, Deportes, Ciencia y Tecnología (MEXT) de Japón. Se utilizó 1.5 µL de lipofectamina-2000 (Invitrogen, CA, USA) por cada µg de plásmido a utilizar, según recomendación del fabricante. Se preparó una solución con el mix de plásmidos en opti-MEM (Gibco) y otra con lipofectamina en opti-MEM (Gibco), cada una se incubó 5 min por separado, luego se mezclaron, homogenizaron e incubaron por 20 min a temperatura ambiente. Esta solución se agregó a las células por 4 h, y luego se realizó un cambio de medio de cultivo. Las células fueron utilizadas 24 h post-transfección.

Western Blot. Luego de cuantificar, todas las muestras se mezclaron con *buffer* de carga 4X de composición mM (31.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 *buffer* 10% glycerol 1% SDS 0.005% Bromophenol Blue, 355 mM 2-mercaptoethanol) y se desnaturalaron a 95 °C por 10-15 min. Se cargaron 30 µg de proteína por carril en geles de poliacrilamida 10%. La electroforesis se realizó a 100 V, por 100 min a temperatura ambiente. Posterior a esto, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de poro 0.22 µm a 250 mA, por 120 min. La membrana se bloqueó por 1 h a temperatura ambiente con BSA (5%, en TBS Tween 1X) o con phosphoBLOCKER (5%, en TBS Tween 1X. Cell Biolabs) en el caso de proteínas fosforiladas. Los anticuerpos primarios descritos en la Tabla 2 se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-tween 1X y se incubaron los anticuerpos secundarios descrito en la Tabla 2, por 1 h, a temperatura ambiente. Las bandas inmunorreactivas fueron reveladas con el kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) y el sistema de detección Odyssey FC (Li-COR) cuando se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP; o el sistema Odyssey CL×Infrared Imaging (Li-COR Biosciences GmbH) en el caso de anticuerpos secundarios fluorescentes. La cuantificación de la inmunoreactividad de las bandas se llevó a cabo con el *software* FIJI, y la normalización se realizó para cada banda con la correspondiente proteína de control de carga.

Tabla 2. Listado anticuerpos utilizados en *Western Blot*.

Anticuerpo Primario	Especie	Empresa	Referencia	Dilución
AMPK α	Mouse	Cell Signaling	2532S	1:1000
Phospho-AMPK α Thr172	Rabbit	Cell Signaling	50081S	1:1000
Mfn2	Rabbit	Cell Signaling	9482S	1:1000
β -actina	Mouse	Santa Cruz	sc-69879	1:10 000
Phospho-ULK Ser555	Rabbit	Cell Signaling	5869S	1:1000
Phospho-PDH S293	Rabbit	Cell Signaling	31866S	1:2000
PDH	Rabbit	Cell Signaling	2784S	1:1000
Anticuerpo Secundario	Especie	Empresa	Referencia	Dilución
Anti-rabbit IgG HRP	Rabbit	SIGMA	A0545	1:5 000
Anti-mouse IgG HRP	mouse	Bio-Rad	1721011	1:5 000
DyLight™ 680 Donkey anti-Mouse IgG (H+L)	Mouse	ThermoFisher Scientific	SA5-A10038	1:10 000
DyLight™ 800 Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	Rabbit	ThermoFisher Scientific	SA5-10044	1:10 000

Inmunocitoquímica. Una vez obtenidas, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 min a T° ambiente. Posterior a esto, las células se permeabilizaron y bloquearon con una solución de PBS 1X que contiene Tritón X-100 al 0.1% y suero de caballo al 10% durante 30 min a T° ambiente. Las muestras se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios (Tabla 3), y posterior se lavaron 3 veces con PBS 1X y se incubaron con los anticuerpos secundarios (tabla 3) por 45 minutos. Finalmente, se agregó la tinción nuclear DAPI (Tocris) a una concentración de 300 nM y las células

se montaron con el medio de montaje de fluorescencia DAKO (Dako Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium). La cuantificación de la inmunofluorescencia se realizó en ImageJ mediante la selección de células individuales y de regiones adyacentes sin fluorescencia para estimar el fondo, registrando los parámetros de área, densidad integrada y valor medio de gris. A partir de estos datos, se calculó la fluorescencia total corregida de cada célula (CTCF), utilizando la fórmula: $CTCF = \text{densidad integrada} - (\text{área de la célula} \times \text{fluorescencia media del fondo})$, de acuerdo con un protocolo previamente descrito.

Tabla 3. Listado anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica

Anticuerpo Primario	Especie	Empresa	Referencia	Dilución
Mfn2	Rabbit	Cell Signaling	9482S	1:200
β -actina	Mouse	Santa Cruz	sc-69879	1:400
MAP2	Guinea Pig	Synaptic System	188 004	1:200
TOM20	Mouse	Santa Cruz	Sc-17764	1:200
Faloidina AF488	-	Invitrogen	A12379	1:200
Anticuerpo secundario	Especie	Empresa	Referencia	Dilución
Anti-IgG Mouse AF 488	Mouse	Jackson Inm. Lab.	115-545-003	1:200
Anti-IgG Rabbit AF 647	Rabbit	Jackson Inm. Lab.	111-605-003	1:200
Anti-IgG Rabbit Cy3	Rabbit	Jackson Inm. Lab.	111-165-003	1:200
Anti-IgG Mouse Cy5	Mouse	Jackson Inm. Lab.	115-175-166	1:200
Anti-IgG GP AF647	Guinea Pig	PROGEN	80308	1:200

Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). El potencial de membrana mitocondrial se evaluó con la sonda JC-1 (Invitrogen, M34152) un colorante catiónico fluorescente sensible al estado de polarización de la membrana mitocondrial. En mitocondrias funcionales y altamente polarizadas, JC-1 forma agregados que emiten fluorescencia roja (590 nm), mientras que en mitocondrias despolarizadas permanece en forma monomérica, emitiendo fluorescencia verde (530 nm). Así, la relación roja/verde constituye un índice confiable de la integridad mitocondrial. Se realizó en microplaca de 96 pocillos. La sonda se reconstituyó en DMSO a 200 μM y se diluyó en DPBS 1X para una concentración final de 2 μM por pocillo. Las células se incubaron 30 min a 37 °C, protegidas de la luz, se lavaron 2 veces con DPBS 1X durante 1 minuto y se midieron de inmediato en un lector de microplacas NOVOstar (BMG LABTECH) registrando el monómero (verde; Ex 485 nm / Em 535 nm) y el agregado (rojo; Ex 535 nm / Em 590–595 nm). La polarización mitocondrial se expresó como razón roja/verde por pocillo. Como control de despolarización se utilizó FCCP 1 μM .

Viabilidad celular (MTT). La viabilidad celular se evaluó con MTT (Thiazolyl Blue tetrazolium bromide; AmBeed) en microplaca de 96 pocillos. Se preparó un *stock* estéril de 1 mg/mL en PBS 1X (protegido de la luz), se añadió 100 μL /pocillo de esta solución directamente sobre las células y se incubó 3–4 h a 37 °C. Finalizada la incubación, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y los cristales de formazán

se disolvieron con isopropanol 100% (100 μ L/pocillo, 10–15 min con agitación suave). La absorbancia se registró a 570 nm en un lector de microplacas NOVOstar (BMG LABTECH). Los datos se expresaron como viabilidad % del control. Como control de muerte se utilizó FCCP 1 μ M.

Electrofisiología. Se registraron corrientes postsinápticas espontáneas totales y miniaturas (mEPSCs) en cultivos de hipocampo de ratón control, tras tratamiento con A β Os 0.5 μ M o Compuesto C 10 μ M por 1 h. Los registros se realizaron con un Axopatch 200B (Axon Instruments) en *voltage clamp* a -60 mV, durante 2–4 min por célula. Para mEPSCs, se añadieron TTX 50 nM y bicuculina 5 μ M para suprimir la actividad dependiente de potenciales de acción y bloquear receptores GABAA; las corrientes espontáneas totales se registraron sin bloqueadores. La solución externa (mM) contiene: NaCl 150, KCl 5.4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, glucosa 10, HEPES 10; pH 7.4; 320 mOsm; y la solución interna contiene (mM): KCl 120, MgCl₂ 4, HEPES 10, ATP 2, GTP 0.5, EGTA 8; pH 7.4; 300 mOsm. Para estos registros se utilizaron micropipetas de borosilicato (Kwik-Fil Borosilicate Glass). Las señales se filtraron a 2 kHz y la adquisición se efectuó con el *software* Clampex 10.1 y el análisis con Clampfit 10.1 (Axon Instruments), evaluando amplitud y frecuencia de los eventos, (Fuentealba et al., 2012).

Microscopía electrónica de barrido de bloque en serie (SBF-SEM) y reconstrucción 3D. Las imágenes seriadas para la reconstrucción tridimensional se obtuvieron mediante microscopía electrónica de barrido de bloque en serie (SBF-SEM) en un equipo Thermo Fisher VolumeScope 2, que integra un ultramicrotomo y un SEM de emisión de campo de alta resolución para la adquisición secuencial de imágenes a lo largo del eje z. Tras 24 h de fijación, los tejidos se procesaron siguiendo el protocolo del National Center for Microscopy and Imaging Research (NCMIR, La Jolla, CA) (Deerinck et al., 2022). Brevemente, las muestras se lavaron en tampón cacodilato 0.1 M suplementado con CaCl_2 2 mM y se sometieron a incubaciones secuenciales con tetróxido de osmio, ferrocianuro de potasio y tiocarbhidrazida, seguidas de enjuagues e incubaciones en acetato de uranilo, aspartato de plomo y gradientes crecientes de etanol. Posteriormente, las muestras se embebieron en resina dura Embed-812 (EMS, Hatfield, PA, USA) y se dejaron polimerizar por al menos 24 h. Los bloques obtenidos se recortaron, montaron en pines de aluminio y se metalizaron con oro-paladio. Las imágenes seriadas se adquirieron en condiciones de alto vacío o baja presión de vapor de agua, con un espesor de corte de 50 nm, obteniéndose un tamaño de voxel final de $5 \times 5 \times 50$ nm.

Segmentación y análisis morfométrico tridimensional. La segmentación y el análisis tridimensional se realizaron con el *software* AMIRA 6.4. Las dendritas se identificaron en función de la presencia de espinas dendríticas, y tanto las

mitocondrias como el retículo endoplasmático fueron segmentados manualmente dentro de estas estructuras. Para ello, se utilizaron las herramientas Brush y Lasso, excluyendo del análisis aquellos organelos con bordes incompletos. Posteriormente, los distintos conjuntos de datos fueron renderizados en volumen de manera simultánea, asignando colores específicos a cada estructura celular y utilizando selección tridimensional basada en umbrales.

Para el análisis cuantitativo de la morfología mitocondrial se utilizaron las funciones Label Analysis y Measure de AMIRA. En cada mitocondria segmentada se determinaron los siguientes parámetros morfométricos: volumen mitocondrial, definido como el espacio tridimensional ocupado por cada organelo; área superficial, correspondiente a su superficie externa total; longitud mitocondrial, estimada como la distancia máxima entre los extremos del organelo; y esfericidad, índice adimensional que refleja su grado de compactación o redondez, donde valores cercanos a 1 indican una morfología más esférica. En conjunto, estos parámetros permiten distinguir entre estados de fusión mitocondrial, caracterizados por organelos más elongados y con menor esfericidad, y estados de fisión o daño estructural, asociados a mitocondrias fragmentadas y con mayor esfericidad. La cobertura mitocondrial por MAMs se estimó como la relación entre el área y el volumen del retículo endoplasmático en contacto con cada mitocondria (Panés et al., 2023).

Análisis de datos. Todos los experimentos se realizaron en al menos tres repeticiones biológicas independientes. Los resultados fueron graficados como promedio \pm error estándar de la media y expresados como porcentaje del control. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (para comparaciones de múltiples grupos). Se consideró significancia estadística si $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el *software* GraphPad Prism 9.5.0 (GraphPad Prism, CA, USA).

RESULTADOS

I. **Evaluar la actividad de AMPK en líneas celulares y cultivos primarios de neuronas tratadas con oligómeros solubles del péptido β -amiloide.**

Con el objetivo de determinar si los oligómeros solubles del péptido β -amiloide ($A\beta$ Os) modulan la actividad de AMPK en modelos celulares de la enfermedad de Alzheimer, se evaluaron células PC12 y cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón de 14 DIV expuestos a $A\beta$ Os (0.5 μ M). Para abordar farmacológicamente la participación de AMPK en esta respuesta, se utilizaron dos estrategias complementarias: AICAR (1 mM), un activador indirecto de AMPK que ingresa a la célula y es metabolizado a ZMP, un análogo de AMP capaz de favorecer la activación de la quinasa; y Compuesto C (10 μ M), también conocido como dorsomorfina, un inhibidor farmacológico ampliamente utilizado para reducir la actividad de AMPK, aunque con efectos no completamente selectivos sobre otras quinasas. La inclusión de ambos compuestos permitió evaluar la direccionalidad de la respuesta, comparando los efectos de promover o inhibir farmacológicamente la actividad de AMPK en presencia de $A\beta$ Os. Los análisis se realizaron a 1 h y 24 h, con el fin de distinguir entre una activación temprana y una respuesta sostenida de AMPK en ambos modelos celulares.

En comparación con el control ($100\% \pm 2.052$), los tratamientos de 24 h con A β Os ($70.35\% \pm 3.363$), AICAR ($65.94\% \pm 4.436$) y A β Os + AICAR ($37.27\% \pm 2.538$; **Fig. 5A**) redujeron significativamente los cristales de formazán, en magnitud comparable a FCCP ($39.10\% \pm 3.687$). En contraste, Compuesto C no afectó la viabilidad por sí solo ($96.99\% \pm 5.167$) y, atenuó la disminución inducida por A β Os y por AICAR, recuperando la viabilidad celular a $91.12\% \pm 4.068$ con A β Os + Compuesto C y a $74.83\% \pm 3.706$ con AICAR + Compuesto C respectivamente. En conjunto, estos resultados indican que la activación de AMPK contribuye, al menos parcialmente, a la toxicidad inducida por A β Os. Consistentemente, la activación farmacológica de AMPK mediante AICAR mimetizó este efecto, mientras que su inhibición con Compuesto C mitigó la disminución de la viabilidad celular.

Los resultados muestran que Compuesto C fue capaz de recuperar la disminución de viabilidad celular inducida por A β Os en un 30%, lo que sugiere que la activación de AMPK contribuye de manera importante a la citotoxicidad observada en este modelo. En concordancia, la capacidad de Compuesto C para atenuar también la disminución de viabilidad inducida por AICAR refuerza la idea de que la activación farmacológica de AMPK es suficiente para comprometer la viabilidad celular.

Con el fin de evaluar la actividad de AMPK, determinada como la razón pAMPK/AMPK total, se analizaron células PC12 y cultivos primarios de neuronas hipocampales expuestos a A β Os, AICAR y Compuesto C durante tiempos agudos (1

h) y crónicos (24 h). En células PC12, los tratamientos de 1 h con A β Os y AICAR aumentaron la razón pAMPK/AMPK total, indicando una activación de AMPK (A β Os: 126.7% \pm 11.23; AICAR: 169.9% \pm 13.54; A β Os + AICAR: 146.9% \pm 6.610), mientras que Compuesto C redujo esta razón y, en co-tratamiento, evitó el incremento inducido por A β Os, manteniéndola cercana a los niveles basales (Compuesto C: 79.24% \pm 10.13; A β Os + CC: 83.22% \pm 6.721; control: 100% \pm 0.873). A las 24 h se observó el mismo patrón, aunque con una mayor magnitud de activación en respuesta a A β Os y AICAR, junto con una inhibición consistente por Compuesto C. En neuronas hipocampales, A β Os también indujo un aumento en la razón pAMPK/AMPK total tanto a 1 h como a 24 h, mientras que Compuesto C disminuyó esta señal incluso por debajo de los niveles control, tanto en ausencia como en presencia de A β Os (1 h: A β Os 179.7% \pm 36.56; Compuesto C 72.25% \pm 3.063; A β Os + CC 65.75% \pm 11.83; 24 h: A β Os 158.8% \pm 5.106; Compuesto C 80.59% \pm 2.477; A β Os + CC: 83.79% \pm 15.94). En conjunto, estos resultados confirman que A β Os y AICAR inducen la activación de AMPK en ambos modelos celulares, mientras que Compuesto C revierte eficazmente este efecto, reduciendo la actividad de la quinasa incluso por debajo de los niveles basales, lo que respalda su efectividad como inhibidor farmacológico de esta vía.

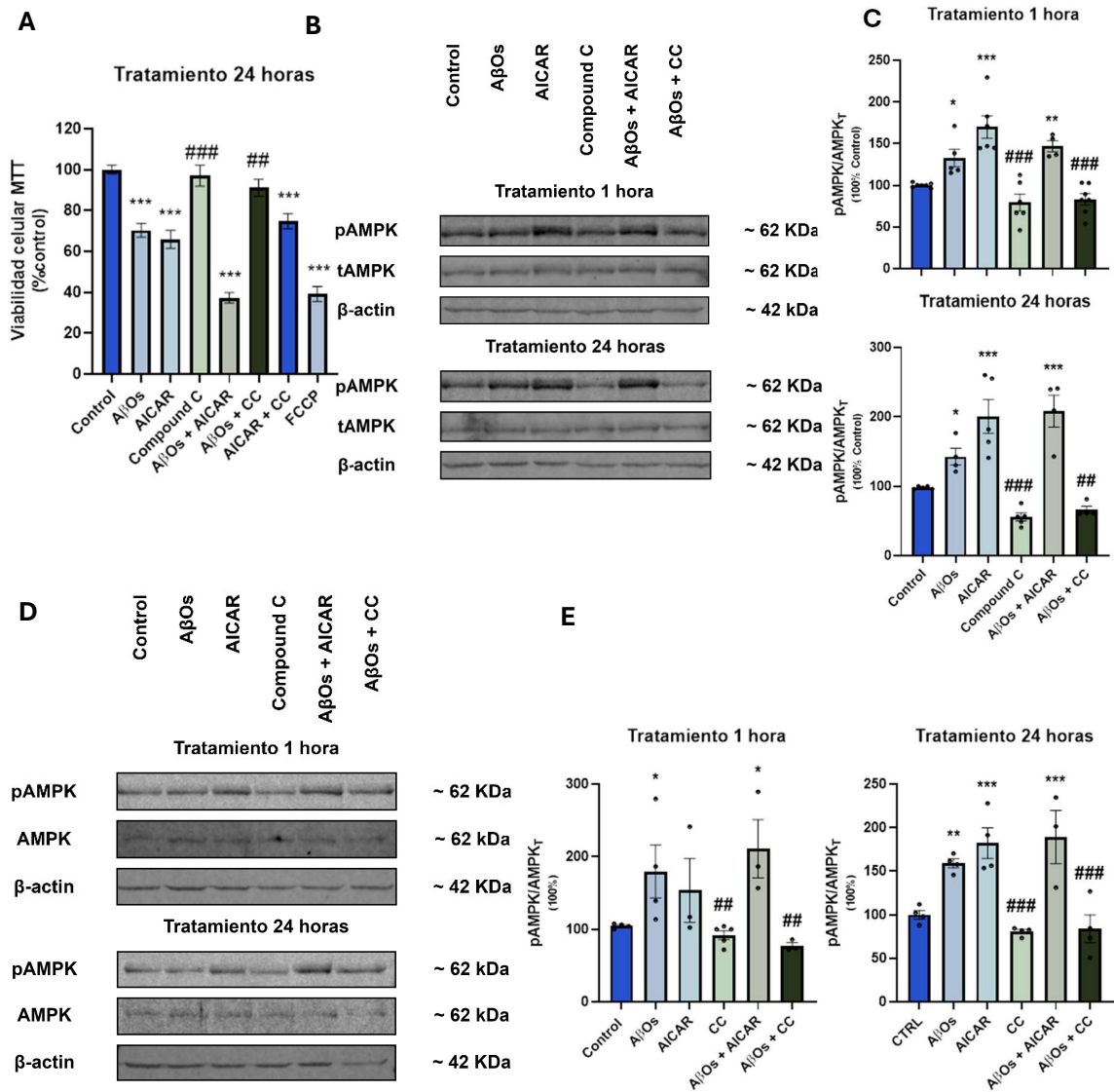


Figura 5. A β O_s inducen la activación sostenida de AMPK en células PC12 y neuronas hipocampales de ratón. **(A)** Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT en células PC12 tratadas con A β O_s (0.5 μ M), AICAR (1 mM), Compuesto C (10 μ M) y FCCP (1 μ M). Control 100% \pm 2.052; A β O_s 70.35% \pm 3.363; AICAR 65.94% \pm 4.436; A β O_s + AICAR 37.27% \pm 2.538; FCCP 39.10% \pm 3.687; Compuesto C 96.99% \pm 5.167; A β O_s + CC 91.12% \pm 4.068; AICAR + CC 74.83% \pm 3.706. **(B-C)** Células PC12 fueron tratadas con oligómeros solubles de β -amiloide (A β O_s, 0.5 μ M), el activador de AMPK AICAR (1 mM) o el inhibidor Compuesto C (10 μ M), de manera individual o combinada, durante 1 o 24 horas. **(B)** *Western Blot* representativo de pAMPK (Thr172), AMPK total, expresada como porcentaje respecto al control, ambos fueron normalizados con respecto a β -actina. **(C).** **(D-E)** Cultivo primario de neuronas hipocampales de ratón fueron tratadas bajo las mismas condiciones anteriores. **PC12 – 1 h:** Control 100% \pm 0.873; A β O_s 126.7% \pm 11.23; AICAR 169.9% \pm 13.54; Compuesto C 79.24% \pm 10.13; A β O_s + AICAR 146.9% \pm 6.610; A β O_s + CC 83.22% \pm 6.721 **PC12 – 24 h:** Control 98.82% \pm 0.807; A β O_s 137.7% \pm 14.56; AICAR 200.4% \pm 24.26; Compuesto C 55.61% \pm 5.853; A β O_s + AICAR 208.1% \pm 22.96; A β O_s + CC 65.92% \pm 5.157. **(D)** *Western Blot* representativo de pAMPK (Thr172), AMPK total, expresada como porcentaje respecto al control, ambos fueron normalizados con respecto a β -actina. **(E)** Cuantificación de pAMPK normalizada a AMPK total. **NHR – 1 h:** Control 100% \pm 6.597; A β O_s 179.7% \pm 36.56; AICAR 136.0% \pm 35.70; Compuesto C 72.25% \pm 3.063; A β O_s + AICAR 174.7% \pm 61.72; A β O_s + CC 65.75% \pm 11.83. **NHR – 24 h:** Control 100% \pm 4.967; A β O_s 158.8% \pm 5.106; AICAR 182.2% \pm 17.49; Compuesto C 80.59% \pm 2.477; A β O_s + AICAR 189.0% \pm 30.45; A β O_s + CC 83.79% \pm 15.94. Datos expresados como media \pm SEM; * vs control; # vs A β O_s; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, ANOVA de una vía. **A**, n=5; **B**, n=6; **D**, n=4.

II. Correlacionar la actividad de AMPK con los niveles de Mfn2 en células tratadas con A β O.

Para postular una correlación entre la activación de AMPK con la reorganización mitocondrial, centramos nuestro estudio en evaluar los cambios en mitofusina-2 (Mfn2), una GTPasa de la membrana externa mitocondrial que dirige la fusión y participa en los contactos funcionales entre retículo endoplasmático y mitocondria, llamadas MAMs.

En este contexto, evaluamos cómo los tratamientos con A β O y la modulación farmacológica de AMPK, afectaron los niveles de Mfn2. Para esto se trataron células PC12 con A β O (0.5 μ M) y AICAR (1 mM) de manera individual y en co-tratamientos, y se pudo observar mediante *Western Blot* (**Fig. 6A-C**) que 1 h de tratamiento A β O genera un incremento en los niveles de Mfn2 que no es significativamente diferente del control, y que AICAR aumenta significativamente los niveles en relación con el control (Control 100.0% \pm 0.00; **A β O 138.5% \pm 18.66**; AICAR 163.0% \pm 21.64; A β O + AICAR 145.2% \pm 15.59). A 24 h, este aumento se acentuó tanto para los tratamientos con A β O (0.5 μ M) como con AICAR (1 mM) (Control 99.82% \pm 1.142; **A β O 158.3% \pm 16.16**; AICAR 182.8% \pm 26.62; A β O + AICAR 155.7% \pm 13.92). Cuando utilizamos el inhibidor de la actividad de AMPK, Compuesto C, se observa que se previene el aumento en los niveles de Mfn2 tanto a 1 como a 24 horas (1 h:

A β Os 138.5% \pm 18.66; A β Os + CC 80.39% \pm 6.926; 24 h: A β Os 158.3% \pm 16.16; A β Os + CC 90.35% \pm 13.93). Este efecto podría ser un indicativo de que modular la sobreactivación de AMPK, podría ser beneficioso para evitar una posible reorganización mitocondrial inducida por A β Os y mediada por Mfn2. De igual manera, al evaluar los niveles de Mfn2 mediante *Western Blot* en neuronas hipocámpales de ratón, posterior a 24 horas de tratamiento con A β Os y AICAR (**Fig. 6G-H**), se observó un comportamiento similar que en células PC12; un aumento significativo de los niveles de Mfn2 en comparación con el control (Control 100.4% \pm 1.099; **A β Os 137.9% \pm 2.441**; AICAR 157.7% \pm 11.63; A β Os + AICAR 173.6% \pm 58.47) y nuevamente, al utilizar Compuesto C, se previene este aumento (Compuesto C 62.92% \pm 6.314; **A β Os + CC 42.88% \pm 9.454**), reforzando la idea de que el eje A β Os – AMPK – Mfn2 está relacionado con la toxicidad amiloide que desorganiza el normal funcionamiento celular.

Al analizar los niveles de Mfn2 mediante inmunocitoquímica en células PC12 (**Fig. 6D-E**) tras tratamientos de 1 h y 24 h con A β Os (0.5 μ M), se observa un aumento sostenido de la inmunofluorescencia específica para Mfn2 (1 h: Control 100.0% \pm 3.273; **A β Os 146.0% \pm 5.260**; AICAR 119.8% \pm 5.505; A β Os + AICAR 122.4% \pm 3.751; 24 h: Control 100.0% \pm 3.273; **A β Os 147.4% \pm 5.630**; AICAR 132.6% \pm 6.530; A β Os + AICAR 125.3% \pm 6.147) y este aumento, en concordancia con los resultados de *Western Blot* anteriores, se previene al utilizar Compuesto C (10 μ M, 1 h: Compuesto

C 111.0% ± 7.362; **AβOs + CC 105.1% ± 5.047**; 24 h: Compuesto C 101.1% ± 5.159; **AβOs + CC 109.1% ± 5.775**).

Estos hallazgos demuestran que los cambios en Mfn2 inducidos por AβOs dependen de la activación de AMPK, lo que sugiere que esta quinasa podría actuar como un mecanismo compensatorio para mantener la integridad mitocondrial. Además, su activación sostenida en el tiempo podría ser un factor asociado con la remodelación mitocondrial y, finalmente, con el estrés mitocondrial y metabólico inducido por Aβ.

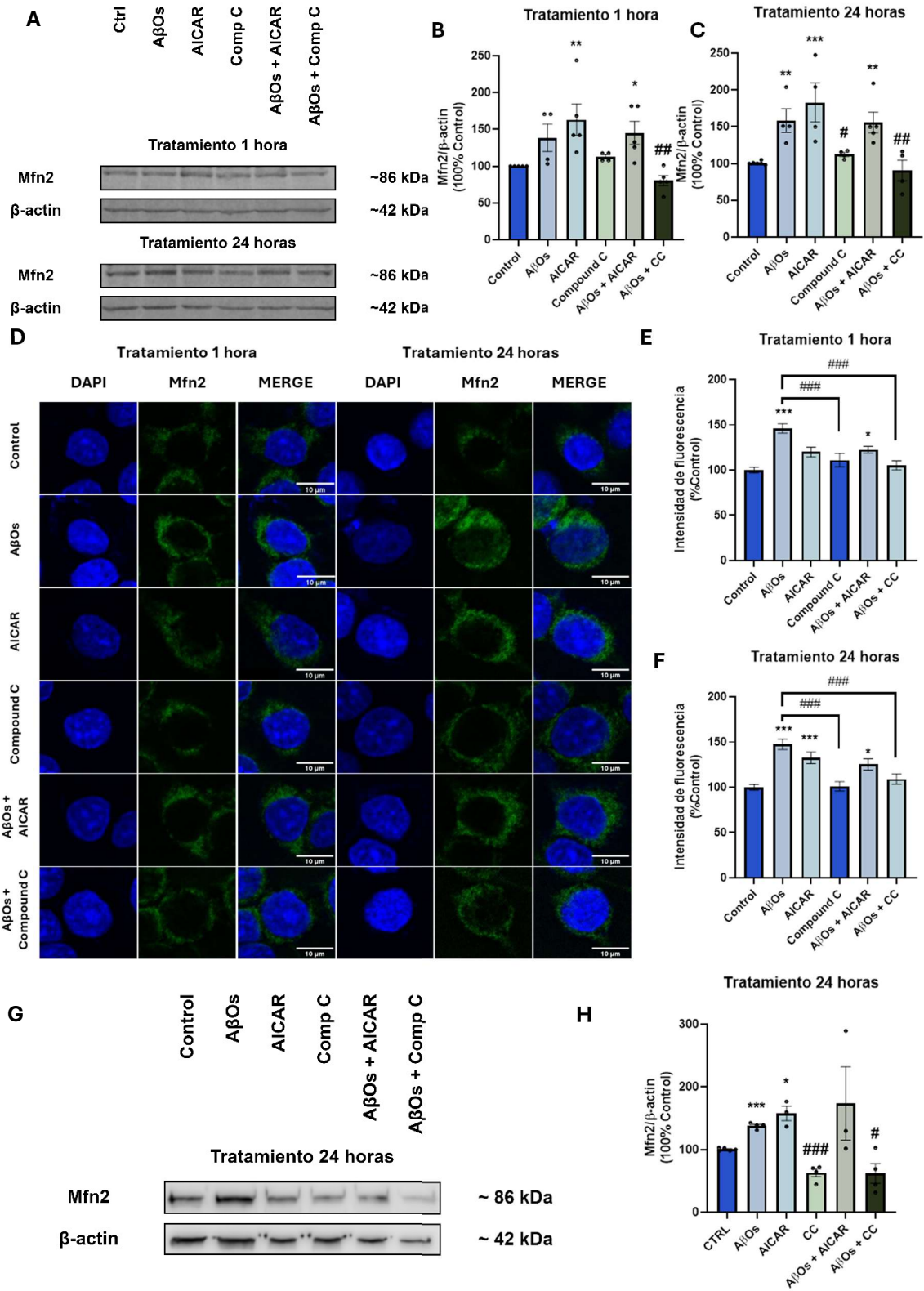


Figura 6. AβOs elevan Mfn2 en células PC12 y neuronas hipocampales de ratón de forma dependiente de AMPK. Células PC12 y Neuronas Hipocampales de Ratón fueron tratadas con AβOs (0.5 μM), el activador de AMPK AICAR (1 mM) o el inhibidor Compuesto C (10 μM), de forma individual o combinada, durante 1 o 24 horas. **(A)** *Western Blot* representativo de lisados totales de células PC12 mostrando los niveles de Mfn2 y β-actina como control de carga. **(B–C)** Cuantificación de Mfn2 normalizado a β-actina, expresado como porcentaje respecto al control. **Western Blot PC12-1 h:** n=4, Control 100.0% ± 0.0003523; AβOs 138.5% ± 18.66; AICAR 163.0% ± 21.64; Compuesto C 119.3% ± 6.824; AβOs + AICAR 145.2% ± 15.59; AβOs + CC 80.39% ± 6.926; **PC12-24 h:** n=4, Control 99.82% ± 1.142; AβOs 158.3% ± 16.16; AICAR 182.8% ± 26.62; Compuesto C 119.6% ± 3.703; AβOs + AICAR 155.7% ± 13.92; AβOs + CC 90.35% ± 13.93. **(D–F)** Inmunocitoquímica representativa de células PC12 mostrando Mfn2 (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul) a 1 y 24 h, junto con la cuantificación de la fluorescencia. **Mfn2 inmunocitoquímica – 1 h:** n=3, Control 100.0% ± 3.273; AβOs 146.0% ± 5.260; AICAR 119.8% ± 5.505; Compuesto C 111.0% ± 7.362; AβOs + AICAR 122.4% ± 3.751; AβOs + CC 105.1% ± 5.047. **Mfn2 inmunocitoquímica – 24 h:** n=3, Control 100.0% ± 3.273; AβOs 147.4% ± 5.630; AICAR 132.6% ± 6.530; Compuesto C 101.1% ± 5.159; AβOs + AICAR 125.3% ± 6.147; AβOs + CC 109.1% ± 5.775. **(G–H)** Cultivo primario de neuronas hipocampales de ratón fueron tratadas bajo las mismas condiciones durante 24 h; se muestran el *Western Blot* y la cuantificación relativa de Mfn2 normalizado a β-actina. **Western Blot Mfn2 – 24 h:** n=4, Control 100.4% ± 1.099; AβOs 137.9% ± 2.441; AICAR 157.7% ± 11.63; Compuesto C 62.92% ± 6.314; AβOs + AICAR 173.6% ± 58.47; AβOs + CC 42.88% ± 9.454. Datos expresados como media ± SEM; * vs control; # vs AβOs; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ANOVA de una vía.

Con el fin de determinar el impacto de la ausencia de AMPK en la fisiopatología amiloide, se indujo un *knockdown* simultáneo de las subunidades catalíticas α1 y α2 de AMPK en células SH-SY5Y que sobreexpresan de manera estable APP^{swe}, un modelo ampliamente utilizado de enfermedad de Alzheimer familiar y de sobreexpresión/producción de AβOs (Hoffmann et al., 2023). Posteriormente, se evaluó el efecto del *knockdown* sobre parámetros de disfunción metabólica y sobre el flujo autofágico.

Mediante *Western Blot* (**Fig. 7A–C**), se observó una reducción significativa de la razón pAMPK Thr172/AMPK en células APP^{swe} respecto del control, consistente

con una menor activación relativa de AMPK en este contexto amiloide crónico de sobreexpresión estable de APPswe (control: 100.0% ± 12.55; **APPswe: 40.37% ± 10.48**). En la condición APPswe α1α2 KD, la razón pAMPK/AMPK no mostró diferencias significativas respecto del control y alcanzó valores de **87.11% ± 2.816**. Sin embargo, esta aparente recuperación debe interpretarse con cautela, ya que el *knockdown* produjo una disminución significativa de los niveles de AMPK total. Por lo tanto, al normalizar la señal fosforilada contra una cantidad reducida de AMPK total, la razón pAMPK/AMPK puede mantenerse elevada o cercana al control sin reflejar necesariamente una recuperación funcional de la vía. En este sentido, la menor disponibilidad de AMPK total en las células APPswe α1α2 KD sugiere que la actividad global o capacidad efectiva de señalización de AMPK se encuentra disminuida, a pesar de que la razón pAMPK/AMPK no difiera del control.

En concordancia con los resultados previos, las células APPswe mostraron un aumento significativo en los niveles de Mfn2 (control: 100.0% ± 3.790; **APPswe: 200.7% ± 25.96**) (**Fig. 7D**). Sin embargo, el *knockdown* de AMPK en las células APPswe revirtió este aumento (**APPswe α1α2 KD: 108.5% ± 20.07**), indicando que la regulación de Mfn2 depende, al menos en parte, de la señalización mediada por AMPK también en este modelo amiloide.

Por otro lado, el análisis de pULK Ser555 (**Fig. 7E**), un marcador asociado a la activación de ULK1 por AMPK, mostró una reducción significativa en células APPswe

(control: 100.0% ± 3.333; **APPswe: 47.85% ± 1.475**), lo que sugiere un compromiso del inicio de la respuesta autofágica. Este descenso se mantuvo en las células APPswe α1α2 KD (**41.22% ± 3.869**), indicando que la depleción adicional de AMPK no revierte esta alteración. En conjunto, estos resultados sugieren que, en el contexto APPswe, la señalización de AMPK se encuentra desregulada: mientras la expresión de Mfn2 aún depende de AMPK, la disminución de pULK Ser555 persiste incluso tras su *knockdown*, lo que sugiere que la activación de ULK1 y el inicio de la autofagia ya se encuentran comprometidos en este estado amiloide crónico.

Finalmente, con el fin de evaluar el impacto del contexto APPswe y el rol de AMPK en el metabolismo energético, se estudió la fosforilación inhibitoria de la enzima piruvato deshidrogenasa mediante la razón pPDH Ser293/PDH (**Fig. 7F–G**). PDH es una enzima clave para conectar el metabolismo de la glucosa con el ciclo de Krebs y la producción de energía mitocondrial. Se observó un aumento de la razón pPDH/PDH en células APPswe respecto del control (control: 100.0% ± 32.48; **APPswe: 198.7% ± 32.73**), lo que es consistente con una mayor inactivación relativa de PDH y con una alteración del metabolismo energético mitocondrial. Este efecto se acentuó en las células APPswe α1α2 KD, donde la razón pPDH/PDH aumentó hasta **398.9% ± 73.61**, alcanzando diferencias significativas respecto del control y de las células APPswe. Estos resultados sugieren que la deficiencia de AMPK potencia la fosforilación inhibitoria de PDH y, por lo tanto, podría agravar la

disminución en la oxidación de piruvato, reforzando la hipótesis de que AMPK cumple un papel relevante en la regulación del metabolismo energético neuronal alterado en la enfermedad de Alzheimer.

En conjunto, estos resultados amplían la evidencia obtenida en los modelos de exposición aguda a A β O s , en los que la modulación farmacológica de AMPK alteró significativamente la viabilidad celular, y sugieren que la participación de esta quinasa en la fisiopatología amiloide depende del contexto experimental. Mientras que en los modelos agudos AMPK contribuye a la respuesta citotóxica inducida por A β O s , en el modelo crónico APP s we su señalización aparece desregulada. En este contexto, la razón pAMPK/AMPK no necesariamente refleja la capacidad funcional total de la vía, debido a la marcada reducción de AMPK total tras el *knockdown*. Esta desregulación se asocia con alteraciones en los niveles de Mfn2, una disminución sostenida de la fosforilación de ULK1 en Ser555 y una mayor fosforilación inhibitoria de PDH. En conjunto, estos hallazgos apoyan que AMPK participa de manera dinámica en la progresión del daño amiloide, vinculando estrés metabólico, homeostasis mitocondrial, autofagia y metabolismo energético.

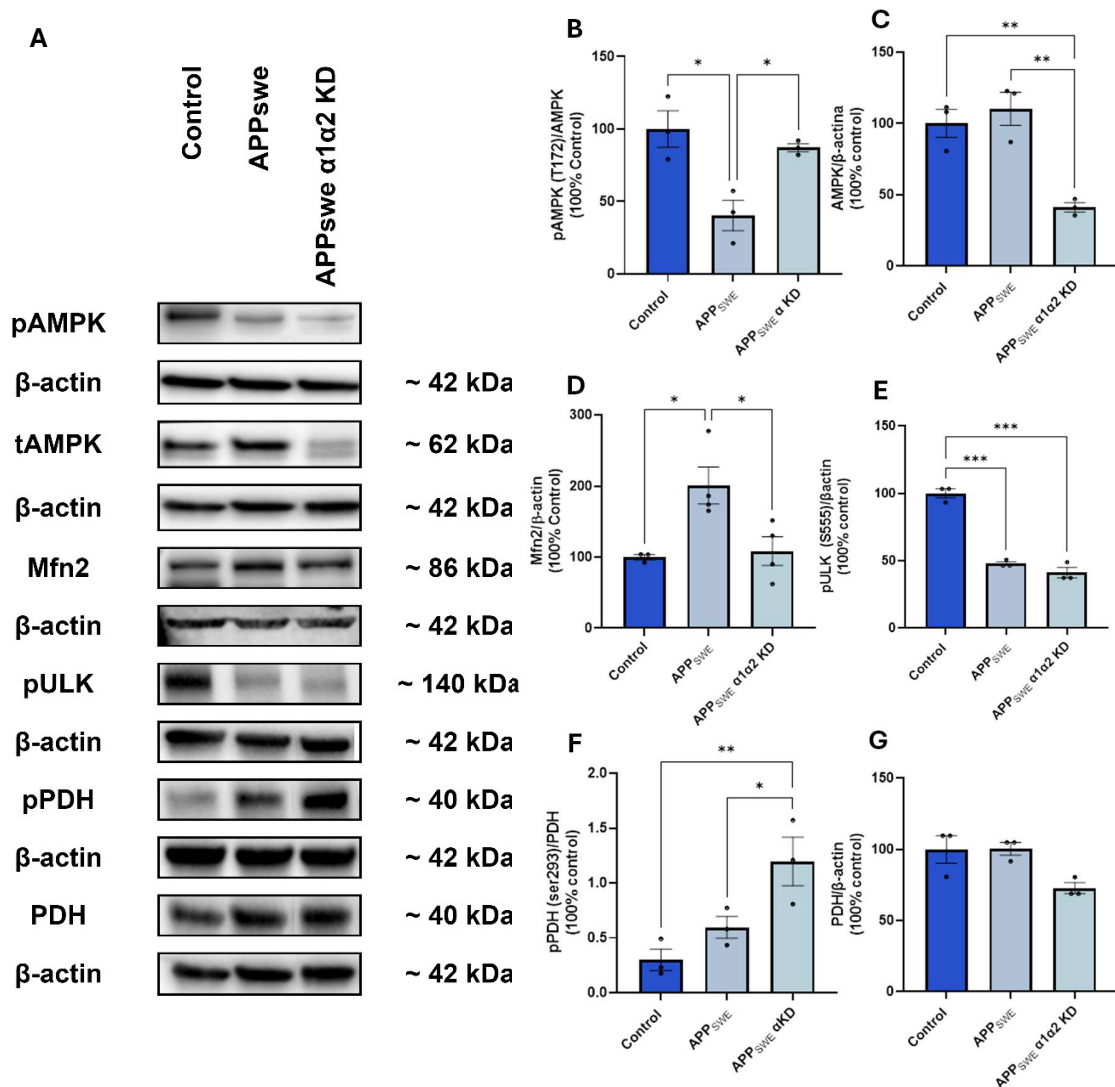


Figura 7. AMPK α 1/ α 2 knockdown intensifica la disfunción metabólica inducida por APPswe, sin revertir la alteración de la autofagia en células SH-SY5Y APPswe. (A) Western Blot representativo de extractos proteicos de células SH-SY5Y Control, APPswe, y APPswe α KD, mostrando los niveles de pAMPK (Thr172), tAMPK, Mfn2, pULK (Ser555), pPDH (Ser293), PDH, y β -actina como control de carga. (B–G) Cuantificación relativa de la señal de cada proteína normalizada con β -actina y expresada como porcentaje respecto al control. Datos expresados como media \pm SEM; * p <0.05, ** p <0.01, * p <0.001, ANOVA de una vía. **pAMPK** — Control 100.0% \pm 7.078; APPswe 43.50% \pm 8.684; APPswe α 1 α 2 KD 36.50% \pm 2.627; **AMPK** — Control 100.0% \pm 9.739; APPswe 110.2% \pm 11.66; APPswe α 1 α 2 KD 41.13% \pm 3.290; **Mfn2** — Control 100.0% \pm 3.790; APPswe 200.7% \pm 25.96; APPswe α 1 α 2 KD 108.5% \pm 20.07; **pULK** — Control 100.0% \pm 3.333; APPswe 47.85% \pm 1.475; APPswe α 1 α 2 KD 41.22% \pm 3.869; **pPDH** — Control 100.0% \pm 27.36; APPswe 213.5% \pm 31.71; APPswe α 1 α 2 KD 349.8% \pm 51.27; **PDH** — Control 100.0% \pm 9.642; APPswe 100.4% \pm 4.424; APPswe α 1 α 2 KD 72.78% \pm 3.885. n=3**

III. Correlacionar los efectos de A β O s sobre indicadores de dinámica mitocondrial, acoplamiento RE-mitocondria, bioenergética y función sináptica frente al estado de actividad de AMPK.

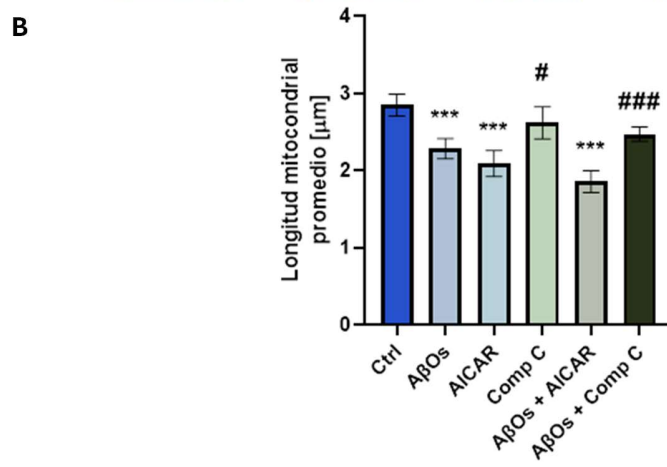
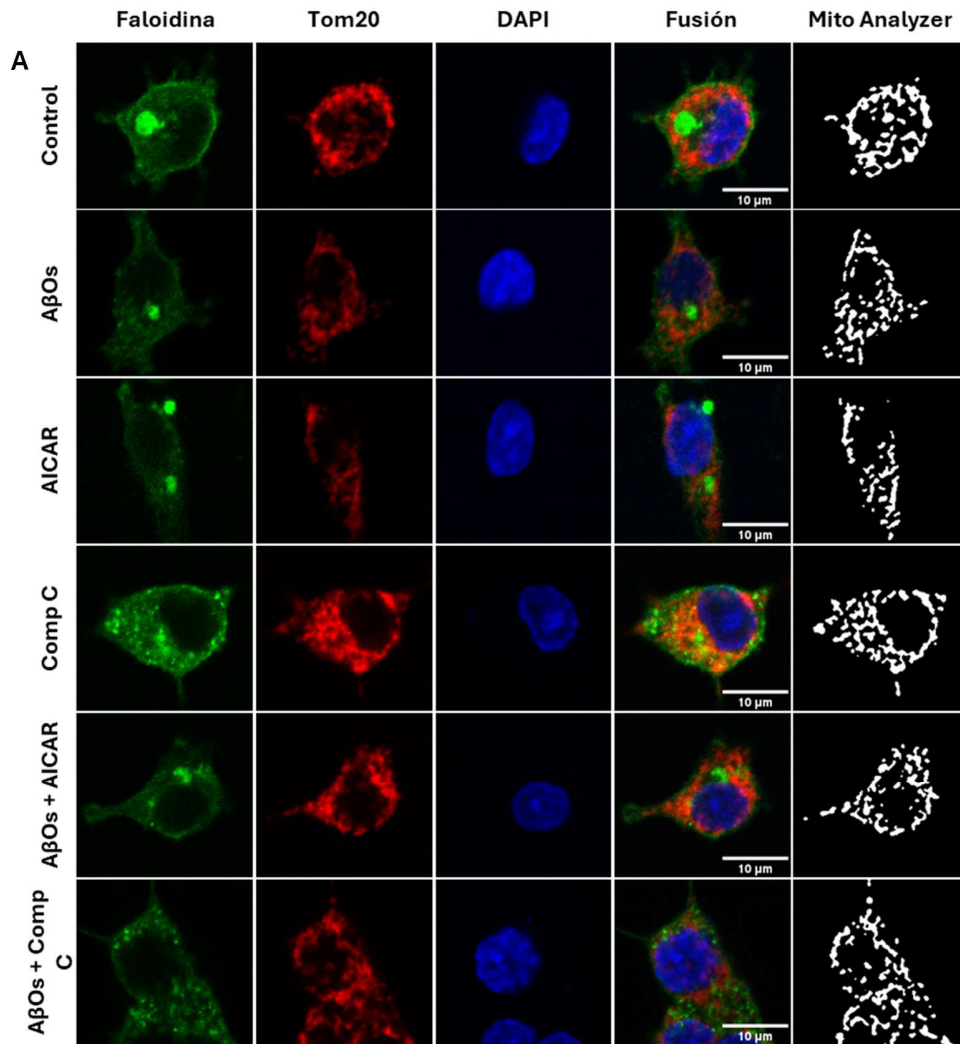
Dado que la dinámica mitocondrial es esencial para el mantenimiento de la función neuronal, la pérdida del equilibrio entre fisión y fusión se ha vinculado estrechamente con la disfunción bioenergética y la degeneración sináptica observadas en la enfermedad de Alzheimer. Por este motivo, se evaluó el impacto de los A β O s sobre la morfología mitocondrial y se identificó el rol modulador de AMPK en este proceso. En primer lugar, mediante microscopía confocal, se analizó la morfología mitocondrial por inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo contra TOM20, un receptor del complejo de translocasa de la membrana externa mitocondrial que se localiza en la membrana mitocondrial externa y participa en el reconocimiento e importación de preproteínas de origen nuclear, su distribución continua en esa membrana permite identificar con alta fidelidad la morfología de la red mitocondrial (Ouellet et al., 2017; Yamamoto et al., 2011). Con este abordaje se cuantificó la longitud promedio y el grado de fragmentación de las mitocondrias bajo los distintos tratamientos. En células PC12 tratamientos con A β O s (0.5 μ M, 24 h) indujeron una disminución significativa en la longitud promedio de las mitocondrias (Control $2.989 \pm 0.145 \mu\text{m}$; **A β O s $2.285 \pm 0.131 \mu\text{m}$**), además, la

distribución de frecuencias de tamaño mostró un desplazamiento hacia mitocondrias más pequeñas y fragmentadas, lo que confirma que A β Os promueven una fragmentación mitocondrial marcada (**Fig. 8A-C**). De manera interesante, el tratamiento con AICAR reprodujo los efectos observados sobre el fenotipo mitocondrial evidenciado con A β Os, y lo mismo se observa en el tratamiento en conjunto con los oligómeros (AICAR $2.090 \pm 0.170 \mu\text{m}$; A β Os + AICAR $1.858 \pm 0.142 \mu\text{m}$). Esto sugiere que la sobreactivación de AMPK bajo estrés amiloide promueve una fisión mitocondrial incrementada. En contraste, Compuesto C previno la fragmentación: con Compuesto C la longitud promedio se mantuvo en valores similares con respecto al control ($2.807 \pm 0.218 \mu\text{m}$) y en co-tratamiento con A β Os (**$2.557 \pm 0.097 \mu\text{m}$**), y la distribución de frecuencias se superpuso a la del control, lo que se traduce en mitocondrias más alargadas y una red continua incluso en presencia de A β Os. En conjunto, este efecto protector indica que la inhibición de AMPK atenúa la disrupción morfológica mitocondrial inducida por A β Os.

De la misma manera, se realizó este mismo ensayo en un modelo de cultivo primario de neuronas hipocámpales de ratón (**Fig. 9A-C**). Aquí pudimos observar resultados similares a lo visto previamente en células PC12, los tratamientos de 24 horas con A β Os ($0.5 \mu\text{M}$) y AICAR (1 mM) inducen una fragmentación significativa de las mitocondrias en comparación con el control (Control $1.506 \pm 0.037 \mu\text{m}$; **A β Os $0.945 \pm 0.035 \mu\text{m}$** ; AICAR $0.969 \pm 0.031 \mu\text{m}$; A β Os + AICAR ($1.075 \pm 0.043 \mu\text{m}$),

desplazando la distribución de frecuencias, lo que implica la presencia de mitocondrias más pequeñas y fragmentadas. Por otro lado, el uso de Compuesto C (10 μ M), es capaz de prevenir esta fragmentación cuando se utiliza en conjunto con A β Os (Compuesto C $1.248 \pm 0.045 \mu$ m; **A β Os + CC $1.382 \pm 0.063 \mu$ m**), manteniendo la cantidad y el tamaño promedio de mitocondrias en rangos similares al control.

En conjunto, estos resultados evidencian que la activación de AMPK tiene un rol en la fragmentación mitocondrial inducida por A β Os, mientras que su inhibición protege parcialmente frente a este efecto. Así, la señalización mediada por AMPK emerge como un modulador clave de la dinámica mitocondrial en el contexto del estrés amiloide, destacando su doble rol potencial como regulador del metabolismo energético y mediador de daño mitocondrial en el contexto de la EA.



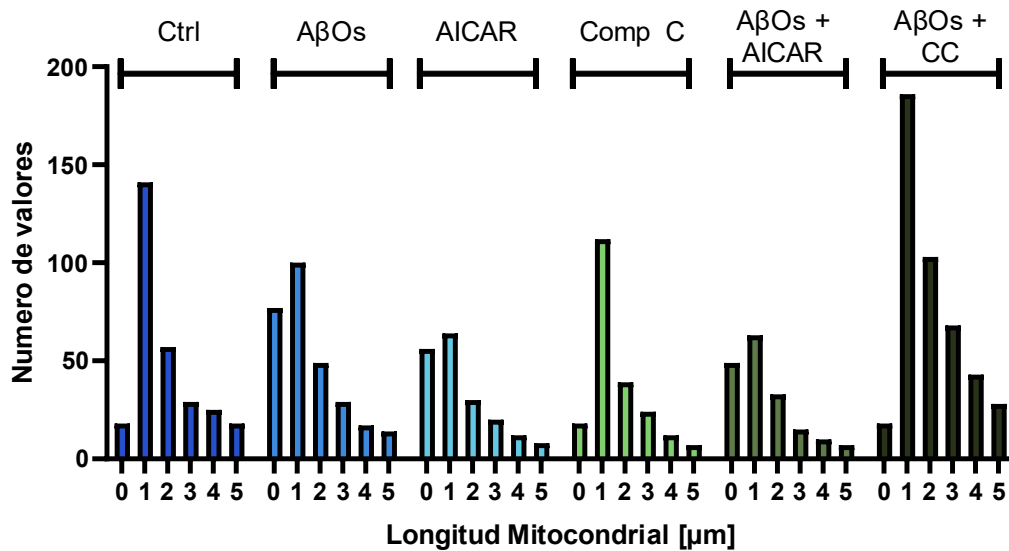
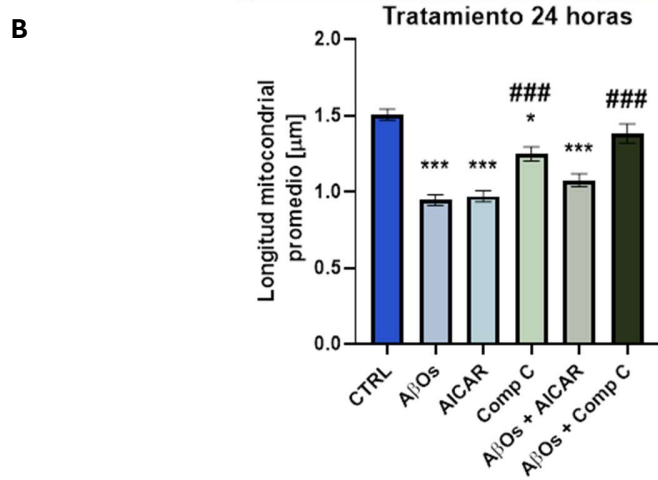
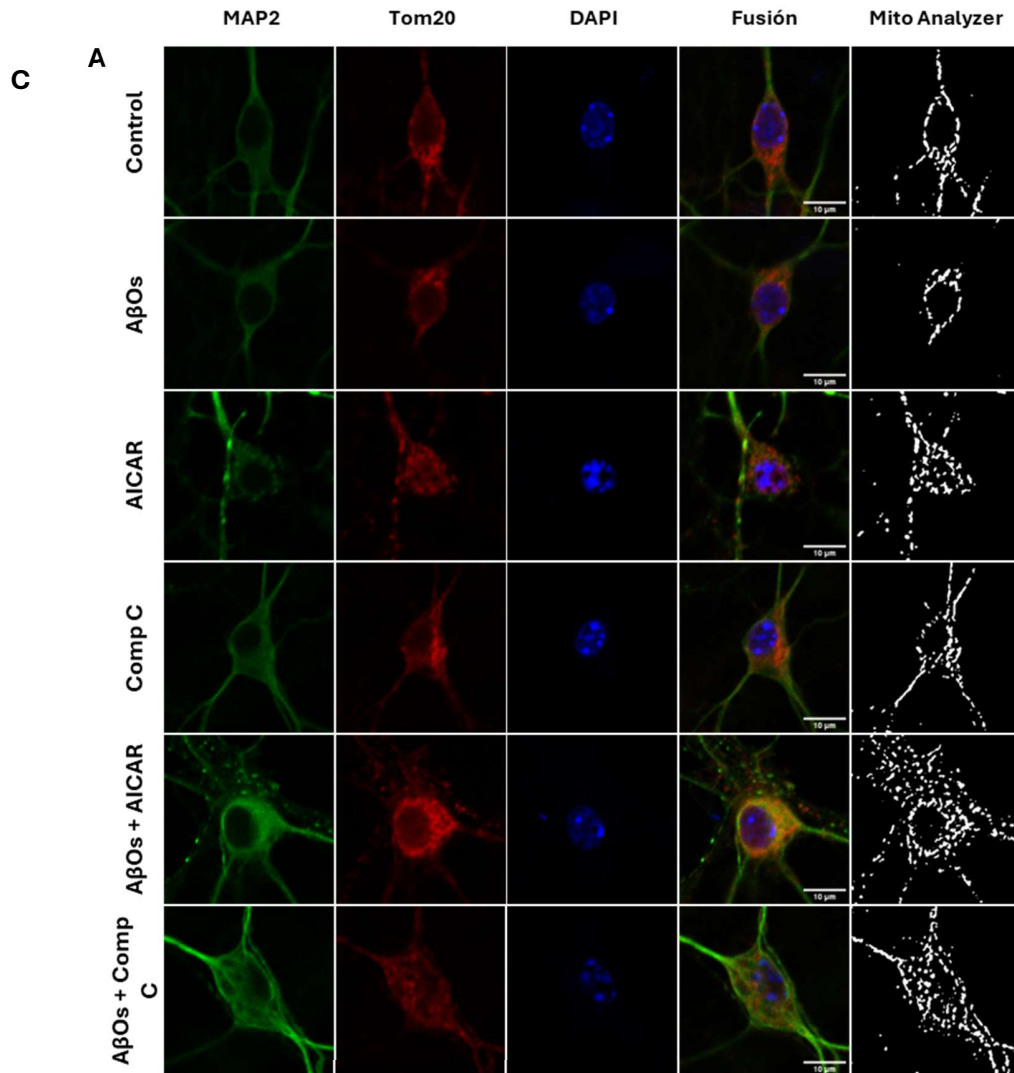
C

Figura 8. AβOs promueven fragmentación mitocondrial en células PC12 de manera dependiente de AMPK. (A) Imágenes representativas de células PC12 tratadas durante 24 horas AβOs (0.5 μM), el activador de AMPK AICAR (1 mM) o el inhibidor Compuesto C (10 μM), de forma individual o combinada. Las mitocondrias se marcaron con TOM20 (rojo), el citoesqueleto con faloidina (verde) y los núcleos con DAPI (azul). La segmentación de las mitocondrias se realizó mediante el plugin *Mito-Analyzer* de *FIJI*. **(B)** Cuantificación de la longitud promedio mitocondrial (μm). **(C)** Histograma de distribución de la longitud mitocondrial. Datos expresados como media ± SEM; * vs control; # vs AβOs; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, ANOVA de una vía. Escala = 10 μm. Control 2.989 ± 0.145 μm; AβOs 2.285 ± 0.131 μm; AICAR 2.090 ± 0.170 μm; Compuesto C 2.807 ± 0.218 μm; AβOs + AICAR 1.858 ± 0.142 μm; AβOs + CC 2.557 ± 0.097 μm. n=3



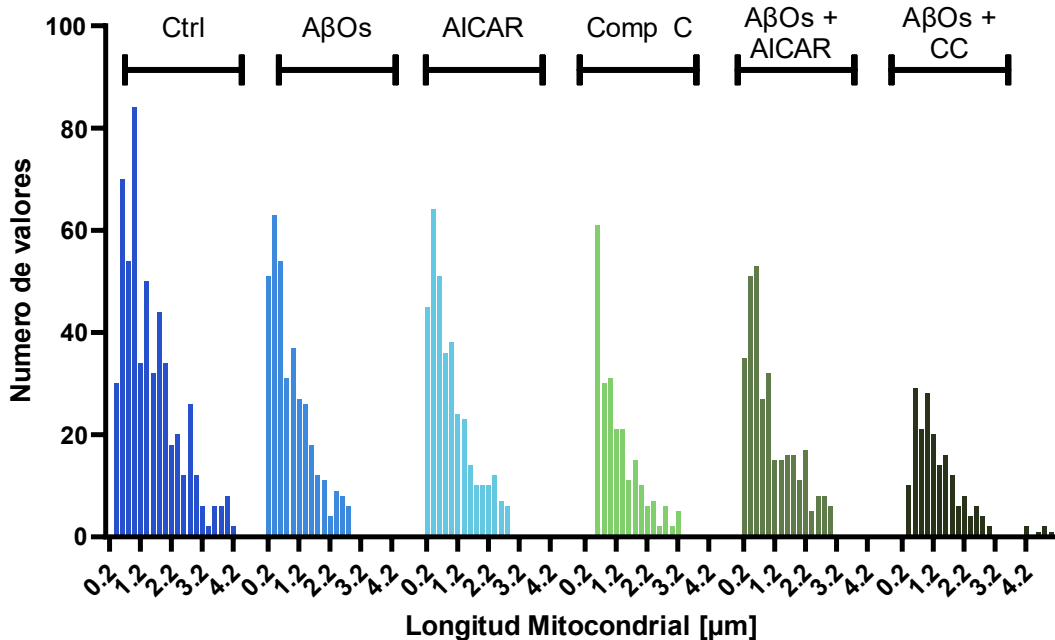


Figura 9. AβOs promueven fragmentación mitocondrial en neuronas hipocampales de ratón de manera dependiente de AMPK. (A) Imágenes representativas de neuronas hipocampales tratadas durante 24 horas con (AβOs, 0.5 μM), el activador de AMPK AICAR (1 mM) o el inhibidor Compuesto C (10 μM), de forma individual o combinada. Las mitocondrias se marcaron con TOM20 (rojo), los microtúbulos neuronales con MAP2 (verde) y los núcleos con DAPI (azul). La segmentación mitocondrial se realizó mediante el *plugin Mito Analyzer* de *FIJI*. **(B)** Cuantificación de la longitud promedio mitocondrial (μm). **(C)** Histograma de distribución de la longitud mitocondrial. Datos expresados como media ± SEM; * vs control; # vs AβOs; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, ANOVA de una vía. Escala = 10 μm. Control 1.506 ± 0.037 μm; AβOs 0.945 ± 0.035 μm; AICAR 0.969 ± 0.031 μm; Compuesto C 1.248 ± 0.045 μm; AβOs + AICAR 1.075 ± 0.043 μm; AβOs + CC 1.382 ± 0.063 μm. n=3

La comunicación funcional entre la mitocondria y el retículo endoplasmático, mediada por los sitios de contacto mitocondria–retículo (MAMs), es esencial para el intercambio de calcio, la homeostasis lipídica y la regulación metabólica; alteraciones en estos contactos han sido ampliamente descritas en la EA como eventos tempranos de disfunción celular. Por lo que se decidió estudiar la interacción entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias, así como el impacto de los A β O_s y el rol de AMPK sobre la interacción de estos dos organelos.

Con el fin de visualizar y cuantificar la interacción física entre el RE y las mitocondrias se utilizó el sistema Split-GFP ER–Mito, basado en la reconstitución del fluoróforo GFP a partir de dos fragmentos no fluorescentes que se ensamblan únicamente cuando ambos organelos se encuentran en estrecho contacto. En este sistema (**Fig. 10**), el fragmento GFP1–10 se fusionó a la proteína mitocondrial TOM20 (TOM20N-FLAG-GFP1-10), una subunidad del complejo translocador de la membrana externa mitocondrial, mientras que el fragmento GFP11 se acopló a la proteína ERj1 (ERj1N-V5-GFP11), una chaperona residente del RE involucrada en la translocación de proteínas dependiente de la proteína chaperona del retículo endoplasmático (BiP). Entre ambas proteínas se genera un espaciador flexible de 18 aminoácidos que permite un ensamblaje del fluoróforo cuando las membranas del RE y mitocondria se encuentran a una distancia aproximada de 8–10 nm, lo que se

considera un *short spacer*, adecuado para detectar contactos estrechos y fisiológicamente relevantes entre ambos organelos (Cieri et al., 2018).

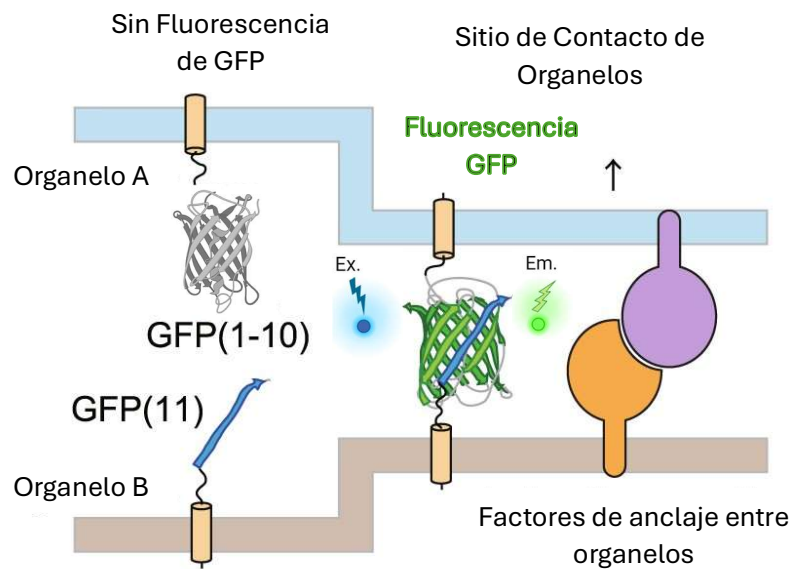


Figura 10. Principio del sistema split-GFP para detectar contactos entre organelos. Dos fragmentos complementarios de la proteína fluorescente verde GFP, GFP (1-10) y GFP (11), se dirigen a las membranas de dos organelos distintos, en este ensayo retículo endoplasmático y mitocondria. En ausencia de proximidad no se observa fluorescencia. Cuando las membranas se aproximan en un sitio de contacto mantenido por factores de anclaje endógenos a una distancia entre 8 – 10 nm, los fragmentos se reconstituyen y emiten señal GFP, lo que permite visualizar y cuantificar la extensión y persistencia de los contactos en células vivas. Adaptado de (Kakimoto et al., 2018)

De esta manera, la señal de fluorescencia reconstituida corresponde directamente al grado de proximidad estructural entre el RE y las mitocondrias. Mediante este sistema, se observó que el tratamiento con A β Os (0.5 μ M) generó un aumento significativo en la señal de fluorescencia (**Fig. 11A-B**), reflejando un mayor acoplamiento entre RE y mitocondrias (Control 100% \pm 12.99; **A β Os 214.0% \pm**

31.09). Este mismo efecto fue reproducido por el activador de AMPK, AICAR (1 mM), por sí solo y en conjunto con A β Os (AICAR 243.3% \pm 25.12; A β Os + AICAR 203.8% \pm 31.32), sugiriendo que la activación de AMPK favorece la formación de contactos RE-mitocondriales. En contraste, el inhibidor Compuesto C (10 μ M) redujo marcadamente la intensidad de fluorescencia de GFP en presencia de A β Os (Compuesto C 123.5% \pm 16.01; **A β Os + CC 108.8% \pm 15.91**), indicando que la inhibición de AMPK disminuye los contactos RE-mitocondriales y atenúa la hiperconectividad inducida por A β Os, restaurando estos contactos a niveles cercanos al control.

Con el fin de correlacionar este aumento en la conexión entre el RE y la mitocondria, y entender si esta unión es funcional, es que decidimos estudiar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizando la sonda JC-1. En los experimentos realizados, las células tratadas con A β Os y AICAR durante 24 horas (**Fig. 11C**) mostraron una reducción significativa del potencial de membrana mitocondrial en comparación con el control (Control 110.9 \pm 8.835; **A β Os 73.62 \pm 3.631**; AICAR 56.74 \pm 4.006; A β Os + AICAR 52.41 \pm 3.288; FCCP 55.69 \pm 4.148), en magnitud comparable a FCCP lo que indica una pérdida del potencial mitocondrial y un compromiso de la función bioenergética. En contraste, el tratamiento con Compuesto C, tanto solo como en co-incubación con A β Os, preservó el $\Delta\Psi_m$ (Compuesto C 133.1 \pm 10.03; **A β Os + CC 135.9 \pm 10.66**; AICAR + CC 113.3 \pm 8.664),

sugiriendo que la inhibición de AMPK podría proteger frente al colapso del potencial mitocondrial inducido por el estrés amiloide.

En conjunto, estos resultados demuestran que A β Os promueven un aumento dependiente de AMPK en los contactos RE-mitocondriales, acompañado de una disminución del potencial mitocondrial, evidenciando que la activación exacerbada de AMPK contribuye tanto al acoplamiento excesivo entre RE y mitocondrias como a la disfunción bioenergética, eventos característicos de las etapas tempranas de la EA.

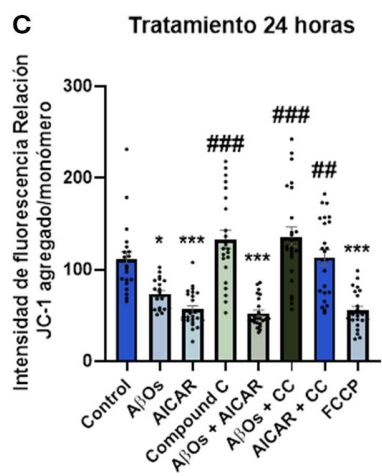
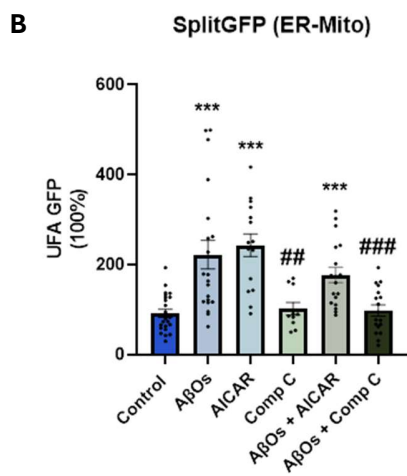
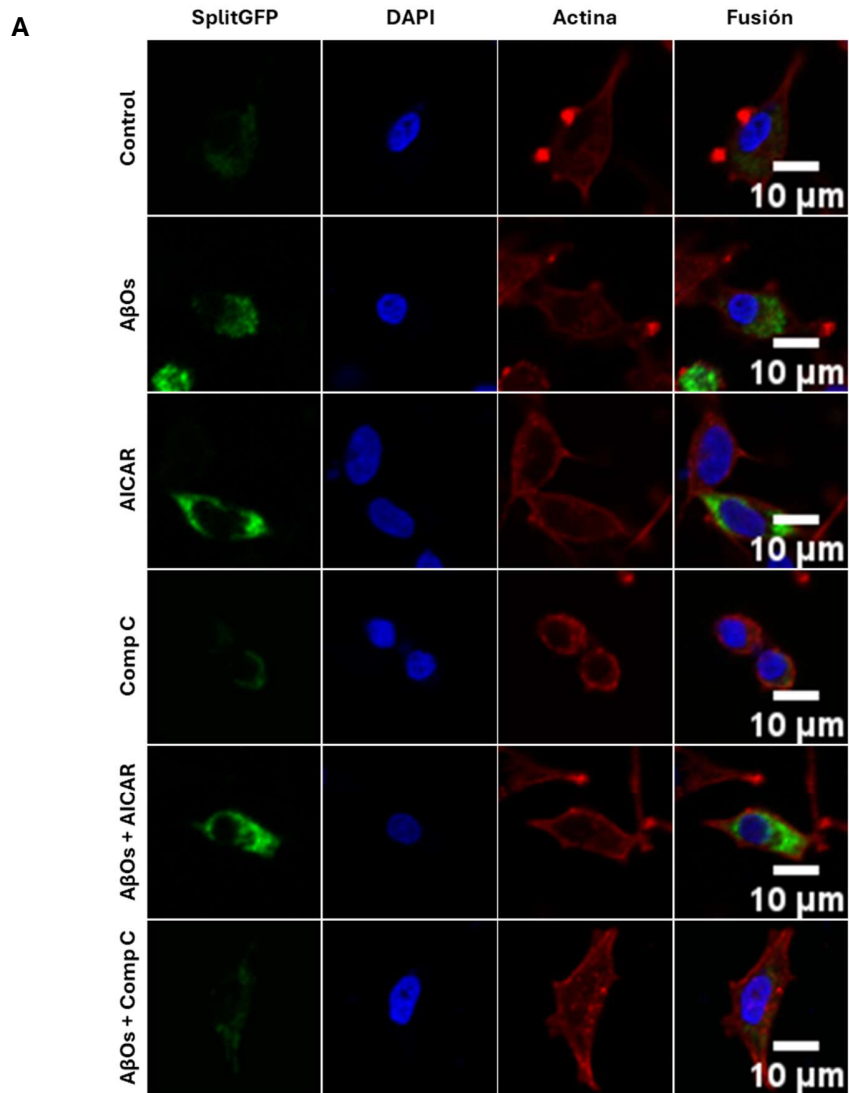


Figura 11. A β O_s incrementan los contactos RE-mitocondria y disminuyen el potencial de membrana mitocondrial mediante un mecanismo dependiente de AMPK en células PC12. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células PC12 transfectadas con el sistema Split-GFP (ER-Mito) y tratadas durante 24 horas con A β O_s (0.5 μ M), el activador de AMPK AICAR (1 mM) o el inhibidor Compuesto C (10 μ M), de manera individual o combinada. Las células fueron marcadas con Actina (rojo) para visualizar el citoesqueleto y DAPI (azul) para los núcleos. La fluorescencia verde corresponde a la formación de GFP en los puntos de contacto entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias. **(B)** Cuantificación de la fluorescencia total expresada como porcentaje respecto al control. **Split-GFP** — n=3, Control 100% \pm 12.99; A β O_s 214.0% \pm 31.09; AICAR 243.3% \pm 25.12; Compuesto C 123.5% \pm 16.01; A β O_s + AICAR 203.8% \pm 31.32; A β O_s + CC 108.8% \pm 15.91. **(C)** Análisis del potencial de membrana mitocondrial mediante el marcador JC-1, expresado como la razón de fluorescencia entre agregados/monómeros. FCCP fue utilizado como control positivo de despolarización mitocondrial. **JC1** — n=4, Control 110.9 \pm 8.835; A β O_s 73.62 \pm 3.631; AICAR 56.74 \pm 4.006; Compuesto C 133.1 \pm 10.03; A β O_s + AICAR 52.41 \pm 3.288; A β O_s + CC 135.9 \pm 10.66; AICAR + CC 113.3 \pm 8.664; FCCP 55.69 \pm 4.148. Datos expresados como media \pm SEM; * vs control; # vs A β O_s; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, ANOVA de una vía. Escala = 10 μ m.

Considerando que los A β O_s alteran la función mitocondrial, la comunicación en MAMs, la homeostasis del calcio y el estado energético celular, planteamos que estas alteraciones podrían correlacionarse con un deterioro de la función sináptica. Para evaluar si la toxicidad amiloide sobre la actividad sináptica puede ser modulada por AMPK, examinamos el efecto de los A β O_s (0.5 μ M) sobre la actividad sináptica espontánea en neuronas hipocámpales primarias de ratón y, en paralelo, determinamos si la inhibición farmacológica de AMPK con Compuesto C (10 μ M) prevenía estas alteraciones cuando se administró como cotratamiento. Esta aproximación se sustenta en que la hiperactividad sináptica inducida por A β O_s constituye un evento temprano en la enfermedad de Alzheimer y en que AMPK, como sensor energético, acopla el estado metabólico a la excitabilidad neuronal. (Fuentealba et al., 2012).

En registros de corrientes postsinápticas espontáneas (sPSCs) en neuronas hipocampales (**Fig. 12A–E**), la exposición a A β Os (0.5 μ M, 1 h) incrementó marcadamente la amplitud media de los eventos respecto del control (control: 436.0 \pm 22.62 pA; **A β Os: 669.2 \pm 50.42 pA**), sin cambios significativos en la frecuencia (Control 2.22 \pm 0.19 Hz; A β Os 2.00 \pm 0.35 Hz). La inhibición de AMPK con Compuesto C (10 μ M) atenuó este efecto y redujo la amplitud a valores menores al control (**A β Os + CC 69.97 \pm 6.425 pA**), con una frecuencia cercana a la observada en condiciones basales (**A β Os + CC 1.64 \pm 0.22 Hz**), y compuesto C por sí solo no presentó diferencias significativas con el control (Compuesto C 525.4 \pm 35.90), estos resultados sugieren que la activación de AMPK contribuye al aumento de la actividad sináptica espontánea inducida por A β Os.

Para determinar si estos cambios dependían de la actividad de red o de alteraciones intrínsecas de la transmisión excitatoria glutamatérgica, se registraron mEPSCs en presencia de bicuculina (5 μ M) y TTX (50 nM) (**Fig. 12F–J**). En estas condiciones, que aíslan eventos excitatorios miniatura independientes de potenciales de acción, los A β Os deprimieron marcadamente la transmisión glutamatérgica basal: la amplitud media disminuyó cerca de un 35–40% (Control: 11.07 \pm 0.07; **A β Os: 7.08 \pm 0.05 pA**) y la frecuencia disminuyó alrededor de un 60% (Control: 3.039 \pm 0.289; **A β Os: 1.439 \pm 0.231**). La inhibición de AMPK con Compuesto C revirtió gran parte del efecto sobre

la frecuencia (A β O s + CC: 3.096 ± 0.173) y rescató parcialmente la amplitud (**A β O s + CC: 8.23 ± 0.03 pA**).

En conjunto, estos resultados indican que los A β O s desestabilizan la homeostasis sináptica de manera compleja: por una parte, favorecen un aumento de la actividad sináptica espontánea dependiente de red y, por otra, deprimen la transmisión excitatoria glutamatérgica a nivel de eventos miniatura. Además, muestran que la activación aberrante de AMPK es necesaria para este fenotipo, con un componente presináptico especialmente sensible a su inhibición y un componente postsináptico sólo parcialmente recuperable mediante Compuesto C.

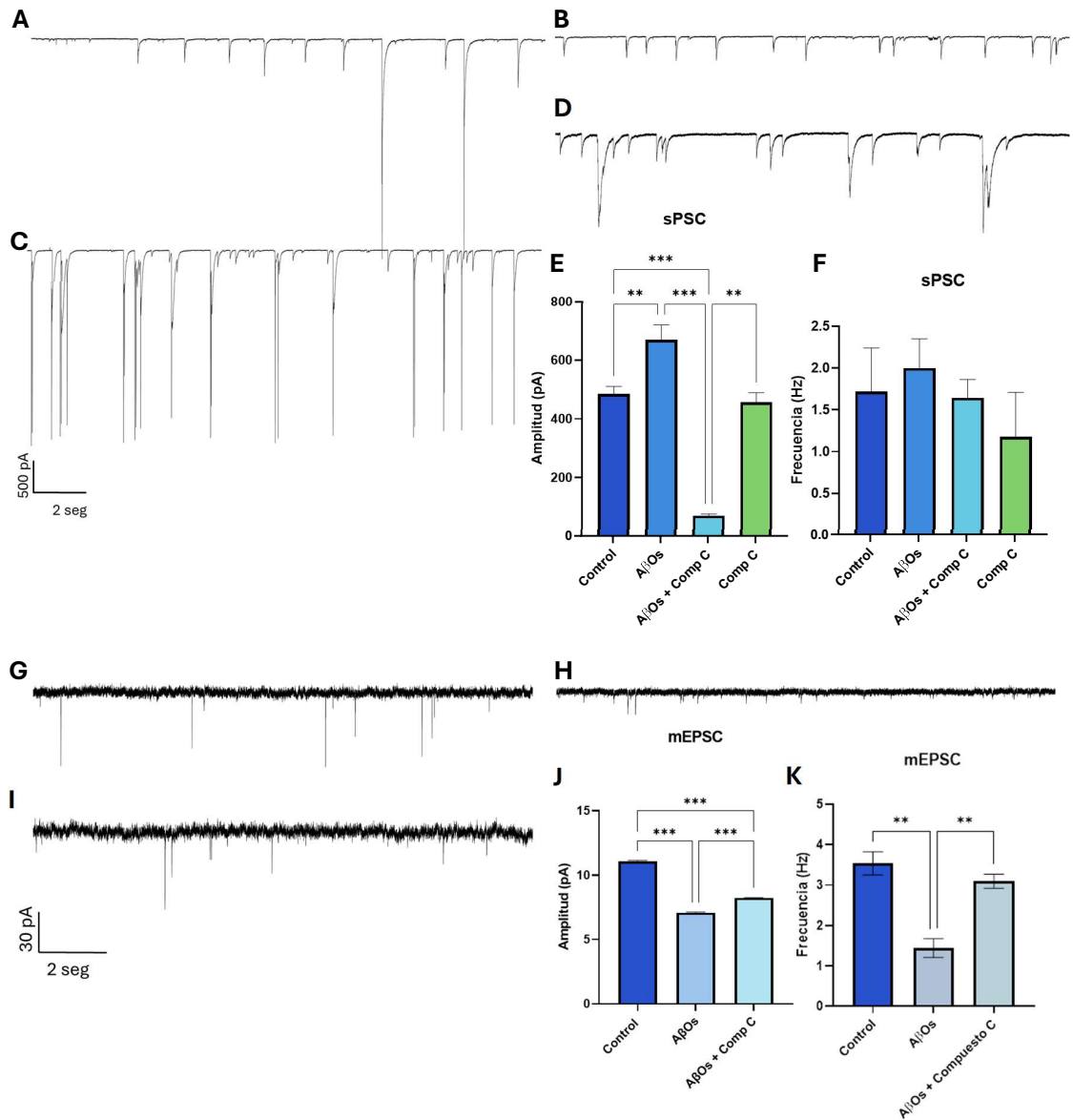


Figura 12. Efecto de los oligómeros de β -amiloide (A β Os) y la inhibición de AMPK sobre la actividad sináptica espontánea en neuronas hipocampales de ratón. (A–D) Registros de actividad neuronal espontánea total en neuronas hipocampales en cultivo bajo las condiciones: (A) Control, (B) A β Os (0.5 μ M, 1 h), y (C) A β Os + Compuesto C (10 μ M, 1 h), (D) Compuesto C (10 μ M, 1 h) (E–F) Cuantificación de la amplitud (pA) y frecuencia (Hz) de los eventos espontáneos. (G–I) Registros de corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (mEPSCs) en las mismas condiciones experimentales: (G) Control, (H) A β Os y (I) A β Os + Compuesto C. Las mEPSCs se registraron en presencia de bicuculina (5 μ M) y tetrodotoxina (TTX, 50 nM) para eliminar la actividad dependiente de potenciales de acción. (J–K) Cuantificación de la amplitud y frecuencia de mEPSCs. Datos expresados como media \pm SEM, * p <0.05, ** p <0.01, * p <0.001, ANOVA de una vía. Escala: 2 s, 500 pA (A–C); 2 s, 30 pA (F–H). **sPSCs**: Control 436.0 \pm 22.62 pA; A β Os 669.2 \pm 50.42 pA; A β Os + Comp C 69.97 \pm 6.425 pA, Comp C: 525.4 \pm 35.90 pA; **mEPSCs**: Control 11.07 \pm 0.0725 pA; A β Os 7.081 \pm 0.0495 pA; A β Os + Comp C 8.230 \pm 0.0298 pA. n=3**

IV. Evaluación del número y distribución de estructuras MAMs en tejido hipocampal de ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.

Finalmente, para avanzar desde sistemas *in vitro* hacia un contexto fisiopatológico más complejo, empleamos el ratón doble transgénico APP/PS1, modelo ampliamente utilizado de la EA (Borchelt et al., 1997; Choi et al., 2007). Con el fin de definir el rol de AMPK en la EA, se generó una variante APP/PS1 con delección condicional de AMPK α restringida a neuronas mediante recombinación Cre/loxP (APP/PS1 AMPK KO), lo que nos permitió evaluar de manera específica cómo la pérdida de la actividad AMPK neuronal impacta la organización de MAMs, el acoplamiento RE-mitocondria, la dinámica mitocondrial, la bioenergética y la función sináptica. Dado que la activación crónica de AMPK se ha vinculado a alteraciones en la red y la ultraestructura mitocondrial, planteamos que la reducción de su actividad podría atenuar los efectos de A β Os, como ha sido observado en el ratón APP/PS1.

Mediante microscopía electrónica de barrido con corte seriado (Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy, SBF-SEM) y reconstrucción tridimensional con el *software* AMIRA, se obtuvieron modelos 3D de mitocondrias y RE a partir de secciones del área CA1 del hipocampo (**Fig. 13**).

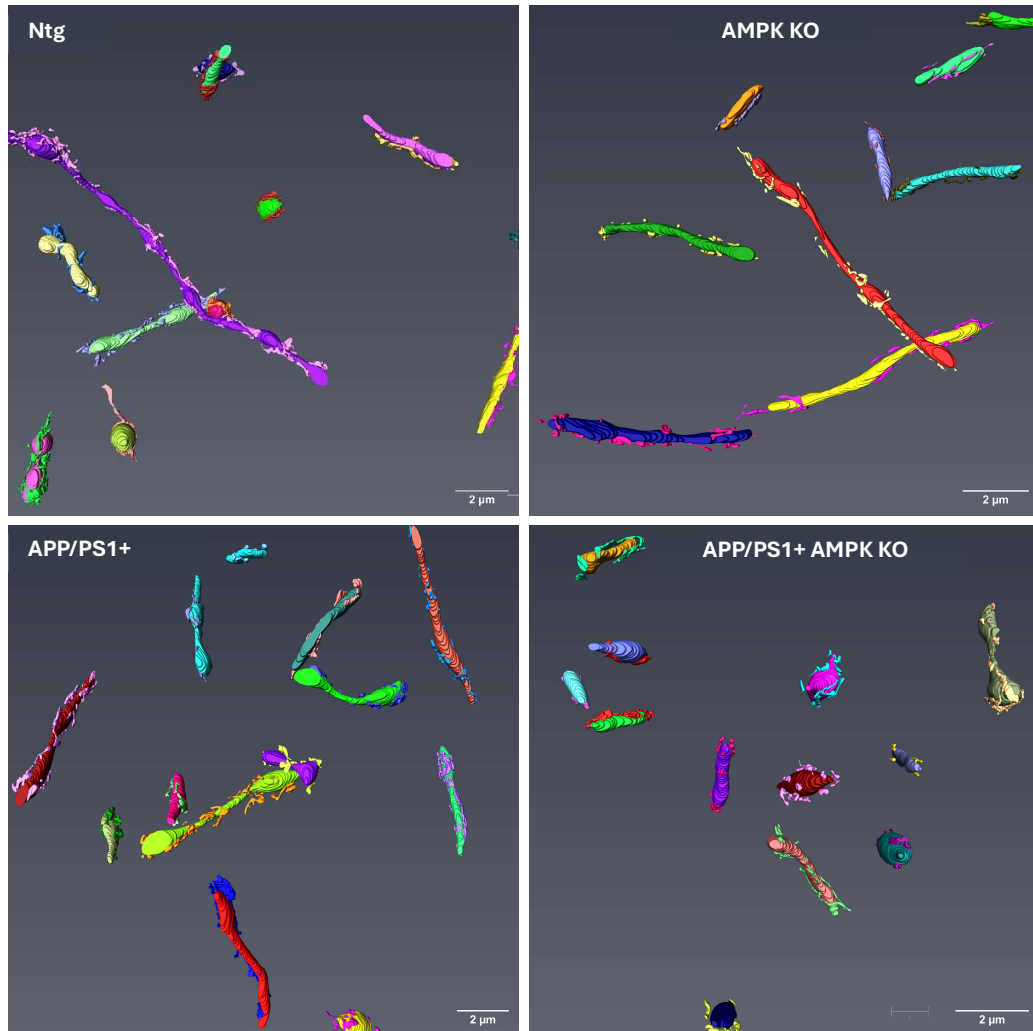


Figura 13. Reconstrucciones tridimensionales representativas de mitocondrias y retículo asociado en hipocampo de ratón. Reconstrucciones obtenidas mediante Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) y segmentadas en AMIRA a partir de cortes del área CA1 del hipocampo de ratón. Se muestran cuatro condiciones: no transgénico (NTg), AMPK KO neuronal (AMPK KO), doble transgénico APP/PS1 y APP/PS1 con delección neuronal de AMPK (APP/PS1 AMPK KO). Cada pseudocolor corresponde a una mitocondria individual segmentada; los colores no codifican propiedades morfológicas. Barra de escala en cada panel: 2 µm.

En el análisis morfométrico mitocondrial (**Fig. 14A–E**), el modelo APP/PS1 mostró una clara expansión y elongación de la red mitocondrial: el volumen aumentó cerca de 21%, el área en torno a 41% y la longitud aproximadamente 70% respecto de NTg, mientras que la esfericidad disminuyó cerca de 22%, lo que indica mitocondrias más grandes, alargadas y menos compactas. En contraste, en los animales APP/PS1 con delección neuronal de AMPK, estos cambios tendieron a revertirse hacia valores cercanos a los del control: el volumen y el área disminuyeron alrededor de 44–45% respecto de APP/PS1, la longitud cayó cerca de 45% y la esfericidad aumentó alrededor de 22%, indicando una morfología más similar a la observada en los ratones NTg. Por su parte, los animales AMPK KO presentaron un fenotipo mixto, con menor volumen (–19% vs. NTg), pero con mayor longitud y área (+91% y +20%, respectivamente), junto con una reducción de la esfericidad (–26%), lo que sugiere que la señalización de AMPK modula de manera bidireccional la arquitectura mitocondrial dependiendo del contexto. En conjunto, estos hallazgos apoyan que AMPK participa de manera causal en la remodelación estructural de la red mitocondrial inducida por la sobreexpresión de APP/PS1 y la mayor carga amiloide presente en el ratón APP/PS1, y que su inactivación neuronal contribuye a normalizar el fenotipo morfológico.

De manera complementaria, el análisis tridimensional del retículo endoplasmático (**Fig. 14F–H**) evidenció que, respecto de NTg, APP/PS1 presentó expansión reticular

con aumento de volumen de 9% y de área de 21%, compatible con estrés del RE y/o mayor acoplamiento RE-mitocondria. En APP/PS1 con delección neuronal de AMPK, ambos parámetros se redujeron de forma marcada (volumen -57% y área -49% respecto de APP/PS1), normalizándose parcialmente hacia valores de control. En ausencia basal de AMPK, el RE fue más pequeño que en NTg (volumen -43% y área -27%), reforzando que AMPK modula la arquitectura reticular según el contexto. En conjunto con la morfometría mitocondrial, estos resultados indican que la activación no fisiológica de AMPK en el entorno amiloide, contribuye a la remodelación patológica de RE y mitocondrias, mientras que su delección neuronal preserva la integridad morfoestructural de ambos organelos y su rol funcional en la neurotransmisión.

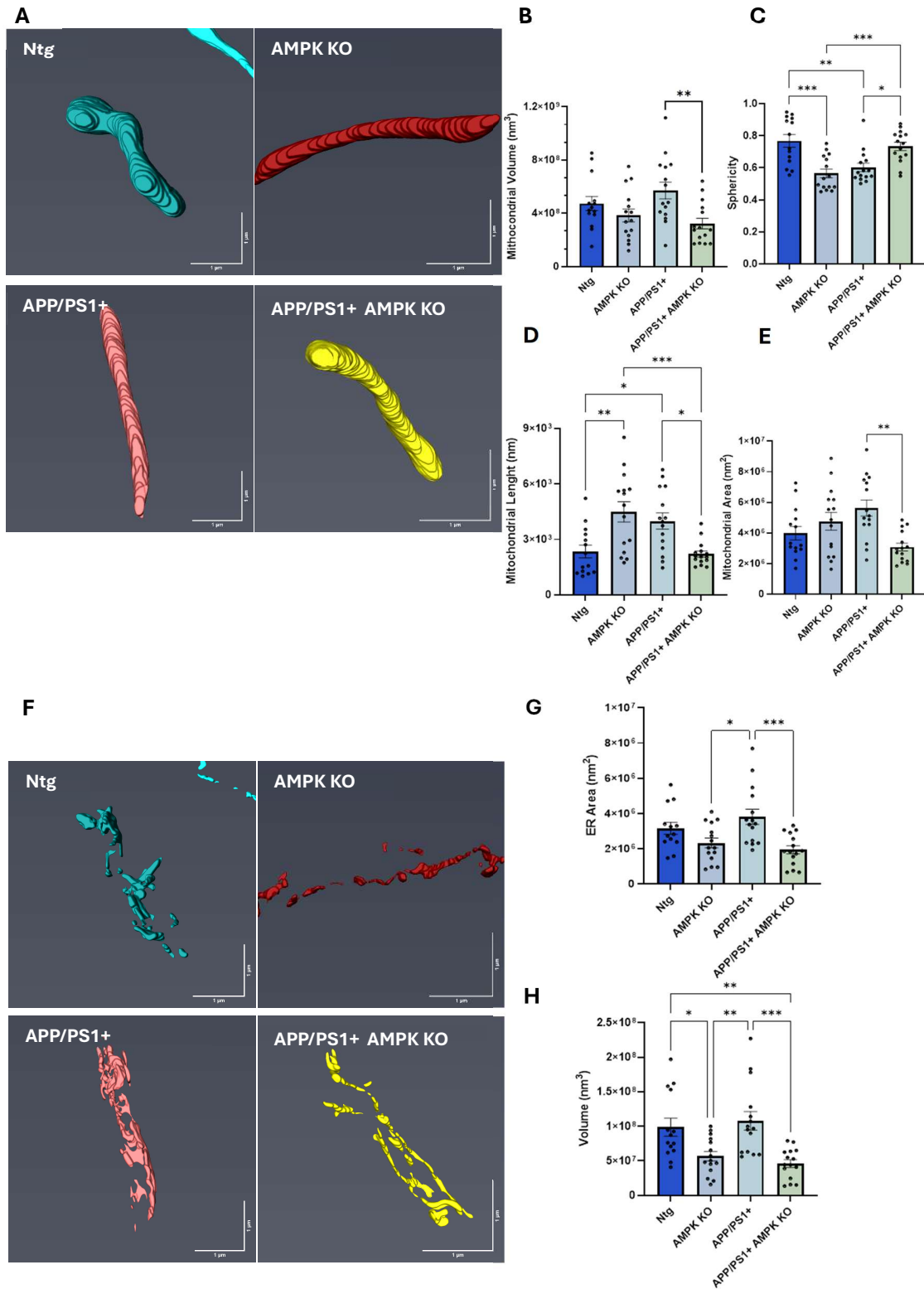


Figura 14. El KO de AMPK neuronal en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer previene el aumento del volumen, longitud y área mitocondrial. (A–E) Reconstrucciones tridimensionales representativas de mitocondrias obtenidas mediante Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) y procesadas con el *software* AMIRA, a partir de secciones del CA1 del hipocampo de ratones no transgénicos (NTg), NTg AMPK KO (neuronal), APP/PS1, y APP/PS1 AMPK KO. Se muestran las cuantificaciones del volumen mitocondrial **(B)**, superficie **(C)**, longitud **(D)** y área **(E)**. **(F–G)** Reconstrucciones tridimensionales del retículo endoplasmático (RE) obtenidas mediante el mismo procedimiento y analizadas con AMIRA. Se incluyen las cuantificaciones del área **(F)** y volumen **(G)** del RE. Datos expresados como media \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ANOVA de una vía. Escala = 1 μm . $n = 15$ (mitocondrias analizadas por condición). **Parámetros Mitocondriales: Volumen (nm^3):** NTg $4.73 \times 10^9 \pm 0.05 \times 10^9$; AMPK KO $3.84 \times 10^9 \pm 0.05 \times 10^9$; APP/PS1 $5.72 \times 10^9 \pm 0.06 \times 10^9$; APP/PS1 AMPK KO $3.23 \times 10^9 \pm 0.04 \times 10^9$. **Longitud (nm):** NTg $2.35 \times 10^3 \pm 0.35 \times 10^3$; AMPK KO $4.49 \times 10^3 \pm 0.55 \times 10^3$; APP/PS1 $3.99 \times 10^3 \pm 0.44 \times 10^3$; APP/PS1 AMPK KO $2.21 \times 10^3 \pm 0.17 \times 10^3$. **Esfericidad:** NTg 0.767 ± 0.039 ; AMPK KO 0.564 ± 0.027 ; APP/PS1 0.602 ± 0.026 ; APP/PS1 AMPK KO 0.733 ± 0.026 . **Área (nm^2):** NTg $3.98 \times 10^6 \pm 0.44 \times 10^6$; AMPK KO $4.76 \times 10^6 \pm 0.57 \times 10^6$; APP/PS1 $5.63 \times 10^6 \pm 0.53 \times 10^6$; APP/PS1 AMPK KO $3.08 \times 10^6 \pm 0.26 \times 10^6$. **Parámetros del retículo endoplasmático: Volumen (nm^3):** NTg $9.87 \times 10^7 \pm 1.30 \times 10^7$; AMPK KO $5.67 \times 10^7 \pm 0.70 \times 10^7$; APP/PS1 $10.79 \times 10^7 \pm 1.33 \times 10^7$; APP/PS1 AMPK KO $4.62 \times 10^7 \pm 0.56 \times 10^7$. **Área (nm^2):** NTg $3.16 \times 10^6 \pm 0.34 \times 10^6$; AMPK KO $2.32 \times 10^6 \pm 0.28 \times 10^6$; APP/PS1 $3.81 \times 10^6 \pm 0.43 \times 10^6$; APP/PS1 AMPK KO $1.94 \times 10^6 \pm 0.23 \times 10^6$.

Finalmente, analizamos el impacto de la delección neuronal de AMPK sobre los contactos retículo–mitocondria en hipocampo de ratones APP/PS1, para determinar si la modulación de AMPK influye en el acoplamiento estructural entre ambos organelos. Las MAMs constituyen estructuras donde RE y mitocondria coordinan transferencia de Ca^{2+} , metabolismo lipídico y acople bioenergético; su expansión anómala se ha vinculado con estrés del RE, sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, fragmentación de la red y neurodegeneración. La reconstrucción 3D y su cuantificación (**Fig. 15A–C**) incluyeron la relación del área RE/Mito y la relación del volumen RE/Mito, índices adimensionales que estiman la extensión relativa de contacto y el grado de asociación física. Los resultados mostraron aumentos en

APP/PS1 tanto del área relativa (0.823 ± 0.045) como del volumen relativo (0.246 ± 0.025) respecto de NTg (0.625 ± 0.036 y 0.172 ± 0.013 , respectivamente), mientras que APP/PS1 AMPK KO redujo ambos parámetros hacia valores de control (área 0.613 ± 0.064 ; volumen 0.158 ± 0.020 ; AMPK KO: área 0.542 ± 0.027 ; volumen 0.153 ± 0.011). En conjunto, APP/PS1 exhibe un acoplamiento RE-mitocondria aumentado, compatible con intensificación de la comunicación estructural bajo estrés amiloide, mientras que la delección neuronal de AMPK normaliza parcialmente estos índices, restaurando un nivel de acoplamiento cercano al fisiológico. Estos datos refuerzan que AMPK actúa como regulador crítico del acoplamiento físico y metabólico RE-mitocondria exacerbado en la EA.

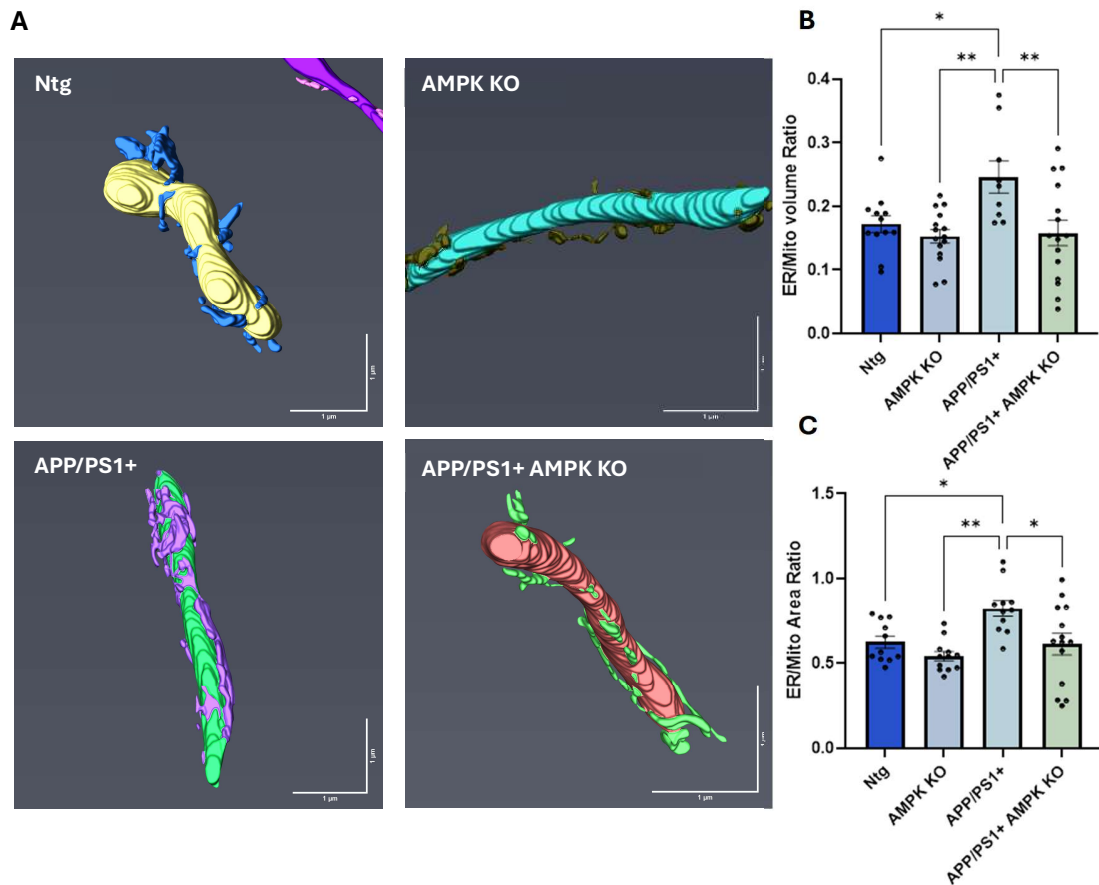


Figura 15. El *knockout* neuronal de AMPK reduce el incremento en los contactos RE–mitocondria observado en el modelo APP/PS1. (A) Reconstrucciones tridimensionales de mitocondrias y retículo endoplasmático (RE) obtenidas mediante Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) y procesadas con el *software* AMIRA, en neuronas CA1 de hipocampo de ratones NTg, AMPK KO, APP/PS1 y APP/PS1 AMPK KO. **(B–C)** Cuantificación de la relación entre el volumen de contacto retículo endoplasmático y el volumen mitocondrial y la relación entre el área del retículo endoplasmático y el área mitocondrial, obtenidas a partir de las reconstrucciones 3D. Datos expresados como media ± SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ANOVA de una vía. Escala = 1 µm. **RE/Mito (área):** NTg 0.625 ± 0.036; AMPK KO 0.542 ± 0.027; APP/PS1 0.823 ± 0.045; APP/PS1 AMPK KO 0.613 ± 0.064. **RE/Mito (volumen):** NTg 0.172 ± 0.013; AMPK KO 0.153 ± 0.011; APP/PS1 0.246 ± 0.025; APP/PS1 AMPK KO 0.158 ± 0.020.

DISCUSIÓN

El trabajo realizado en esta tesis tuvo por objeto profundizar en el entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares que sustentan la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. En conjunto, los resultados obtenidos apoyan la idea de que AMPK actúa como un nodo central que conecta el estrés amiloide inducido por A β Os con alteraciones en la asociación funcional entre el retículo endoplasmático y la mitocondria, la función mitocondrial y la transmisión sináptica. Si bien AMPK es reconocida clásicamente como una quinasa adaptativa encargada de restaurar la homeostasis energética, nuestros datos sugieren que, bajo condiciones de estrés amiloide, su activación puede adquirir un carácter disfuncional o aberrante, contribuyendo de manera sinérgica a eventos fisiopatológicos ampliamente descritos en la literatura por nuestro grupo y otros grupos de investigación. Esta interpretación no implica que AMPK sea intrínsecamente perjudicial, sino que su efecto depende del contexto celular y molecular, la duración del estímulo, el estado metabólico basal, su localización subcelular y, probablemente, la contribución diferencial de sus isoformas catalíticas (Herzig & Shaw, 2018; Trefts & Shaw, 2021). En este trabajo, la exposición celular a A β Os incrementó la actividad de AMPK en modelos neuronales, efecto que fue replicado mediante la presencia de un activador exógeno de AMPK, AICAR. Por otra parte, el uso de una molécula xenobiótica con actividad inhibitoria de AMPK, Compuesto C, permitió observar una

atenuación de esta respuesta, lo que fortalece la observación inicial respecto del rol de AMPK en los mecanismos fisiopatológicos inducidos por A β O s . Adicionalmente, estos resultados sugieren que AMPK no solo responde de manera adaptativa al daño inducido por A β O s , sino que también participa activamente en mecanismos de reorganización organelar y alteración de la función sináptica. En el estado del arte de este trabajo se ha discutido ampliamente el rol fundamental del Ca $^{2+}$ en los mecanismos tóxicos asociados al péptido β -amiloide. Sin embargo, aún existe poca claridad respecto de cómo se integran los distintos procesos que ocurren en paralelo a la dishomeostasis de Ca $^{2+}$ intracelular, cuáles de estas vías tienen un rol predominante y en qué contexto celular específico participan. Una vía potencialmente plausible para explicar la activación de AMPK corresponde al eje Ca $^{2+}$ /CaMKK2-AMPK. Se ha demostrado que los oligómeros de A β 42 pueden activar AMPK a través de CaMKK2, y que esta ruta contribuye a la pérdida de espinas dendríticas y a la sinaptotoxicidad mediada por Tau (Mairet-Coello et al., 2013). De manera complementaria, estudios más recientes muestran que la sobreactivación del eje CaMKK2-AMPK inducida por A β 42 oligomérico coordina la fisión mitocondrial dependiente de MFF y la mitofagia dependiente de ULK2, estableciendo un vínculo directo entre estrés amiloide, remodelación mitocondrial dendrítica y pérdida sináptica (Lee et al., 2022). Por lo tanto, nuestros resultados son coherentes con un modelo en el cual los A β O s alteran la homeostasis de Ca $^{2+}$ y activan de forma aberrante AMPK a través de rutas Ca $^{2+}$ -dependientes. No obstante,

en el contexto del presente trabajo, esta interpretación se sustenta principalmente en evidencia previa, incluida aquella obtenida experimentalmente por nuestro grupo, ya que en esta tesis no se midió directamente Ca^{2+} citosólico o mitocondrial, ni la actividad de CaMKK2. Así, nuestros datos son compatibles con la participación del eje Ca^{2+} /CaMKK2-AMPK, pero no permiten concluir que esta sea la única vía responsable de la activación de AMPK inducida por A β O s .

Un aspecto importante en este contexto es que la literatura no describe un efecto único y lineal de los A β O s sobre AMPK. Mientras algunos estudios muestran una activación de AMPK asociada a sinaptotoxicidad, otros han reportado una disminución transitoria o sostenida de pAMPK tras la exposición a A β O s o en modelos de enfermedad de Alzheimer. Esto sugiere que la respuesta depende del tiempo de exposición, el modelo experimental, la concentración de A β O s y el estado metabólico basal de la célula (Assefa et al., 2020; Lee et al., 2022; Zimmermann et al., 2020). Esta aparente contradicción es relevante para interpretar los resultados obtenidos en células SH-SY5Y APP^{swe}. En este modelo crónico, la relación entre pAMPK y Mfn2 no necesariamente reproduce el comportamiento observado en neuronas expuestas de forma aguda a A β O s . En contextos crónicos, la señalización de AMPK puede encontrarse adaptada, agotada o modulada por mecanismos compensatorios, incluyendo cambios en quinasas upstream, fosfatasa, estrés oxidativo o disponibilidad energética. Sin embargo, el hecho de que el knockdown

de AMPK modifique los niveles de Mfn2 sugiere que la quinasa sigue siendo funcionalmente relevante para este eje, aun cuando la fosforilación puntual en Thr172 no refleje completamente el estado acumulado de la vía.

En este punto, la presencia de isoformas de AMPK debe considerarse como una posible explicación adicional. AMPK α 1 y AMPK α 2 no necesariamente cumplen funciones equivalentes en el sistema nervioso. En modelos de enfermedad de Alzheimer se ha descrito una desregulación diferencial de estas isoformas, y la anulación específica de la actividad de AMPK α 1 en el cerebro atenúa déficits cognitivos y sinápticos en modelos murinos, sin modificar necesariamente la carga amiloide (Zhao et al., 2020; Zimmermann et al., 2020). Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante knockdown global de AMPK deben interpretarse con cautela. La reducción de Mfn2 sugiere que AMPK participa en la mantención del fenotipo alterado de organización entre el retículo endoplasmático y la mitocondria, pero no permite distinguir si este efecto depende preferentemente de AMPK α 1, de AMPK α 2, de una eventual compensación entre isoformas o de la pérdida combinada de ambas. Esta distinción es relevante, ya que una inhibición global de AMPK podría interrumpir señales patológicas asociadas a las MAMs, pero también comprometer funciones metabólicas adaptativas fundamentales para la homeostasis neuronal.

Uno de los hallazgos centrales de este trabajo es la relación entre AMPK, Mfn2 y la reorganización de las MAMs. El trabajo de Hu et al. es particularmente relevante en

este punto, ya que demuestra que el estrés energético aumenta las MAMs de manera dependiente de AMPK, promueve la redistribución de AMPK hacia fracciones mitocondriales y asociadas a MAMs, y establece una interacción funcional entre AMPK y Mfn2 (Hu et al., 2021). Estos antecedentes sustentan nuestro modelo propuesto, en el cual A β O_s y AICAR aumentan los niveles de Mfn2 (Fig. 6) y favorecen el acoplamiento RE-mitocondria, mientras que la inhibición de AMPK atenúa estos efectos. En este contexto, Mfn2 no parece cumplir únicamente un rol como proteína de fusión mitocondrial, sino que también actuaría como un modulador de la comunicación RE-mitocondria, del intercambio de Ca²⁺ y de la organización funcional de las MAMs (de Brito & Scorrano, 2008; Filadi et al., 2015; Filadi et al., 2016).

La función de Mfn2 en los contactos RE-mitocondria ha sido objeto de discusión, ya que distintos estudios la han descrito tanto como un *tether* positivo como un regulador que previene el acoplamiento excesivo entre ambos organelos (de Brito & Scorrano, 2008; Filadi et al., 2015). Esta controversia es importante para la interpretación de nuestros resultados. El aumento de Mfn2 observado tras la exposición a A β O_s no necesariamente implica una restauración de la fusión mitocondrial ni una respuesta protectora. Más bien, en el contexto del estrés amiloide, podría reflejar una reorganización maladaptativa de la interfase RE-mitocondria, favoreciendo un hiperacoplamiento que intentaría aumentar la

transferencia local de Ca^{2+} , intensificaría el estrés mitocondrial y facilitaría la fragmentación organelar. Esta interpretación es consistente con la hipótesis de que la enfermedad de Alzheimer involucra una alteración temprana de las MAMs y una hipercomunicación funcional entre el retículo endoplasmático y la mitocondria (Area-Gomez & Schon, 2016, 2017; Hedskog et al., 2013; Leal et al., 2020).

Los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica utilizando Split-GFP y SBF-SEM con reconstrucción tridimensional apoyan esta interpretación, al mostrar un aumento del contacto entre el retículo endoplasmático y la mitocondria en las condiciones amiloides estudiadas en este trabajo, junto con una atenuación de esta organización al inhibir o eliminar AMPK. Estos hallazgos permiten proponer que AMPK participa en la consolidación de un estado de hiperacoplamiento retículo-mitocondria. En condiciones fisiológicas, el contacto RE-mitocondria es esencial para la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, la síntesis lipídica, la bioenergética y la respuesta adaptativa al estrés. Sin embargo, cuando este acoplamiento se vuelve excesivo o sostenido, puede favorecer la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} , la alteración del potencial de membrana, el aumento del estrés oxidativo y la disfunción metabólica (Area-Gomez & Schon, 2016, 2017; Li et al., 2023). Así, las MAMs emergen en este trabajo no solo como estructuras afectadas por A β O, sino también como un mecanismo de amplificación de la disfunción neuronal mediado por AMPK.

En línea con este modelo, A β O₂ y AICAR indujeron alteraciones mitocondriales similares, compatibles con una pérdida de homeostasis bioenergética, incluyendo fragmentación mitocondrial, disminución del potencial de membrana y reducción de la actividad metabólica asociada a viabilidad celular. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el ensayo de MTT deben interpretarse con cautela. Aunque este ensayo se utiliza frecuentemente como una medida indirecta de viabilidad celular, en sentido estricto refleja la capacidad metabólica y reductora de la célula, la cual depende de la función mitocondrial, el estado redox, la actividad de deshidrogenasas y la masa metabólica total. Por ello, sus variaciones no son exclusivamente atribuibles a cambios en la viabilidad o muerte celular (Ghasemi et al., 2021; Hoogstraten et al., 2022). En consecuencia, dado que los tratamientos utilizados en esta tesis alteran directamente la actividad de AMPK, la morfología mitocondrial y el potencial de membrana, una disminución en la señal de MTT no debe interpretarse como una prueba aislada de muerte celular. Una interpretación más rigurosa es que los A β O₂ disminuyen la actividad metabólica compatible con viabilidad, y que esta alteración converge con los cambios observados en el potencial de membrana mitocondrial, la morfología mitocondrial y el acoplamiento retículo-mitocondria.

Además del deterioro agudo del potencial de membrana, los resultados del modelo crónico sugieren una alteración más profunda del metabolismo oxidativo. En

particular, un aumento de la fosforilación inhibitoria de PDH en Ser293 sería compatible con una reducción del flujo de piruvato hacia acetil-CoA y, por tanto, con una restricción del ingreso de carbono al ciclo de Krebs. Esta interpretación es relevante porque conecta el fenotipo bioenergético celular con la hipometabolía descrita en enfermedad de Alzheimer. Además, se ha propuesto que la fosforilación de PDH puede asociarse inversamente con la actividad neuronal, lo que refuerza su valor como indicador de un estado funcional deprimido o metabólicamente restringido (Yang et al., 2024). No obstante, esta lectura debe mantenerse como interpretación bioquímica y no como conclusión definitiva sobre flujo metabólico, ya que sería necesario complementar estos datos con mediciones directas de actividad de PDH, consumo de oxígeno, producción de ATP o metabolismo de piruvato.

El componente de control de calidad mitocondrial también puede integrarse al modelo propuesto. AMPK regula procesos de autofagia y mitofagia mediante efectores como ULK1/ULK2, y la fosforilación de ULK1 por AMPK ha sido vinculada con el reclutamiento de la maquinaria autofágica hacia mitocondrias bajo condiciones de estrés energético o mitocondrial (Laker et al., 2017). Por ello, una activación temprana de AMPK podría representar inicialmente un intento compensatorio orientado a eliminar mitocondrias dañadas. Sin embargo, en un contexto crónico, una disminución de pULK1 o una respuesta mitofágica

insuficiente sugeriría que el sistema de control de calidad pierde eficacia, favoreciendo la acumulación de mitocondrias disfuncionales asociadas a MAMs alteradas. Esta idea permite explicar cómo una respuesta inicialmente adaptativa puede transformarse en un circuito de daño sostenido, en el cual el aumento del acoplamiento RE-mitocondria, la sobrecarga de Ca^{2+} , el estrés oxidativo, la alteración de PDH y la falla del control de calidad organelar se retroalimentan.

También es relevante considerar que A β Os podrían afectar directa o indirectamente la cadena transportadora de electrones, particularmente el complejo I mitocondrial. La alteración del complejo I puede disminuir la eficiencia respiratoria, modificar el balance NADH/NAD⁺, favorecer la producción de ROS y contribuir a la activación de AMPK como respuesta al estrés energético (Atlante et al., 2023; Panes et al., 2023; Stojakovic et al., 2021). En este punto, los trabajos de Trushina y colaboradores con CP2, un inhibidor parcial del complejo I, aportan un contrapunto especialmente importante. CP2 no actúa como un activador directo de AMPK, sino que induce una inhibición parcial y moderada del complejo I mitocondrial, generando un aumento del cociente AMP/ATP que activa una red de señalización dependiente de AMPK asociada a mecanismos neuroprotectores. En ratones APP/PS1, esta respuesta se asocia con mejoría de la homeostasis energética, la actividad sináptica, la LTP, la maduración de espinas dendríticas, la función cognitiva, la proteostasis y marcadores de estrés oxidativo e inflamación (Stojakovic

et al., 2021). Esta interpretación es consistente con el estudio original, donde CP2 se describe como un inhibidor leve del complejo I que activa AMPK a partir del aumento del cociente AMP/ATP, desencadenando una cascada neuroprotectora dependiente de AMPK en ratones APP/PS1 sintomáticos. Además, estudios posteriores mostraron que la inhibición parcial del complejo I con CP2 restaura la morfología mitocondrial y la comunicación mitocondria-RE en hipocampo de ratones APP/PS1, reduciendo alteraciones como MOAS, MAMs, estrés de RE y alteraciones en homeostasis lipídica (Panés et al., 2023). Por lo tanto, la activación de AMPK no debe considerarse universalmente perjudicial, dado que su efecto depende de si ocurre como una respuesta adaptativa, moderada y bioenergéticamente compensatoria, como en el caso de CP2, o como parte de un circuito de estrés amiloide sostenido, asociado a acoplamiento incrementado entre RE-mitocondria, dishomeostasis de Ca^{2+} y deterioro sináptico, como sugieren nuestros resultados.

A nivel sináptico, los cambios electrofisiológicos observados indican que A β O s alteran la transmisión glutamatérgica de manera compleja. Las corrientes espontáneas reflejan actividad de red, excitabilidad neuronal y balance entre liberación presináptica y respuesta postsináptica. En cambio, las mEPSCs entregan información más directa sobre eventos cuantales excitatorios independientes de potenciales de acción. Por ello, una reducción en la amplitud de mEPSCs puede

interpretarse como una alteración postsináptica compatible con menor número de receptores AMPA funcionales en superficie, cambios en la composición de subunidades AMPAR o pérdida de sinapsis funcionales (Reinders et al., 2016; Reinders et al., 2025; Zhang et al., 2022). Por otro lado, cambios en la frecuencia de mEPSCs pueden reflejar alteraciones presinápticas, disminución en la probabilidad de liberación o pérdida de sitios sinápticos activos (He et al., 2019). Esta distinción es importante para evitar una lectura simplificada de los datos electrofisiológicos. La literatura apoya que A β O $_2$ s reducen la eficiencia de la transmisión excitatoria mediante mecanismos pre y postsinápticos. Se ha descrito que A β O $_2$ s pueden disminuir la liberación excitatoria presináptica a través de una vía dependiente de mGluR5 y depleción de PIP $_2$ (He et al., 2019). Además, estudios recientes muestran que A β puede inducir remoción sináptica, endocitosis y degradación de receptores AMPA que contienen GluA3, proporcionando un mecanismo postsináptico concreto para explicar disminución de amplitud de mEPSCs y pérdida de eficacia sináptica (Reinders et al., 2016; Reinders et al., 2025). En este contexto, nuestros resultados electrofisiológicos sugieren que la activación de AMPK inducida por A β O $_2$ s podría contribuir a una disfunción glutamatérgica temprana, posiblemente mediante un eje que integra el aumento de Ca $^{2+}$ citosólico y/o mitocondrial, la fragmentación de mitocondrias dendríticas, la menor disponibilidad local de ATP, una respuesta mitofágica insuficiente y la alteración del tráfico de receptores AMPA, incluyendo su remoción desde la superficie sináptica.

La evidencia *in vivo* fortalece el modelo general. En el hipocampo de animales APP/PS1, el contexto amiloide se asoció a expansión del retículo endoplasmático, aumento del contacto RE-mitocondria y alteraciones mitocondriales, mientras que la delección neuronal de AMPK atenuó estas modificaciones. Estos resultados indican que AMPK no solo participa en respuestas agudas inducidas por A β Os en cultivo, sino que también contribuye a sostener un fenotipo organelar alterado en un contexto fisiopatológico más complejo. Además, las diferencias entre la fragmentación mitocondrial observada en modelos agudos y los cambios morfológicos detectados *in vivo* no deben interpretarse necesariamente como contradictorias. En condiciones crónicas, las mitocondrias pueden presentar elongación, hinchamiento o hiperfusión compensatoria como respuesta al estrés sostenido, la sobrecarga de Ca²⁺ o la falla del control de calidad mitocondrial. La convergencia entre farmacología, genética, análisis estructural y electrofisiología permite proponer que AMPK participa parcialmente en la progresión del daño inducido por A β Os, aunque los mecanismos específicos *upstream* y *downstream* requieren validación adicional.

En síntesis, esta tesis propone que los A β Os inducen un estado de estrés bioenergético y de dishomeostasis de Ca²⁺ que activa AMPK en etapas tempranas. Esta activación favorece la remodelación del eje AMPK-Mfn2-MAMs, aumentando el acoplamiento RE-mitocondria y promoviendo un ambiente celular propicio para

la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} , la fragmentación mitocondrial, la pérdida del potencial de membrana, la alteración del metabolismo oxidativo y la disminución de la actividad metabólica asociada a viabilidad celular. En conjunto, estos eventos podrían contribuir a una disfunción neuronal progresiva, vinculando la alteración organelar inducida por A β O con cambios funcionales en la transmisión sináptica.

CONCLUSIÓN

En conjunto, los resultados de esta tesis permiten proponer un modelo en el cual la desregulación de AMPK inducida por A β O actúa como un eje integrador entre disfunción mitocondrial, remodelación organelar y deterioro sináptico en la enfermedad de Alzheimer (ver esquema resumen). En etapas tempranas, la activación aberrante de AMPK favorecería el aumento de Mfn2 y la reorganización patológica de los contactos RE-mitocondria, potenciando la transferencia de Ca^{2+} , la disfunción mitocondrial y, consecuentemente, alteraciones en la transmisión sináptica. En contextos amiloides más persistentes, esta respuesta se asociaría además con un compromiso de la homeostasis metabólica y de mecanismos de adaptación celular, incluyendo la activación de ULK1 y la regulación de PDH.

La convergencia de los hallazgos obtenidos en modelos celulares y en el modelo murino APP/PS1 con delección neuronal de AMPK respalda esta hipótesis, y sugiere que una modulación precisa de la actividad de esta quinasa podría contribuir a

preservar la homeostasis energética y la integridad sináptica en etapas tempranas de la enfermedad. Asimismo, la actividad de AMPK y su asociación funcional con el eje Mfn2–MAMs podrían constituir marcadores celulares relevantes del daño amiloide. Sin embargo, futuros estudios deberán definir con mayor precisión las ventanas temporales de intervención, la especificidad celular de estos efectos, la contribución diferencial de las isoformas de AMPK y los potenciales riesgos asociados a interferir con sus funciones adaptativas.

Limitaciones y proyecciones

Si bien nuestros resultados sugieren que los efectos inducidos por A β Os están mediados, al menos en parte, por la activación de AMPK, futuros estudios deberán validar de manera directa nodos específicos de señalización asociados a esta vía. En este sentido, el uso complementario del modelo APP/PS1 con delección neuronal de AMPK refuerza la participación de esta quinasa, pero aún será necesario evaluar marcadores moleculares adicionales, incluyendo la fosforilación de MFF y DRP1, así como marcadores de respuesta a proteínas mal plegadas en los mismos modelos experimentales. En segundo lugar, será importante cuantificar directamente el Ca²⁺ mitocondrial mediante sensores dirigidos a la matriz en modelos APP/PS1 con y sin delección neuronal de AMPK, con el fin de correlacionar la remodelación estructural de los contactos RE–mitocondria con los flujos

intracelulares de Ca^{2+} . Finalmente, la contribución específica de las isoformas AMPK α 1 y AMPK α 2 en neuronas constituye una pregunta que, a partir de los resultados de este trabajo, no puede ser resuelta de manera concluyente. Por ello, análisis diferenciales futuros serán necesarios para determinar si estas isoformas cumplen funciones redundantes o, por el contrario, participan de manera específica en la regulación de Mfn2, las MAMs, la función mitocondrial y la transmisión sináptica.

RESUMEN GRÁFICO

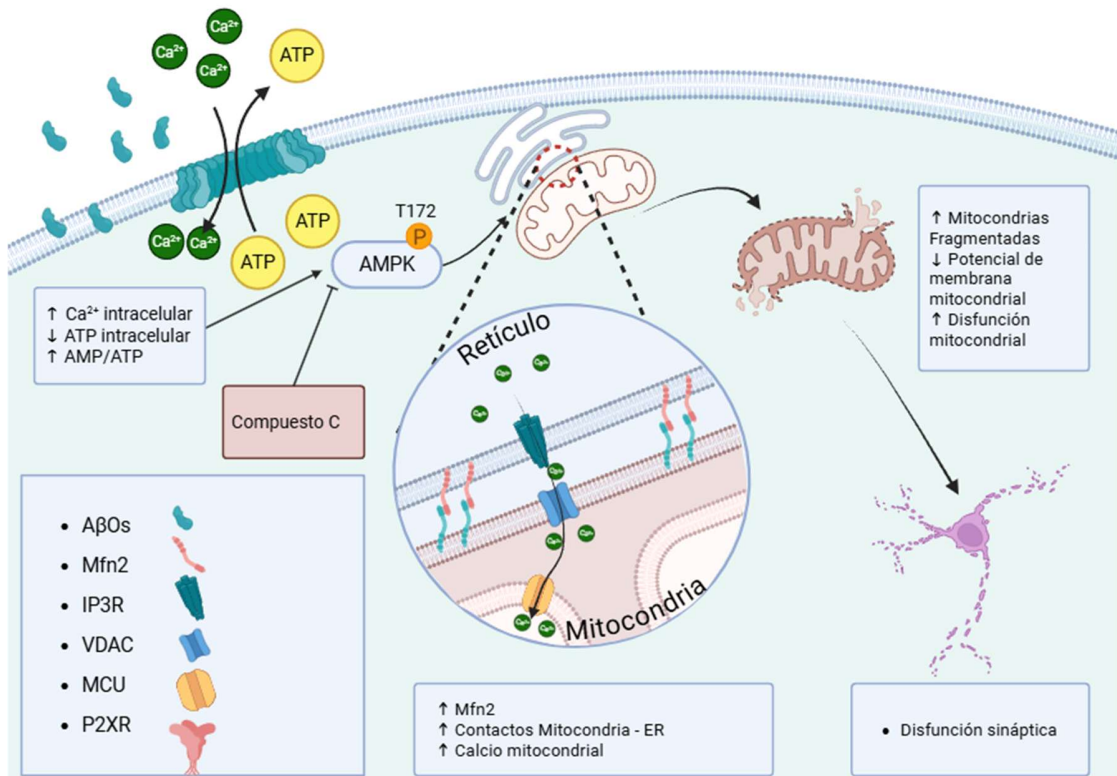


Figura 16. Resumen Gráfico. Los AβOs alteran la homeostasis intracelular de Ca^{2+} y el balance energético celular, promoviendo la activación de AMPK mediante fosforilación en Thr172. La activación de esta quinasa incrementa los niveles de Mfn2 y favorece el aumento de los contactos entre retículo endoplasmático y mitocondria (MAMs), lo que potencia la transferencia de Ca^{2+} hacia la mitocondria. Como consecuencia, se observa fragmentación mitocondrial, disminución del potencial de membrana mitocondrial y deterioro de la función mitocondrial, eventos que convergen en disfunción sináptica y compromiso neuronal. La inhibición farmacológica de AMPK con compuesto C revierte parcialmente estos cambios, apoyando un rol central de AMPK en la reorganización de MAMs y en la disfunción mitocondrial inducida por AβOs.

ABREVIATURAS

α -CTF	: Fragmento C-terminal α o C83
β -CTF	: Fragmento β carboxi-terminal de APP o C99
μ g	: Microgramo
μ l	: Microlitro
μ M	: Micromolar
$^{\circ}$ C	: Grados Celsius
A β	: Péptido β -amiloide
A β Os	: Oligómeros solubles de A β
A β 40	: Péptido β -amiloide de 40 aminoácidos
A β 42	: Péptido β -amiloide de 42 aminoácidos
ADP	: Adenosín difosfato
AICD	: Dominio intracelular de APP
AMP	: Adenosín monofosfato
AMPK	: proteína quinasa dependiente de AMP
AMPKT	: AMPK total
APP	: Proteína Precursora Amiloide
APP/PS1	: Ratón transgénico con las mutaciones APPSWE y PS1 Δ E9
APPs α	: Fragmento APP soluble α
APPs β	: Fragmento APP soluble β
APPSWE	: Mutación sueca de APP K670M/N671L
ATP	: Adenosín trifosfato
BACE1	: Enzima β -secretasa
Ca ²⁺	: Iones de calcio

CaMKK2	: proteína quinasa quinasa 2 dependiente de calcio/calmodulina
CaMKII	: proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina
CMA	: Centro de microscopía avanzada
CO ₂	: Dióxido de carbono
CTRL	: Control
Da	: Dalton
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DIV	: Días <i>in vitro</i>
DMEM	: Medio Eagle modificado por Dulbecco
DPBS	: Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
EA	: Enfermedad de Alzheimer
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	: Suero fetal bovino
GFP	: Proteína fluorescente verde
GPCR	: Receptores acoplados a proteína G
h	: hora/horas
HEPES	: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HRP	: Peroxidasa de rábano
HS	: Suero de caballo
I _{MAX}	: corriente máxima
IP3	: Inositol 1,4,5-trifosfato
K ⁺	: Iones de potasio
KCl	: Cloruro de potasio
KD	: <i>Knockdown</i>
kDa	: Kilodalton

KH ₂ PO ₄	: Fosfato monopotásico
KO	: <i>Knockout</i>
LTP	: Potenciación a largo plazo
mA	: Miliampere
MAMs	: Membranas asociadas a mitocondrias
MERCs	: Membrana del retículo asociada a la mitocondria
MEM	: Medio mínimo mejorado
Mfn2	: Mitofusina 2
mg	: Miligramo
MgCl ₂	: Cloruro de magnesio
MgSO ₄	: Sulfato de magnesio
Min	: Minutos
mM	: Milimolar
mOsm	: miliOsmoles
mV	: miliVolt
n	: réplicas de experimentos
nA	: Nanoampere
Na ⁺	: Iones de sodio
NaCl	: Cloruro de sodio
NIH	: National Institutes of Health
nm	: nanómetro
nM	: Nanomolar
NMDA	: N-metil-D-aspartato
NTg	: no transgénico
O ₂	: Oxígeno

opti-MEM	: Medio esencial mínimo mejorado
pA	: Picoampere
pAMPK	: AMPK fosforilada en Thr172
PBS	: Solución salina tamponada con fosfato
PC12	: Línea celular de feocromocitoma de glándula suprarrenal de rata
RE	: Retículo endoplasmático
ROI	: Región de interés
rpm	: Revoluciones por minuto
s	: segundos
SBF-SEM	: Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy
SDS	: Dodecilsulfato sódico
SEN	: Solución externa normal
SIN	: Solución interna normal de potasio
SNC	: Sistema nervioso central
TA	: Temperatura ambiente
TBS	: Solución salina tamponada con Tris
Tris	: Tris(hidroximetil)aminometano
UFA	: Unidades de fluorescencia arbitraria
UV	: Ultravioleta
V	: Volt
Vs	: versus

REFERENCIAS

- Alzheimer's, A. (2024). *ALZHEIMER'S DISEASE FACTS AND FIGURES 2024*.
https://www.alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures?gad_source=1&gclid=CjwKCAiA8Lu9BhA8EiwAag16byoLoOKGtc_SFfXl6sNRnci-8EyqPBqChEsAOOL2NAz89TUEH5L_HBoCbrUQAvD_BwE
- Area-Gomez, E., Del Carmen Lara Castillo, M., Tambini, M. D., Guardia-Laguarta, C., de Groof, A. J., Madra, M., Ikenouchi, J., Umeda, M., Bird, T. D., Sturley, S. L., & Schon, E. A. (2012). Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J*, *31*(21), 4106-4123.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2012.202>
- Area-Gomez, E., & Schon, E. A. (2016). Mitochondria-associated ER membranes and Alzheimer disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, *38*, 90-96.
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.04.006>
- Area-Gomez, E., & Schon, E. A. (2017). On the pathogenesis of Alzheimer's disease: the MAM hypothesis. *FASEB Journal*, *31*(3), 864-867.
<https://doi.org/10.1096/fj.201601309>
- Assefa, B. T., Tafere, G. G., Wondafrash, D. Z., & Gidey, M. T. (2020). The Bewildering Effect of AMPK Activators in Alzheimer's Disease: Review of the Current Evidence. *Biomed Res Int*, *2020*, 9895121. <https://doi.org/10.1155/2020/9895121>
- ASSOCIATION, A. S. (2024). *2024 Alzheimer's disease facts and figures* (1552-5260). (Alzheimer's & Dementia, Issue. <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/alz.13809>
- Atakpa-Adaji, P., & Ivanova, A. (2023). IP(3)R at ER-Mitochondrial Contact Sites: Beyond the IP(3)R-GRP75-VDAC1 Ca(2+) Funnel. *Contact (Thousand Oaks)*, *6*, 25152564231181020. <https://doi.org/10.1177/25152564231181020>
- Atlante, A., Valenti, D., Latina, V., & Amadoro, G. (2023). Mitochondrial complex I and β -amyloid peptide interplay in Alzheimer's disease: a critical review. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(21), 15951.
<https://doi.org/10.3390/ijms242115951>

- Barker, W. W., Luis, C. A., Kashuba, A., Luis, M., Harwood, D. G., Loewenstein, D., Waters, C., Jimison, P., Shepherd, E., Sevush, S., Graff-Radford, N., Newland, D., Todd, M., Miller, B., Gold, M., Heilman, K., Doty, L., Goodman, I., Robinson, B.,...Duara, R. (2002). Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 16(4), 203-212. <https://doi.org/10.1097/00002093-200210000-00001>
- Berchtold, N. C., & Cotman, C. W. (1998). Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging*, 19(3), 173-189. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(98\)00052-9](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(98)00052-9)
- Bernard-Marissal, N., Chrast, R., & Schneider, B. L. (2018). Endoplasmic reticulum and mitochondria in diseases of motor and sensory neurons: a broken relationship? *Cell Death Dis*, 9(3), 333. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0125-1>
- Bobba, A., Casalino, E., Amadoro, G., Petragallo, V. A., & Atlante, A. (2017). AMPK is activated early in cerebellar granule cells undergoing apoptosis and influences VADC1 phosphorylation status and activity. *Apoptosis*, 22(9), 1069-1078. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1389-8>
- Borchelt, D. R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., & Sisodia, S. S. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 19(4), 939-945. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80974-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80974-5)
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, 33(1), 95-130. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(00)00019-9)
- Bui, V., Santerre, M., Shcherbik, N., & Sawaya, B. E. (2025). Mitochondria-associated membranes (MAMs): molecular organization, cellular functions, and their role in health and disease. *FEBS Open Bio*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/2211-5463.70121>
- Cai, W., Li, L., Sang, S., Pan, X., & Zhong, C. (2023). Physiological Roles of beta-amyloid in Regulating Synaptic Function: Implications for AD Pathophysiology. *Neurosci Bull*, 39(8), 1289-1308. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00985-9>

- Calvo-Rodriguez, M., Hernando-Perez, E., Nunez, L., & Villalobos, C. (2019). Amyloid beta Oligomers Increase ER-Mitochondria Ca(2+) Cross Talk in Young Hippocampal Neurons and Exacerbate Aging-Induced Intracellular Ca(2+) Remodeling. *Front Cell Neurosci*, 13, 22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00022>
- Calvo-Rodriguez, M., Hou, S. S., Snyder, A. C., Kharitonova, E. K., Russ, A. N., Das, S., Fan, Z., Muzikansky, A., Garcia-Alloza, M., Serrano-Pozo, A., Hudry, E., & Bacskai, B. J. (2020). Increased mitochondrial calcium levels associated with neuronal death in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Commun*, 11(1), 2146. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16074-2>
- Celis-Morales, C., Leiva-Ordóñez, A. M., Nazar, G., Albala, C., Troncoso, C., & Cigarroa-Cuevas, I. (2021). El 40% de los casos de demencia podrían ser prevenidos si se modifican factores de riesgo a través del curso de vida. *Revista médica de Chile*, 149, 152-154. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872021000100152&nrm=iso
- Chen, C., Dai, G., Fan, M., Wang, X., Niu, K., & Gao, W. (2025). Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes and myocardial ischemia: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Translational Medicine*, 23(1), 277. <https://doi.org/10.1186/s12967-025-06262-3>
- Chen, S., Ge, X., Chen, Y., Lv, N., Liu, Z., & Yuan, W. (2013). Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research. *Drug Des Devel Ther*, 7, 117-125. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S40229>
- Choi, S. H., Leight, S. N., Lee, V. M., Li, T., Wong, P. C., Johnson, J. A., Saraiva, M. J., & Sisodia, S. S. (2007). Accelerated Aβ deposition in APP^{swe}/PS1^{ΔE9} mice with hemizygous deletions of TTR (transthyretin). *J Neurosci*, 27(26), 7006-7010. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1919-07.2007>
- Cieri, D., Vicario, M., Giacomello, M., Vallese, F., Filadi, R., Wagner, T., Pozzan, T., Pizzo, P., Scorrano, L., Brini, M., & Cali, T. (2018). SPLICS: a split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition. *Cell Death Differ*, 25(6), 1131-1145. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0033-z>
- Corrigan, F., Vink, R., Blumbergs, P. C., Masters, C. L., Cappai, R., & van den Heuvel, C. (2012). sAPP α rescues deficits in amyloid precursor protein knockout mice following focal traumatic brain injury. *J Neurochem*, 122(1), 208-220. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07761.x>

- Crosas-Molist, E., Graziani, V., Maiques, O., Pandya, P., Monger, J., Samain, R., George, S. L., Malik, S., Salise, J., Morales, V., Le Guennec, A., Atkinson, R. A., Marti, R. M., Matias-Guiu, X., Charras, G., Conte, M. R., Elosegui-Artola, A., Holt, M., & Sanz-Moreno, V. (2023). AMPK is a mechano-metabolic sensor linking cell adhesion and mitochondrial dynamics to Myosin-dependent cell migration. *Nat Commun*, 14(1), 2740. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38292-0>
- Csordas, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla, T., Mannella, C. A., & Hajnoczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol*, 174(7), 915-921. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604016>
- Cuevas, M. E., Haensgen, H., Sepúlveda, F. J., Zegers, G., Roa, J., Opazo, C., & Aguayo, L. G. (2011). Soluble A β (1-40) peptide increases excitatory neurotransmission and induces epileptiform activity in hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis*, 23(4), 673-687. <https://doi.org/10.3233/jad-2011-091717>
- Dai, M.-H., Zheng, H., Zeng, L.-D., & Zhang, Y. (2018). The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. *Oncotarget*, 9(19), 15132-15143. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23738>
- de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(7222), 605-610. <https://doi.org/10.1038/nature07534>
- de Ridder, I., Kerkhofs, M., Lemos, F. O., Loncke, J., Bultynck, G., & Parys, J. B. (2023). The ER-mitochondria interface, where Ca(2+) and cell death meet. *Cell Calcium*, 112, 102743. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2023.102743>
- Eimer, W. A., Vijaya Kumar, D. K., Navalpur Shanmugam, N. K., Rodriguez, A. S., Mitchell, T., Washicosky, K. J., Gyorgy, B., Breakefield, X. O., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2018). Alzheimer's Disease-Associated beta-Amyloid Is Rapidly Seeded by Herpesviridae to Protect against Brain Infection. *Neuron*, 99(1), 56-63 e53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.030>
- Fagiani, F., Lanni, C., Racchi, M., & Govoni, S. (2021). (Dys)regulation of Synaptic Activity and Neurotransmitter Release by beta-Amyloid: A Look Beyond Alzheimer's Disease Pathogenesis [Mini Review]. *Front Mol Neurosci*, 14, 635880. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.635880>

- Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., & De Felice, F. G. (2015). Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*, 9, 191. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00191>
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., & Pizzo, P. (2015). Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(17), E2174-2181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504880112>
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., & Pizzo, P. (2016). Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum-mitochondria coupling by tuning the antagonistic effect of Mitofusin 2. *Cell Reports*, 15(10), 2226-2238. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.013>
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., & Pizzo, P. (2017). On the role of Mitofusin 2 in endoplasmic reticulum-mitochondria tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(12), E2266-E2267. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616040114>
- Filadi, R., Pendin, D., & Pizzo, P. (2018). Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis*, 9(3), 330. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0023-6>
- Finder, V. H., & Glockshuber, R. (2007). Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis*, 4(1), 13-27. <https://doi.org/10.1159/000100355>
- Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J., & Voeltz, G. K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*, 334(6054), 358-362. <https://doi.org/10.1126/science.1207385>
- Fuentealba, J., Dibarrart, A., Saez-Orellana, F., Fuentes-Fuentes, M. C., Oyanedel, C. N., Guzman, J., Perez, C., Becerra, J., & Aguayo, L. G. (2012). Synaptic silencing and plasma membrane dyshomeostasis induced by amyloid-beta peptide are prevented by *Aristotelia chilensis* enriched extract. *J Alzheimers Dis*, 31(4), 879-889. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120229>
- Fuentealba, J., Dibarrart, A. J., Fuentes-Fuentes, M. C., Saez-Orellana, F., Quinones, K., Guzman, L., Perez, C., Becerra, J., & Aguayo, L. G. (2011). Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid-beta aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract. *J Neurosci Res*, 89(9), 1499-1508. <https://doi.org/10.1002/jnr.22679>

- Fuentes, P., & Albala, C. (2014). An update on aging and dementia in Chile. *Dement Neuropsychol*, 8(4), 317-322. <https://doi.org/10.1590/s1980-57642014dn84000003>
- Galani, C., Fellenz, M., Becker, D., Bold, C., Lichtenthaler, S. F., Muller, U. C., Deller, T., & Vlachos, A. (2021). Amyloid-Beta Mediates Homeostatic Synaptic Plasticity. *J Neurosci*, 41(24), 5157-5172. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1820-20.2021>
- Geng, D., Kang, L., Su, Y., Jia, J., Ma, J., Li, S., Du, J., & Cui, H. (2013). Protective effects of EphB2 on Abeta1-42 oligomer-induced neurotoxicity and synaptic NMDA receptor signaling in hippocampal neurons. *Neurochem Int*, 63(4), 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.016>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. T., & Kempson, I. M. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Godoy, P. A., Mennickent, D., Cuchillo-Ibanez, I., Ramirez-Molina, O., Silva-Grecchi, T., Panes-Fernandez, J., Castro, P., Saez-Valero, J., & Fuentealba, J. (2021). Increased P2x2 receptors induced by amyloid-beta peptide participates in the neurotoxicity in alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*, 142, 111968. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111968>
- Godoy, P. A., Ramirez-Molina, O., & Fuentealba, J. (2019). Exploring the Role of P2X Receptors in Alzheimer's Disease [Review]. *Front Pharmacol*, 10, 1330. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01330>
- Gomez-Suaga, P., Paillusson, S., Stoica, R., Noble, W., Hanger, D. P., & Miller, C. C. J. (2017). The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy. *Curr Biol*, 27(3), 371-385. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.12.038>
- Gowans, G. J., & Hardie, D. G. (2014). AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP. *Biochem Soc Trans*, 42(1), 71-75. <https://doi.org/10.1042/BST20130244>
- Gowans, G. J., Hawley, S. A., Ross, F. A., & Hardie, D. G. (2013). AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab*, 18(4), 556-566. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.019>

- Grochowska, K. M., Gomes, G. M., Raman, R., Kaushik, R., Sosulina, L., Kaneko, H., Oelschlegel, A. M., Yuanxiang, P., Reyes-Resina, I., Bayraktar, G., Samer, S., Spilker, C., Woo, M. S., Morawski, M., Goldschmidt, J., Friese, M. A., Rossner, S., Navarro, G., Remy, S.,...Kreutz, M. R. (2023). Jacob-induced transcriptional inactivation of CREB promotes Abeta-induced synapse loss in Alzheimer's disease. *EMBO J*, 42(4), e112453. <https://doi.org/10.15252/emj.2022112453>
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A., & Yoshimori, T. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495(7441), 389-393. <https://doi.org/10.1038/nature11910>
- Hempel, H., Hardy, J., Blennow, K., Chen, C., Perry, G., Kim, S. H., Villemagne, V. L., Aisen, P., Vendruscolo, M., Iwatsubo, T., Masters, C. L., Cho, M., Lannfelt, L., Cummings, J. L., & Vergallo, A. (2021). The Amyloid-beta Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry*, 26(10), 5481-5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4), 251-262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Hartley, D. M., Walsh, D. M., Ye, C. P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P. M., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci*, 19(20), 8876-8884. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-20-08876.1999>
- Hawley, S. A., Davison, M., Woods, A., Davies, S. P., Beri, R. K., Carling, D., & Hardie, D. G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 271(44), 27879-27887. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27879>
- Hayashi, T., & Su, T. P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*, 131(3), 596-610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.036>

- He, Y., Wei, M., Wu, Y., Qin, H., Li, W., Ma, X., Cheng, J., Ren, J., Shen, Y., Chen, Z., Sun, B., & Huang, F. D. (2019). Amyloid β oligomers suppress excitatory transmitter release via presynaptic depletion of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature Communications*, 10(1), 1193. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09114-z>
- Hedskog, L., Pinho, C. M., Filadi, R., Ronnback, A., Hertwig, L., Wiehager, B., Larssen, P., Gellhaar, S., Sandebring, A., Westerlund, M., Graff, C., Winblad, B., Galter, D., Behbahani, H., Pizzo, P., Glaser, E., & Ankarcrona, M. (2013). Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(19), 7916-7921. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300677110>
- Henneges, C., Reed, C., Chen, Y. F., Dell'Agnello, G., & Lebec, J. (2016). Describing the Sequence of Cognitive Decline in Alzheimer's Disease Patients: Results from an Observational Study. *J Alzheimers Dis*, 52(3), 1065-1080. <https://doi.org/10.3233/JAD-150852>
- Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(2), 121-135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
- Hoffmann, L. F., Martins, A., Majolo, F., Contini, V., Laufer, S., & Goettert, M. I. (2023). Neural regeneration research model to be explored: SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neural Regen Res*, 18(6), 1265-1266. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.358621>
- Hojman, D. A., Duarte, F., Ruiz-Tagle, J., Budnich, M., Delgado, C., & Slachevsky, A. (2017). The cost of dementia in an unequal country: The case of Chile. *PLOS ONE*, 12(3), e0172204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172204>
- Hoogstraten, C. A., Smeitink, J. A. M., Russel, F. G. M., & Schirris, T. J. J. (2022). Dissecting drug-induced cytotoxicity and metabolic dysfunction in conditionally immortalized human proximal tubule cells. *Frontiers in Toxicology*, 4, 842396. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.842396>
- Hu, Y., Chen, H., Zhang, L., Lin, X., Li, X., Zhuang, H., Fan, H., Meng, T., He, Z., Huang, H., Gong, Q., Zhu, D., Xu, Y., He, P., Li, L., & Feng, D. (2021). The AMPK-MFN2 axis regulates MAM dynamics and autophagy induced by energy stresses. *Autophagy*, 17(5), 1142-1156. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1749490>

- Hur, J. Y. (2022). gamma-Secretase in Alzheimer's disease. *Exp Mol Med*, 54(4), 433-446. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00754-8>
- Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R., & Witters, L. A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem*, 280(32), 29060-29066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503824200>
- INE. (2024). *Instituto Nacional de Estadísticas. Censo 2024. Resultados*. <https://censo2024.ine.gob.cl/resultados/>
- Jan, A., Gokce, O., Luthi-Carter, R., & Lashuel, H. A. (2008). The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. *J Biol Chem*, 283(42), 28176-28189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803159200>
- Kakimoto, Y., Tashiro, S., Kojima, R., Morozumi, Y., Endo, T., & Tamura, Y. (2018). Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system. *Scientific Reports*, 8(1), 6175. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24466-0>
- Kessels, H. W., Nabavi, S., & Malinow, R. (2013). Metabotropic NMDA receptor function is required for β -amyloid-induced synaptic depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(10), 4033-4038. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1219605110>
- Klaassen P, G., Werlinger E, E., Contreras E, L., González B, A., Vera C, A., Juica A, S., & Fuentealba S, M. (2021). Calidad de Vida en Demencia Alzheimer: un nuevo desafío. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 59(4), 361-367. <https://doi.org/10.4067/s0717-92272021000400361>
- Kuhn, P. H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Rossner, S., & Lichtenthaler, S. F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*, 29(17), 3020-3032. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.167>
- Laker, R. C., Drake, J. C., Wilson, R. J., Lira, V. A., Lewellen, B. M., Ryall, K. A., Fisher, C. C., Zhang, M., Saucerman, J. J., Goodyear, L. J., Kundu, M., & Yan, Z. (2017). Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in

- exercise-induced mitophagy. *Nature Communications*, 8(1), 548.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00520-9>
- Lal, R., Lin, H., & Quist, A. P. (2007). Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. *Biochim Biophys Acta*, 1768(8), 1966-1975.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.04.021>
- Leal, N. S., Dentoni, G., Schreiner, B., Naia, L., Piras, A., Graff, C., Cattaneo, A., Meli, G., Hamasaki, M., Nilsson, P., & Ankarcona, M. (2020). Amyloid Beta-Peptide Increases Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contact Altering Mitochondrial Function and Autophagosome Formation in Alzheimer's Disease-Related Models. *Cells*, 9(12), 2552. <https://doi.org/10.3390/cells9122552>
- Lee, A., Kondapalli, C., Virga, D. M., Lewis, T. L., Koo, S. Y., Ashok, A., Mairet-Coello, G., Herzig, S., Foretz, M., Viollet, B., Shaw, R. J., Sproul, A., & Polleux, F. (2022). Aβ42 oligomers trigger synaptic loss through CAMKK2-AMPK-dependent effectors coordinating mitochondrial fission and mitophagy. *Nature Communications*, 13(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32130-5>
- Li, Z., Zhang, W., Zhang, H., Chen, Y., & Zhang, Y. (2023). The contribution of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 1158204.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1158204>
- Lim, D., Dematteis, G., Tapella, L., Genazzani, A. A., Cali, T., Brini, M., & Verkhratsky, A. (2021). Ca²⁺ handling at the mitochondria-ER contact sites in neurodegeneration. *Cell Calcium*, 98, 102453.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102453>
- Lin, H., Zhu, Y. J., & Lal, R. (1999). Amyloid beta protein (1-40) forms calcium-permeable, Zn²⁺-sensitive channel in reconstituted lipid vesicles. *Biochemistry*, 38(34), 11189-11196. <https://doi.org/10.1021/bi982997c>
- Liu, Y., Mao, Z. H., Huang, J., Wang, H., Zhang, X., Zhou, X., Xu, Y., Pan, S., Liu, D., Liu, Z., & Feng, Q. (2025). Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Human Health and Diseases. *MedComm* (2020), 6(7), e70259.
<https://doi.org/10.1002/mco2.70259>
- Mairet-Coello, G., Courchet, J., Pieraut, S., Courchet, V., Maximov, A., & Polleux, F. (2013). The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of Aβ

oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron*, 78(1), 94-108.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.003>

Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Rimessi, A., Wieckowski, M. R., Giorgi, C., & Pinton, P. (2018). Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*, 69, 62-72.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.003>

Marinangeli, C., Didier, S., Ahmed, T., Caillerez, R., Domise, M., Laloux, C., Begard, S., Carrier, S., Colin, M., Marchetti, P., Ghesquiere, B., Balschun, D., Buee, L., Kluza, J., & Vingtdeux, V. (2018). AMP-Activated Protein Kinase Is Essential for the Maintenance of Energy Levels during Synaptic Activation. *iScience*, 9, 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.10.006>

Markovinovic, A., Greig, J., Martin-Guerrero, S. M., Salam, S., & Paillusson, S. (2022). Endoplasmic reticulum-mitochondria signaling in neurons and neurodegenerative diseases. *J Cell Sci*, 135(3). <https://doi.org/10.1242/jcs.248534>

Ministerio de Salud, G. d. C. (2017). *PLAN NACIONAL DE DEMENCIA 2017*.

Miyamoto, T., Kim, D., Knox, J. A., Johnson, E., & Mucke, L. (2016). Increasing the Receptor Tyrosine Kinase EphB2 Prevents Amyloid-beta-induced Depletion of Cell Surface Glutamate Receptors by a Mechanism That Requires the PDZ-binding Motif of EphB2 and Neuronal Activity. *J Biol Chem*, 291(4), 1719-1734.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.666529>

Monteiro-Cardoso, V. F., Rochin, L., Arora, A., Houcine, A., Jaaskelainen, E., Kivela, A. M., Sauvanet, C., Le Bars, R., Marien, E., Dehairs, J., Neveu, J., El Khallouki, N., Santonico, E., Swinnen, J. V., Taresté, D., Olkkonen, V. M., & Giordano, F. (2022). ORP5/8 and MIB/MICOS link ER-mitochondria and intra-mitochondrial contacts for non-vesicular transport of phosphatidylserine. *Cell Rep*, 40(12), 111364.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111364>

Morley, J. E., & Farr, S. A. (2014). The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochem Pharmacol*, 88(4), 479-485. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.018>

Muller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci*, 18(5), 281-298.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>

- Murphy, M. P., & LeVine, H., 3rd. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*, 19(1), 311-323. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1221>
- Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2013). The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett*, 587(13), 2046-2054. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.010>
- Naon, D., Hernandez-Alvarez, M. I., Shinjo, S., Wieczor, M., Ivanova, S., Martins de Brito, O., Quintana, A., Hidalgo, J., Palacin, M., Aparicio, P., Castellanos, J., Lores, L., Sebastian, D., Fernandez-Veledo, S., Vendrell, J., Joven, J., Orozco, M., Zorzano, A., & Scorrano, L. (2023). Splice variants of mitofusin 2 shape the endoplasmic reticulum and tether it to mitochondria. *Science*, 380(6651), eadh9351. <https://doi.org/10.1126/science.adh9351>
- Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminaranayan, S., Serafini, A., Semenzato, M., Herkenne, S., Hernández-Alvarez, M. I., Zorzano, A., De Stefani, D., Dorn, G. W., 2nd, & Scorrano, L. (2016). Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(40), 11249-11254. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606786113>
- Nixon, R. A. (2017). Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J*, 31(7), 2729-2743. <https://doi.org/10.1096/fj.201700359>
- Ouellet, M., Guillebaud, G., Gervais, V., Lupien St-Pierre, D., & Germain, M. (2017). A novel algorithm identifies stress-induced alterations in mitochondrial connectivity and inner membrane structure from confocal images. *PLoS Comput Biol*, 13(6), e1005612. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005612>
- Palma, F. R., He, C., Danes, J. M., Paviani, V., Coelho, D. R., Gantner, B. N., & Bonini, M. G. (2020). Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch. *Antioxid Redox Signal*, 32(10), 701-714. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7962>
- Panes, J., Nguyen, T. K. O., Gao, H., Christensen, T. A., Stojakovic, A., Trushin, S., Salisbury, J. L., Fuentealba, J., & Trushina, E. (2023). Partial Inhibition of Complex I Restores Mitochondrial Morphology and Mitochondria-ER Communication in Hippocampus of APP/PS1 Mice. *Cells*, 12(8), 1111. <https://doi.org/10.3390/cells12081111>

- Park, H., Yu, Q., Hundley, F. V., Overmyer, K., Serrano, L., Paulo, J. A., Paoli, J. C., Swarup, S., Coon, J. J., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2022). Early Endosome Capture Proteomics and its Application to Amyloid Precursor Protein Intramembrane Processing by β and γ -Secretases. *bioRxiv*, 2022.2003.2031.486371. <https://doi.org/10.1101/2022.03.31.486371>
- Park, J. M., Lee, D. H., & Kim, D. H. (2023). Redefining the role of AMPK in autophagy and the energy stress response. *Nat Commun*, 14(1), 2994. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38401-z>
- Pauwels, K., Williams, T. L., Morris, K. L., Jonckheere, W., Vandersteen, A., Kelly, G., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Pastore, A., Serpell, L. C., & Broersen, K. (2012). Structural basis for increased toxicity of pathological abeta42:abeta40 ratios in Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 287(8), 5650-5660. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.264473>
- Peron, R., Vatanabe, I. P., Manzine, P. R., Camins, A., & Cominetti, M. R. (2018). Alpha-Secretase ADAM10 Regulation: Insights into Alzheimer's Disease Treatment. *Pharmaceuticals (Basel)*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/ph11010012>
- Proulx, J., Park, I. W., & Borgmann, K. (2021). Cal'MAM'ity at the Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Interface: A Potential Therapeutic Target for Neurodegeneration and Human Immunodeficiency Virus-Associated Neurocognitive Disorders. *Front Neurosci*, 15, 715945. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.715945>
- Qassem, T., Itani, L., Nasr, W., Al-Ayyat, D., Javaid, S. F., & Al-Sinawi, H. (2023). Prevalence and economic burden of dementia in the Arab world. *BJPsych Open*, 9(4), e126. <https://doi.org/10.1192/bjo.2023.517>
- Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y. X., Zhao, Y. F., & Li, Y. M. (2015). Abeta42 and Abeta40: similarities and differences. *J Pept Sci*, 21(7), 522-529. <https://doi.org/10.1002/psc.2789>
- Rauhala, L., Jokela, T., Karna, R., Bart, G., Takabe, P., Oikari, S., Tammi, M. I., Pasonen-Seppanen, S., & Tammi, R. H. (2018). Extracellular ATP activates hyaluronan synthase 2 (HAS2) in epidermal keratinocytes via P2Y(2), Ca(2+) signaling, and MAPK pathways. *Biochem J*, 475(10), 1755-1772. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180054>

- Raulin, A. C., Doss, S. V., Trottier, Z. A., Ikezu, T. C., Bu, G., & Liu, C. C. (2022). ApoE in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic strategies. *Mol Neurodegener*, 17(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00574-4>
- Reinders, N. R., Pao, Y., Renner, M. C., Silva-Matos, C. M., Lodder, T. R., Malinow, R., & Kessels, H. W. (2016). Amyloid- β effects on synapses and memory require AMPA receptor subunit GluA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), E6526-E6534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614249113>
- Reinders, N. R., van der Spek, S. J. F., Klaassen, R. V., Koymans, K. J., MacGillavry, H. D., Smit, A. B., & Kessels, H. W. (2025). Amyloid- β -driven synaptic deficits are mediated by synaptic removal of GluA3-containing AMPA receptors. *Journal of Neuroscience*, 45(9), e0393242024. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0393-24.2024>
- Resende, R., Fernandes, T., Pereira, A. C., Marques, A. P., & Pereira, C. F. (2022). Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contacts Modulate Reactive Oxygen Species-Mediated Signaling and Oxidative Stress in Brain Disorders: The Key Role of Sigma-1 Receptor. *Antioxid Redox Signal*, 37(10-12), 758-780. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8231>
- Rhee, S. K., Quist, A. P., & Lal, R. (1998). Amyloid beta protein-(1-42) forms calcium-permeable, Zn²⁺-sensitive channel. *J Biol Chem*, 273(22), 13379-13382. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13379>
- Rossini, M., Fernandes, T., D'Arsie, I., & Filadi, R. (2025). Endoplasmic reticulum-Mitochondria Coupling in Alzheimer's Disease. *Contact (Thousand Oaks)*, 8, 25152564251330069. <https://doi.org/10.1177/25152564251330069>
- Saez-Orellana, F., Fuentes-Fuentes, M. C., Godoy, P. A., Silva-Grecchi, T., Panes, J. D., Guzman, L., Yevenes, G. E., Gavilan, J., Egan, T. M., Aguayo, L. G., & Fuentealba, J. (2018). P2X receptor overexpression induced by soluble oligomers of amyloid beta peptide potentiates synaptic failure and neuronal dyshomeostasis in cellular models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 128, 366-378. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.027>
- Saez-Orellana, F., Godoy, P. A., Bastidas, C. Y., Silva-Grecchi, T., Guzman, L., Aguayo, L. G., & Fuentealba, J. (2016). ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble oligomers of beta-amyloid peptide

in hippocampal neurons. *Neuropharmacology*, 100, 116-123.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.04.005>

Sassano, M. L., van Vliet, A. R., Vervoort, E., Van Eygen, S., Van den Haute, C., Pavie, B., Roels, J., Swinnen, J. V., Spinazzi, M., Moens, L., Casteels, K., Meyts, I., Pinton, P., Marchi, S., Rochin, L., Giordano, F., Felipe-Abrio, B., & Agostinis, P. (2023). PERK recruits E-Syt1 at ER-mitochondria contacts for mitochondrial lipid transport and respiration. *J Cell Biol*, 222(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.202206008>

Sepulveda, F. J., Parodi, J., Peoples, R. W., Opazo, C., & Aguayo, L. G. (2010). Synaptotoxicity of Alzheimer beta amyloid can be explained by its membrane perforating property. *PLOS ONE*, 5(7), e11820.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011820>

Sharma, N., Patel, C., Shenkman, M., Kessel, A., Ben-Tal, N., & Lederkremer, G. Z. (2021). The Sigma-1 receptor is an ER-localized type II membrane protein. *J Biol Chem*, 297(5), 101299. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101299>

Slachevsky, A., Arriagada P., Maturana J., & Rojas R. (2018). *Enfermedad de Alzheimer y otras Demencias en Chile. Propuesta de un Plan Nacional de Alzheimer y otras Demencias.*

Steinberg, G. R., & Carling, D. (2019). AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 18(7), 527-551.
<https://doi.org/10.1038/s41573-019-0019-2>

Stojakovic, A., Trushin, S., Sheu, A., Khalili, L., Chang, S.-Y., Li, X., Christensen, T. A., Salisbury, J. L., Geroux, R. E., Gateno, B., Flannery, P. J., Dehankar, M., Funk, C. C., Wilkins, J., Stepanova, A., O'Hagan, T., Galkin, A., Nesbitt, J., Zhu, X., & Trushina, E. (2021). Partial inhibition of mitochondrial complex I ameliorates Alzheimer's disease pathology and cognition in APP/PS1 female mice. *Communications Biology*, 4(1), 61. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01584-y>

Stoothoff, W. H., & Johnson, G. V. (2005). Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1739(2-3), 280-297.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.06.017>

Sun, J., & Roy, S. (2018). The physical approximation of APP and BACE-1: A key event in alzheimer's disease pathogenesis. *Dev Neurobiol*, 78(3), 340-347.
<https://doi.org/10.1002/dneu.22556>

- Sun, Z., Ma, Z., Cao, W., Jiang, C., Guo, L., Liu, K., Gao, Y., Bai, J., Pi, J., Jiang, P., & Liu, X. (2025). Calcium-mediated mitochondrial fission and mitophagy drive glycolysis to facilitate arterivirus proliferation. *PLoS Pathog*, *21*(1), e1012872. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012872>
- Tahami Monfared, A. A., Byrnes, M. J., White, L. A., & Zhang, Q. (2022). Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression. *Neurol Ther*, *11*(2), 553-569. <https://doi.org/10.1007/s40120-022-00338-8>
- Tan, J. Z. A., & Gleeson, P. A. (2019). The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, *1861*(4), 697-712. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.013>
- Taniguchi, K., Yamamoto, F., Amano, A., Tamaoka, A., Sanjo, N., Yokota, T., Kametani, F., & Araki, W. (2022). Amyloid-beta oligomers interact with NMDA receptors containing GluN2B subunits and metabotropic glutamate receptor 1 in primary cortical neurons: Relevance to the synapse pathology of Alzheimer's disease. *Neurosci Res*, *180*, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2022.03.001>
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*, *283*(44), 29615-29619. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>
- Toyama, E. Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T. L., Jr., Loson, O. C., Hellberg, K., Young, N. P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D. C., & Shaw, R. J. (2016). Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science*, *351*(6270), 275-281. <https://doi.org/10.1126/science.aab4138>
- Trefts, E., & Shaw, R. J. (2021). AMPK: restoring metabolic homeostasis over space and time. *Mol Cell*, *81*(18), 3677-3690. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.015>
- Trushin, S., Nguyen, T. K. O., Stojakovic, A., Ostroot, M., Deason, J. T., Chang, S.-Y., Zhang, L., Macura, S. I., Nambara, T., Lu, W., Kanekiyo, T., & Trushina, E. (2025). Therapeutic assessment of a novel mitochondrial complex I inhibitor in *in vitro* and *in vivo* models of Alzheimer's disease. *eBioMedicine*, *120*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2025.105924>

- Um, J. W., Kaufman, A. C., Kostylev, M., Heiss, J. K., Stagi, M., Takahashi, H., Kerrisk, M. E., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Koleske, A. J., Gunther, E. C., Nygaard, H. B., & Strittmatter, S. M. (2013). Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron*, 79(5), 887-902. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.036>
- Vojtechova, I., Machacek, T., Kristofikova, Z., Stuchlik, A., & Petrasek, T. (2022). Infectious origin of Alzheimer's disease: Amyloid beta as a component of brain antimicrobial immunity. *PLoS Pathog*, 18(11), e1010929. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010929>
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., & Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), 535-539. <https://doi.org/10.1038/416535a>
- Wang, N., Wang, C., Zhao, H., He, Y., Lan, B., Sun, L., & Gao, Y. (2021). The MAMs Structure and Its Role in Cell Death. *Cells*, 10(3), 657. <https://doi.org/10.3390/cells10030657>
- Wilson, E. L., & Metzakopian, E. (2021). ER-mitochondria contact sites in neurodegeneration: genetic screening approaches to investigate novel disease mechanisms. *Cell Death Differ*, 28(6), 1804-1821. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00705-8>
- Wilson, R. S., Segawa, E., Boyle, P. A., Anagnos, S. E., Hize, L. P., & Bennett, D. A. (2012). The natural history of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Psychol Aging*, 27(4), 1008-1017. <https://doi.org/10.1037/a0029857>
- Wu, Y., Whiteus, C., Xu, C. S., Hayworth, K. J., Weinberg, R. J., Hess, H. F., & De Camilli, P. (2017). Contacts between the endoplasmic reticulum and other membranes in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(24), E4859-E4867. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701078114>
- Xiao, X., Liu, H., Liu, X., Zhang, W., Zhang, S., & Jiao, B. (2021). APP, PSEN1, and PSEN2 Variants in Alzheimer's Disease: Systematic Re-evaluation According to ACMG Guidelines. *Front Aging Neurosci*, 13, 695808. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.695808>

- Xie, Y., Kang, R., Klionsky, D. J., & Tang, D. (2023). GPX4 in cell death, autophagy, and disease. *Autophagy*, 19(10), 2621-2638.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2218764>
- Xu, L., Wang, X., & Tong, C. (2020). Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contact Sites and Neurodegeneration. *Front Cell Dev Biol*, 8, 428.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00428>
- Yamamoto, H., Itoh, N., Kawano, S., Yatsukawa, Y.-i., Momose, T., Makio, T., Matsunaga, M., Yokota, M., Esaki, M., Shodai, T., Kohda, D., Aiken Hobbs, A. E., Jensen, R. E., & Endo, T. (2011). Dual role of the receptor Tom20 in specificity and efficiency of protein import into mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 91-96. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1014918108>
- Yan, Y., Mukherjee, S., Harikumar, K. G., Strutzenberg, T. S., Zhou, X. E., Suino-Powell, K., Xu, T. H., Sheldon, R. D., Lamp, J., Brunzelle, J. S., Radziwon, K., Ellis, A., Novick, S. J., Vega, I. E., Jones, R. G., Miller, L. J., Xu, H. E., Griffin, P. R., Kossiakoff, A. A., & Melcher, K. (2021). Structure of an AMPK complex in an inactive, ATP-bound state. *Science*, 373(6553), 413-419. <https://doi.org/10.1126/science.abe7565>
- Yang, D., Wang, Y., Qi, T., Zhang, X., Shen, L., Ma, J., Pang, Z., Lal, N. K., McClatchy, D. B., Seradj, S. H., Leung, V. H., Wang, K., Xie, Y., Polli, F. S., Maximov, A., Gonzalez, O. C., de Lecea, L., Cline, H. T., Augustine, V.,...Ye, L. (2024). Phosphorylation of pyruvate dehydrogenase inversely associates with neuronal activity. *Neuron*, 112(6), 959-971.e958. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.12.015>
- Yang, M., Li, C., Yang, S., Xiao, Y., Xiong, X., Chen, W., Zhao, H., Zhang, Q., Han, Y., & Sun, L. (2020). Mitochondria-Associated ER Membranes - The Origin Site of Autophagy [Review]. *Front Cell Dev Biol*, 8, 595. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00595>
- Zhang, H., Jiang, X., Ma, L., Wei, W., Li, Z., Chang, S., Wen, J., Sun, J., & Li, H. (2022). Role of Abeta in Alzheimer's-related synaptic dysfunction [Review]. *Front Cell Dev Biol*, 10, 964075. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.964075>
- Zhang, X., Li, Y., Xu, H., & Zhang, Y. W. (2014). The gamma-secretase complex: from structure to function [Review]. *Front Cell Neurosci*, 8, 427.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00427>

Zhao, F., Wang, C., & Zhu, X. (2020). Isoform-specific roles of AMPK catalytic alpha subunits in Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, 130(7), 3403-3405. <https://doi.org/10.1172/JCI1137908>

Zhu, R., Liu, L., Mao, T., Wang, X., Li, Y., Li, T., Lv, S., Zeng, S., Fu, N., Li, N., Wang, Y., Sun, M., & Zhang, J. (2024). Mfn2 regulates mitochondria and mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane function in neurodegeneration induced by repeated sevoflurane exposure. *Exp Neurol*, 377, 114807. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.114807>

Zimmermann, H. R., Yang, W., Kasica, N. P., Zhou, X., Wang, X., Beckelman, B. C., Lee, J., Furdui, C. M., Keene, C. D., & Ma, T. (2020). Brain-specific repression of AMPKalpha1 alleviates pathophysiology in Alzheimer's model mice. *J Clin Invest*, 130(7), 3511-3527. <https://doi.org/10.1172/JCI1133982>

